

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Respuesta comparativa del hierro no ligado a transferrina (NTBI) al tratamiento con sulfato ferroso en mujeres y hombres guatemaltecos con reservas inferiores y superiores de hierro

Trabajo de investigación presentado por
Gabriela María Samayoa Reyes
para optar por el grado de Licenciada en Bioquímica
y Microbiología.

Guatemala
2013

Respuesta comparativa del hierro no ligado a transferrina (NTBI) al tratamiento con sulfato ferroso en mujeres y hombres guatemaltecos con reservas inferiores y superiores de hierro

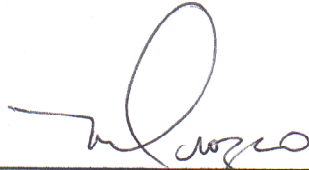
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Respuesta comparativa del hierro no ligado a transferrina (NTBI) al tratamiento con sulfato ferroso en mujeres y hombres guatemaltecos con reservas inferiores y superiores de hierro

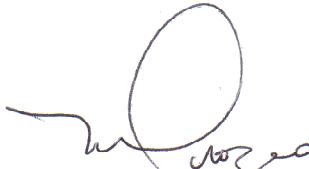
Trabajo de investigación presentado por
Gabriela María Samayoa Reyes
para optar por el grado de Licenciada en Bioquímica
y Microbiología.

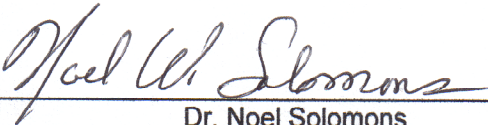
Guatemala
2013

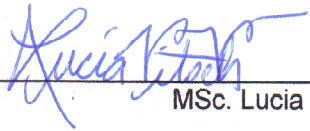
Vo. Bo.:

(f) 
Dra. Mónica Orozco

Tribunal Examinador:

(f) 
Dra. Mónica Orozco

(f) 
Dr. Noel Solomons

(f) 
MSc. Lucia Nitsch

Fecha de aprobación: Guatemala, 11 de enero 2013.

PREFACIO

Este proyecto fue financiado por CeSSIAM (Centro de estudios en sensoriopatas, senectud e impedimentos y alteraciones metabólicas), en estrecha colaboración con la Universidad del Valle de Guatemala, quien proporcionó las instalaciones y el equipo necesario para dicho proyecto.

Agradezco a mi asesora Mónica Orozco PhD por haberme brindado la oportunidad de ser parte de este proyecto, por su orientación y apoyo durante este trabajo de investigación. En igual forma al Noel Solommons PhD por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto. Al equipo de investigación de CeSSIAM quienes estuvieron encargados del reclutamiento, intervención y recolección de muestras. A la Licenciada Margarita Palmieri por habernos brindado la oportunidad de trabajar dentro de las instalaciones del laboratorio que dirige. Así mismo a las demás personas que de una u otra manera contribuyeron con el proyecto.

Por otro lado quiero agradecer a Pamela Pennington PhD por la orientación que me brindó durante la realización del protocolo siendo Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología y a la MSc. Lucia Nitsch por su asesoría en la elaboración del informe final de tesis. Agradezco también a mis catedráticos por los conocimientos que me brindaron a lo largo de la carrera.

Por último quiero agradecer a mis padres por el apoyo incondicional que me han brindado y a mis amigos quienes de distintas formas me apoyaron en este proceso.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xvi
RESUMEN EN FORMATO CIENTÍFICO	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
a. Antecedentes	1
b. Objetivos	4
c. Justificación	5
II. MARCO TEÓRICO	6
A. Importancia y peligros del hierro en la salud, metabolismo, transporte y almacenamiento del hierro.	6
B. Anemia	11
C. Daño peróxidativo inducido por el hierro	12
D. Formación de hierro no ligado a transferrina (NTBI) en el torrente sanguíneo	14
E. Propiedades del NTBI	16
F. Hierro sérico como determinante de absorción de hierro y su relación con NTBI	20
G. Efectos del hierro en la mitocondria	21
H. Envenenamiento ocasionado por hierro	22
I. Efectos de suplementación profiláctica con hierro y ácido fólico	24
J. Riesgo de agravar la infección por administración de hierro	25
K. Diferencias entre sexo y reservas de hierro	27

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
	A. Métodos	32
	1. Sujetos de estudio	32
	2. Aprobación ética	35
	3. Diseño, enfoque y tipo de investigación	36
	4. Colección de muestra	38
	5. Variables	40
	6. Métodos realizados como parte de la tesis - Análisis químicos	41
	7. Análisis estadístico	44
	B. Materiales	46
	1. Recursos humanos	46
	2. Recursos materiales y financieros	47
	3. Ubicación	47
	C. Cronograma de actividades	48
IV.	RESULTADOS	49
	A. Hierro sérico	49
	B. Hierro no ligado a transferrina (NTBI)	52
	C. Correlaciones hierro sérico - Hierro no ligado a transferrina (NTBI)	55
	D. Comparación con estudios anteriores	59
V.	DISCUSION	60
	A. Hierro sérico	61
	B. Hierro no ligado a transferrina (NTBI)	62
	C. Correlaciones hierro sérico - Hierro no ligado a transferrina (NTBI)	64
	D. Comparación con estudios anteriores	65
VI.	CONCLUSIONES	68
VII.	RECOMENDACIONES	70
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

IX.	ANEXOS	80
	A. Consentimiento informado mujeres fase tamizaje	80
	B. Consentimiento informado mujeres fase experimental	83
	C. Consentimiento informado hombres fase tamizaje	86
	D. Consentimiento informado hombres fase experimental	89
	E. Características de los sujetos de estudio	92
	F. Gráficas de comparación con estudio anterior de CESSIAM en Utrecht	100
	G. Análisis estadístico	104

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Fuente probable de hierro esencial para malaria	25
2.	Utilización del hierro derivado del grupo Hemo	26
3.	Operacionalización de variables.....	40
4.	Presupuesto del proyecto.....	47
5.	Cronograma de actividades.....	48
6.	Promedios de hierro sérico.....	49
7.	Promedios de NTBI	52
8.	Análisis de correlación de hombres con reservas de hierro superiores.....	55
9.	Análisis de correlación de hombres con reservas de hierro inferiores.	56
10.	Análisis de correlación de mujeres con reservas de hierro superiores	57
11.	Análisis de correlación de mujeres con reservas de hierro inferiores	58
12.	Comparación de pendientes.....	58
13.	Coeficiente de correlación y pendiente de dos grupos de estudios anteriores.....	59
14.	Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de hombres con reservas de hierro superiores.....	92
15.	Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de hombres con reservas de hierro inferiores.....	93
16.	Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de mujeres con reservas de hierro superiores.....	94
17.	Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de mujeres con reservas de hierro inferiores.....	95

18.	Resumen de las características de los sujetos de estudio de la presente investigación	96
19.	Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de hombres con reservas de hierro superiores de un estudio previo realizado por CeSSIAM en Utrecht.....	97
20.	Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de mujeres con reservas de hierro inferiores de un estudio previo realizado por CeSSIAM en Utrecht.....	98
21.	Resumen de las características de los sujetos de estudio pertenecientes a estudios previos realizados por CeSSIAM en Utrecht	99
22.	Comprobación de supuestos de hierro sérico	104
23.	ANOVA de cambio máximo para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de hierro.....	105
24.	ANOVA de áreas bajo la curva para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de hierro.....	105
25.	Análisis POST- HOC de cambio máximo de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD).....	106
26.	Análisis POST- HOC de área bajo la curva de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD).....	107
27.	Comprobación de supuestos de NTBI....	108

28.	ANOVA de cambios máximos para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de hierro.....	109
29.	ANOVA del área bajo la curva para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de hierro.....	109
30.	Análisis POST- HOC de cambio máximo de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD)	110
31.	Análisis POST- HOC del área bajo la curva de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD)	111

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
1.	Relación de la concentración sérica de hierro y concentración sérica de NTBI...	3
2.	Formas moleculares tóxicas de hierro en el plasma.....	6
3.	Absorción del hierro por el enterocito.....	7
4.	Fuentes, absorción y transporte de hierro.....	9
5.	Ruta de absorción, distribución y eliminación del hierro.....	10
6.	Diferencia de hierro sérico entre hombres y mujeres en diferentes rangos de edad.....	29
7.	Diagrama de flujo del reclutamiento.....	35
8.	Diagrama de flujo del tamizaje.....	37
9.	Proceso de suplementación.....	38
10.	Método de medición de concentración de NTBI.....	43
11.	Tabla de comparación.....	46
12.	Cambios en la concentración de hierro sérico en el tiempo	49
13.	Cambios en la concentración de hierro sérico en el tiempo de mujeres	50
14.	Cambios de concentración de hierro sérico en el tiempo de hombres	50
15.	Comparación de los cambios de concentración de hierro sérico en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro superiores	51
16.	Comparación de los cambios de concentración de hierro sérico en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores	51

17.	Cambios en la concentración de NTBI en el tiempo	52
18.	Cambios en la concentración de NTBI en el tiempo de mujeres	53
19.	Cambios de concentración de NTBI en el tiempo de hombres.....	53
20.	Comparación de los cambios de concentración de NTBI en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro superiores	54
21.	Comparación de los cambios de concentración de NTBI en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores	54
22.	Correlación entre hierro sérico – NTBI en hombres con reservas de hierro superiores	55
23.	Correlación entre hierro sérico – NTBI en hombres con reservas de hierro inferiores	56
24.	Correlación entre hierro sérico – NTBI en mujeres con reservas de hierro superiores	57
25.	Correlación entre hierro sérico – NTBI en mujeres con reservas de hierro inferiores	58
26.	Cambio de concentración hierro sérico en el tiempo de hombres con reservas de hierro superiores de dos diferentes estudios	100
27.	Cambio de concentración hierro sérico en el tiempo de mujeres con reservas de hierro inferiores de dos diferentes estudios	101

28.	Cambio de concentración NTBI en el tiempo de hombres con reservas de hierro superiores de dos diferentes estudios	102
29.	Cambio de concentración NTBI en el tiempo de mujeres con reservas de hierro inferiores de dos diferentes estudios	103

RESUMEN

En el suero el hierro puede encontrarse en dos formas principales: unido a la transferrina (Fe^{3+}) y como hierro libre (Fe^{2+} y Fe^{3+}), este último llamado hierro no ligado a transferrina (por sus siglas en inglés non transferrin bound iron - NTBI). El NTBI produce radicales de oxígeno reactivos que pueden causar oxidación de proteínas y daños en el ADN, entre otros. Es por esto que mantener niveles bajos de NTBI es esencial. En Guatemala se han realizado estudios donde se ha encontrado una relación entre la administración de sulfato ferroso y los niveles de NTBI en el suero, así como un patrón en las mujeres de formar 3.5 veces menos NTBI que hombres suplementados con la misma dosis. Estas diferencias pueden deberse al estado de hierro o diferencias entre sexos.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto sobre la concentración de NTBI y de hierro sérico que tiene una dosis única de 100mg de sulfato ferroso en hombres y mujeres guatemaltecas con reservas de hierro inferiores (ferritinas menores a $30\mu\text{g/dL}$) o superiores (ferritinas mayores a $70\mu\text{g/dL}$). Se utilizó una muestra de 40 sujetos (10 hombres y 10 mujeres con reservas de hierro superiores y 10 hombres y 10 mujeres con reservas de hierro inferiores) para realizar las comparaciones en función de las reservas de hierro y el sexo. Para cuantificar la concentración sérica de NTBI se utilizó un análisis fluorométrico, en el cual se midió la fluorescencia de una misma muestras con dos reactivos. Se calculó la razón de fluorescencia con ambos reactivos, a partir de esta y por medio de una curva de calibración se determinó la concentración. Antes de realizar dicho análisis fue necesario montar y calibrar el método en Guatemala.

Se encontró una diferencia significativa en la concentración de hierro sérico entre hombres y mujeres con reservas de hierro superiores, pues las mujeres con reservas de hierro superiores absorben como si sus reservas fueran inferiores. En cuanto al NTBI no se encontró efecto de los factores analizados. A partir del análisis de correlación realizado se encontró que las mujeres con reservas de hierro superiores forman 2.33 veces menos NTBI que sus contrapartes masculinas, lo que indica que existe algún mecanismo protector en las mujeres con reservas de hierro superiores. Se puede concluir que existe un efecto significativo de la interacción reservas de hierro – sexo sobre la concentración de hierro sérico, y que existe una alta relación entre los cambios de concentración hierro sérico y formación de NTBI.

Respuesta comparativa del hierro no ligado a transferrina (NTBI) al tratamiento con sulfato ferroso en mujeres y hombres guatemaltecos con reservas inferiores y superiores de hierro

Samayoa Reyes, Gabriela María.¹ Asesor: Orozco, Mónica²

1- Estudiante de Bioquímica y Microbiología en la Universidad del Valle de Guatemala 2- Investigadora principal. CESSIAM, Guatemala.

En el suero el hierro puede encontrarse en dos formas principales: unido a la transferrina (Fe^{3+}) y como hierro libre (Fe^{2+} y Fe^{3+}), este último llamado hierro no ligado a transferrina (por sus siglas en inglés non transferrin bound iron - NTBI). El NTBI produce radicales de oxígeno reactivos que pueden causar oxidación de proteínas y daños en el ADN, entre otros. Es por esto que mantener niveles bajos de NTBI es esencial. En Guatemala se han realizado estudios donde se ha encontrado una relación entre la administración de sulfato ferroso y los niveles de NTBI en el suero, así como un patrón en las mujeres de formar 3.5 veces menos NTBI que hombres suplementados con la misma dosis. Estas diferencias pueden deberse al estado de hierro o diferencias entre sexos.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto sobre la concentración de NTBI y de hierro sérico que tiene una dosis única de 100mg de sulfato ferroso en hombres y mujeres guatemaltecas con reservas de hierro inferiores (ferritinas menores a $30\mu\text{g/dL}$) o superiores (ferritinas mayores a $70\mu\text{g/dL}$). Se utilizó una muestra de 40 sujetos (10 hombres y 10 mujeres con reservas de hierro superiores y 10 hombres y 10 mujeres con reservas de hierro inferiores) para realizar las comparaciones en función de las reservas de hierro y el sexo. Para cuantificar la concentración sérica de NTBI se utilizó un análisis fluorométrico, en el cual se midió la fluorescencia de una misma muestras con dos reactivos. Se calculó la razón de fluorescencia con ambos reactivos, a partir de esta y por medio de una curva de calibración se determinó la concentración.

Se encontró una diferencia significativa en la concentración de hierro sérico entre hombres y mujeres con reservas de hierro superiores, pues las mujeres con reservas de hierro superiores absorben como si sus reservas fueran inferiores. En cuanto al NTBI no se encontró efecto de los factores analizados. A partir del análisis de correlación realizado se encontró que las mujeres con reservas de hierro superiores forman 2.33 veces menos NTBI que sus contrapartes masculinas, lo que indica que existe algún mecanismo protector en las mujeres con reservas de hierro superiores. Se puede concluir que existe un efecto significativo de la interacción reservas de hierro – sexo sobre la concentración de hierro sérico, y que existe una alta relación entre los cambios de concentración hierro sérico y formación de NTBI.

Palabras Clave: Hierro no ligado a transferrina, análisis fluorométrico, transferrina.

I. INTRODUCCIÓN

El hierro es esencial en la dieta, ya que tiene función biológica que incluye desde la producción de eritrocitos hasta la síntesis de ADN. Para no causar daño oxidativo, por su capacidad de formar especies reactivas de oxígeno, este debe encontrarse unido a proteínas de transporte y de almacenamiento. Al proveer suplementación profiláctica de hierro en altas concentraciones, un alto porcentaje de este no se puede unir a la transferrina quedando como hierro libre. Este es llamado hierro no ligado a transferrina (por sus siglas en inglés Non transferrine bound iron NTBI), el cual puede tener efectos nocivos sobre la salud. (Harrison-Findik, 2010; Hershko, 2007; Kolb, 2008). Se han realizado estudios previos con este método por CeSSIAM, Guatemala con la colaboración del laboratorio de Utrecht, Holanda para determinar la concentración de NTBI en hombres con reservas de hierro superiores y mujeres con reservas de hierro inferiores. Dicho estudio mostró una relación directamente proporcional entre las concentraciones de hierro circulante y la concentración de NTBI.

Este estudio pretende evaluar si el estado de hierro y el sexo son factores que influyen o determinan la producción de NTBI. Se trabaja con una muestra previamente colectada por el grupo de investigación de CeSSIAM, de 40 sujetos de estudio, provenientes de Escuintla y Ciudad de Guatemala, formada por 20 mujeres, 10 con reservas de hierro superiores y 10 con reservas de hierro inferiores; así como con 20 hombres, 10 con reservas de hierro inferiores y 10 con reservas de hierro superiores. El objetivo general de este estudio es determinar los cambios en las concentraciones de hierro no ligado a transferrina (NTBI) y hierro sérico en respuesta a la administración profiláctica de sulfato ferroso que existen en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores y superiores, para poder así determinar si los cambios de concentración de hierro sérico o NTBI eran significativamente diferentes entre sexos o reservas de hierro. Por último confirmar la relación entre el hierro circulante y NTBI que se observó en Schümann, 2011.

A. Antecedentes

El hierro absorbido a través de los enterocitos proveniente de la dieta, suplementos nutricionales o de alimentos fortificados, entra al torrente sanguíneo y es ligado a una proteína de transporte, la transferrina, lo cual evita la oxidación a nivel celular. No obstante, dicha proteína tiene un límite de saturación (porcentaje de saturación de la transferrina) y por ello hay una fracción de este hierro que no está ligado a esta proteína y es fijado someramente a otras proteínas y aminoácidos (Beard, 2006). Esta forma de hierro circulante se conoce como hierro no ligado a transferrina (NTBI). (Breuer, 2001).

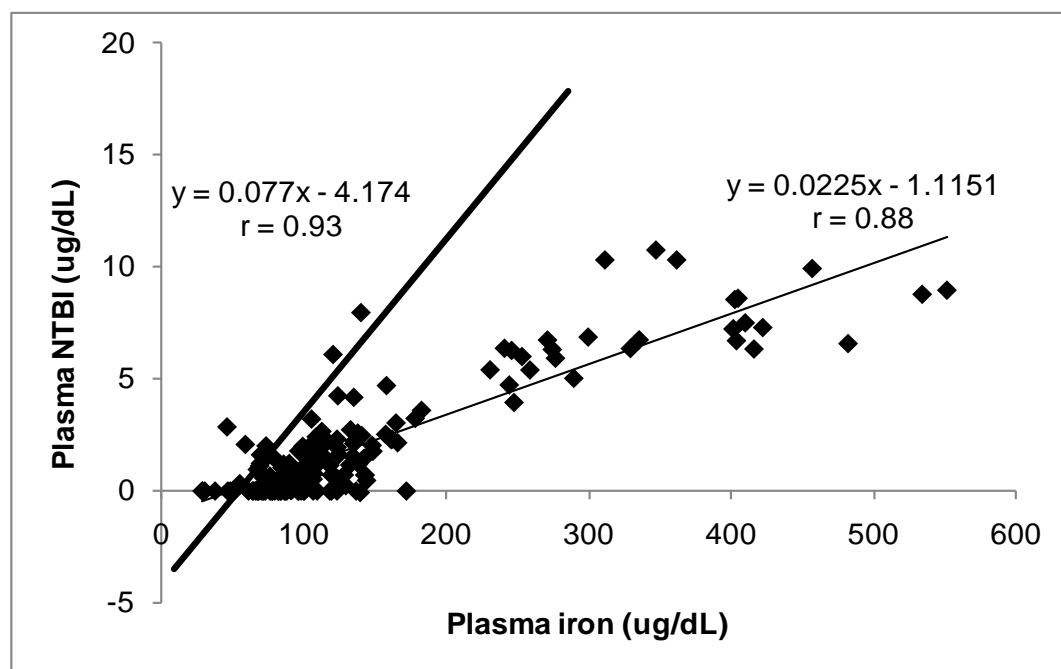
La idea de comenzar las investigaciones con NTBI surge después de un estudio de suplementación a niños de hasta 35 meses de la isla de Pemba en Zanzíbar, la cual es un área con alta prevalencia de anemia (75%) y endémica de malaria. Para tratar la anemia se suplementó con hierro a los niños, esto con el fin de mejorar su estado nutricional y se esperaba que esto a la vez ayudara a que se sobrepusieran de la infección de malaria. Sin embargo, no se determinaron las reservas de hierro previo a la suplementación y los niños con reservas de hierro superior estuvieron una respuesta distinta a la esperada, se incrementó el número de niños hospitalizados y las tasas de mortalidad. Razón por la cual el estudio se dio por concluido antes de completarlo. Después de analizar las causas del incremento de hospitalización y mortalidad, se estableció que existen ciertos patógenos microbianos, especialmente los intracelulares y los que parasitan o consumen eritrocitos, que tienen un requerimiento específico y alto de hierro. Entre estos se encuentra el parásito causante de la malaria, *P. falciparum*, el cual se beneficia por la presencia hierro no ligado a transferrina. Se determinó que al privar a estos microorganismos de acceder al hierro del huésped, se reduce la virulencia de la infección; pero al suplementar al huésped con hierro esta aumenta. Se determinó así la causa por la cual los niños agravaban después de la suplementación; lo que lleva a creer que existe un efecto adverso en la interacción huésped – parásito. (Sazawal, 2006; Schümann, 2011).

Después de la publicación de lo sucedido en la isla de Pemba se comenzaron, en el 2006, estudios en CeSSIAM. Los primeros estudios realizados fueron de hierro libre y la presencia de NTBI en el torrente sanguíneo. Esta investigación surge como una extensión a las investigaciones de la oxidación producida al ingerir dosis terapéuticas y profilácticas de hierro oral. (Schümann, 2011). Los resultados obtenidos de estos estudios son:

1. Administración entré 100 – 120mg de sulfato ferroso forma NTBI sérico que puede cuantificarse.
2. Al administrar dosis de hierro profilácticas las concentraciones de NTBI sérico aumentan. Se demostró que existe correlación entre las concentraciones de NTBI y los niveles de hierro sérico pero con diferentes proporciones entre sexos, tal como se observa en la Figura No.1
3. Se forma NTBI sérico cuando la saturación de transferrina no es mayor al 85%.

El primer estudio se llevó a cabo con hombres con reservas de hierro superiores, se realizó un modelaje para replicar las condiciones de los niños de la isla de Pemba. En este estudio se buscaba determinar si existía una diferencia en la concentración de NTBI sérico en respuesta a la suplementación con diferentes fármacos como fuente de hierro (sulfato ferroso, NaFeEDTA y hierro polimaltosado) y en distintas dosis. De esta investigación se obtuvo que el sulfato ferroso es el que causa un mayor aumento en la concentración de NTBI sérico. Se realizó un segundo estudio con NTBI en CeSSIAM, utilizando como sujetos de estudio a mujeres con reservas de hierro inferiores. Para ambos estudios se correlacionó la concentración de hierro sérico contra la concentración de NTBI y se compararon entre sí. En la Figura No. 1 se puede observar dicha comparación.

Figura No. 1. Relación de la concentración sérica de hierro y la concentración sérica de NTBI, en mujeres con ferritinas inferiores (—) y un análisis secundario en hombres con ferritinas superiores (—), línea de regresión sobre impuesta. Los puntos observados corresponden al estudio de mujeres con ferritinas inferiores n=120.



(Tomada de Schümann, 2011).

Como se puede observar en la Figura No.1 ambos sexos muestran una misma concentración máxima de hierro plasmático en respuesta a la suplementación con hierro. Asimismo se pudo determinar a partir de las pendientes de correlación, 0.077 para hombres y 0.0225 para mujeres, que la respuesta de NTBI es aproximadamente 3.5 veces mayor en hombres que en mujeres, aún cuando la fuente de hierro y las dosis fueron las mismas. Esto

no había sido previsto y aún no se conoce la causa de dicho comportamiento, se cree existe asociación al sexo en donde las mujeres puedan poseer un mecanismo protector que previene la formación de NTBI. Por lo que surge la duda si dicha diferencia se debe al sexo o bien al estado de las reservas de hierro de los sujetos de estudio. (Schümann, 2011).

Este estudio es un proyecto de CeSSIAM en extensión a los anteriores y lo que pretende es determinar si la diferencia observada en la respuesta de NTBI se debe al sexo o al estado de hierro. Por lo que se va a comparar la respuesta de NTBI entre hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores ($<30\mu\text{g/dL}$) y reservas de hierro superiores ($>70\mu\text{g/dL}$) al ser suplementados con 100mg de sulfato ferroso. Para determinar si existen diferencias en los mecanismos de regulación de la absorción de hierro entre sexos y reservas de hierro.

Además se desea analizar la producción de hierro no ligado a transferrina como efecto de suplementación profiláctica de hierro en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores y superiores. Esto se realiza ya que los programas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) proveen a la población una dosis alta de sulfato ferroso, sin realizar ensayos previos para evaluar los niveles séricos de hierro (anémicos y no anémicos) de las personas que reciben el suplemento. Esto puede causar un aumento en las concentraciones de hierro no ligado a transferrina (NTBI) y producir respuestas oxidativas alteradas si la dosis se administra diariamente. El programa nacional da una suplementación a mujeres embarazadas y lactantes de 120mg de sulfato ferroso a la semana, que es mayor a la que se suministrara para esta investigación.

A. Objetivos

1. **Objetivo general.** Determinar el cambio en las concentraciones de hierro no ligado a transferrina y hierro sérico en respuesta a la suministración profiláctica de sulfato ferroso y las diferencias que existen ente hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores y superiores.

2. Objetivos específicos

a. Determinar el cambio de concentración de NTBI sérico con respecto al tiempo después de la suplementación con 100mg de sulfato ferroso a hombres y mujeres guatemaltecos con reservas de hierro inferiores y superiores.

b. Determinar el cambio de concentración de hierro sérico con respecto al tiempo después de la suplementación con 100mg de sulfato ferroso a hombres y mujeres guatemaltecos con reservas de hierro inferiores y superiores.

c. Comparar el cambio en la concentración de hierro sérico y NTBI sérico, en hombres y mujeres guatemaltecos, por suplementación con sulfato ferroso en relación a las reservas de hierro (inferiores y superiores).

d. Comparar el cambio en la concentración de hierro sérico y NTBI por suplementación con sulfato ferroso, en hombres y mujeres guatemaltecos, en relación al sexo.

e. Determinar si existe relación entre la concentración de hierro circulante y la formación de NTBI

B. Justificación

Se sigue línea de investigación de CeSSIAM de NTBI, la primera investigación realizada en el 2006 se basó en el efecto negativo del tratamiento con hierro en poblaciones de niños con malaria en la isla de Pemba. Se cree que el efecto negativo de la suplementación con hierro se debe a que *P. falciparum* interactúa con el hierro no unido a transferrina en el eritrocito infectado, el cual se incrementa por suplementación profiláctica de hierro. Originalmente CeSSIAM realizó un modelaje con adultos, con el que se buscó replicar la situación de la isla de Pemba.

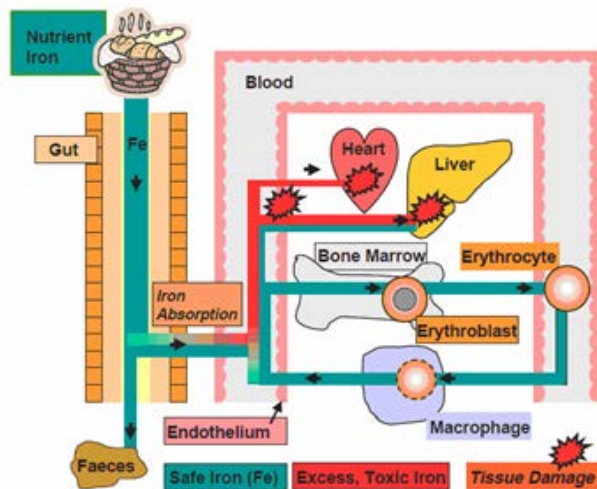
Se quiere comprobar que el cambio de concentración de NTBI se debe a la suplementación profiláctica con sulfato ferroso y que dicho cambio está relacionado con el cambio en concentración de hierro sérico. Así como determinar si existe alguna diferencia en los cambios de concentraciones de NTBI entre sexo o bien entre reservas de hierro. Se cree que las mujeres tienen mecanismos protectores y el aumento de la concentración de NTBI no se da en la misma proporción que en hombres, aunque esto no se puede afirmar pues no existe evidencia suficiente. La idea de esta diferencia entre sexos se genera a partir de estudios donde se ha observado que las mujeres tienen mecanismos de protección contra algunas enfermedades (Orozco, 2012). Esto ayudará a clarificar los mecanismos de regulación del hierro, los cuales aún no son comprendidos en su totalidad y permitirá determinar si existen diferencias entre sexos.

II. MARCO TEORICO

A. Importancia y peligros del hierro en la salud, metabolismo, transporte y almacenamiento del hierro.

El hierro es un metal de transición que existe en dos estados de oxidación según su valencia: forma reducida como hierro ferroso, Fe^{2+} , o en la forma oxidada como hierro férrico, Fe^{3+} . Este tiene la capacidad de cambiar entre una forma y otra por medio de reacciones redox, son estas las que lo hacen vital para la vida y le dan la capacidad de actuar en sistemas biológicos. Entre sus funciones principales está actuar como transportador de oxígeno, como cofactor de metalo-enzimas además tiene un rol importante en la inmunidad innata participando en la regulación de las células fagocíticas. Pero es esta misma habilidad de participar en reacciones redox lo que lo hacen altamente peligroso, pues al cambiar entre uno estado y otro se forman radicales libres y especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés reactive oxygen species – ROS). Estas son citotóxicas y pueden causar daño oxidativo a macromoléculas, como peroxidación de lípidos, oxidación de aminoácidos, fragmentación de proteínas y daños al ADN. A largo plazo pueden causar problemas más severos como cáncer y diabetes. (Hershko,2007; Kolb, 2008; Marx,2002).La generación de este hierro tóxico se ejemplifica en la Figura No. 2.

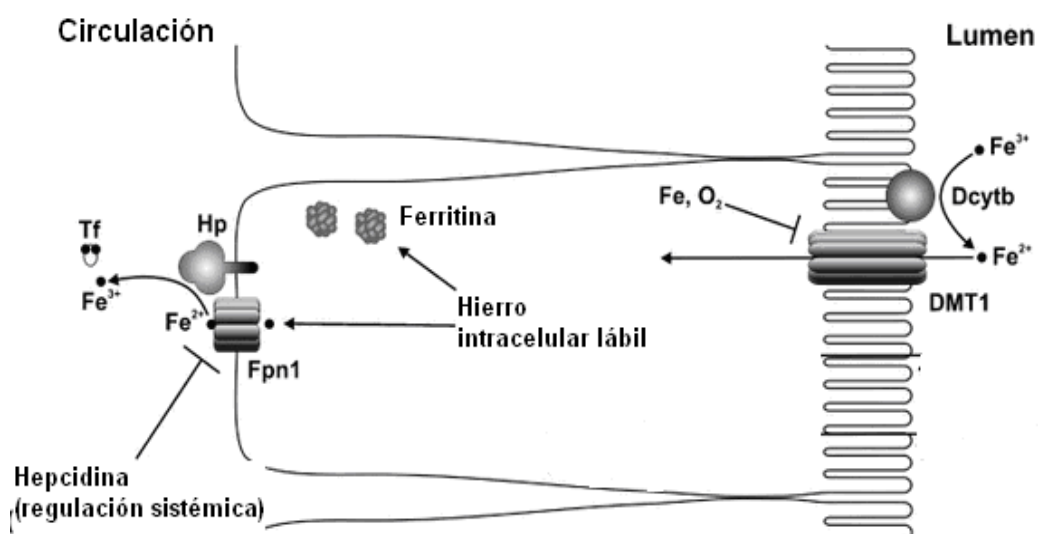
Figura 2. Formas moleculares tóxicas de hierro en el plasma. Pueden derivarse de un exceso de absorción de hierro, una liberación excesiva del sistema de macrófagos, suplementación con hierro o liberación patológica de hierro de ligandos seguros como ferritina y hemoglobina.



(Tomada de Marx, 2002).

Una de las principales fuentes de hierro es el de la dieta que se absorbe en el intestino por medio del enterocito. El mecanismo de absorción se detalla en la Figura No. 3. El mecanismo de absorción y transporte del hierro es altamente regulado para prevenir la formación de hierro tóxico. Las proteínas de transporte previenen que el hierro pueda participar en reacciones redox y que presente sus propiedades de oxidante, la principal proteína de transporte es la transferrina. La transferrina hace al ión férrico soluble, pues su solubilidad en soluciones fisiológicas es casi nula, y lo transporta a órganos o tejidos. Se utiliza 2/3 del hierro absorbido para eritropoyesis y el resto es almacenado como ferritina. (Breuer, 2000a; Ezquer, 2006; Hershko, 2007; Kolb, 2008; Marx, 2002; van der A, 2006).

Figura No. 3. Absorción del hierro por el enterocito. El hierro de la dieta es reducido en el borde de cepillo del enterocito por medio de la reductasa férrica, Dcytb, antes de ser transportado a la célula vía DMT1. Los niveles de oxígeno y las reservas de hierro pueden alterar la expresión de las proteínas de transporte, DMT1. El hierro que no es utilizado inmediatamente se almacena como ferritina, al ser necesitado este se exporta a la circulación a través de la ferroportina (FPN1), en la membrana basolateral. Una vez en la circulación para lograr la unión del hierro a la transferrina se necesita una oxidasa férrica, en este caso la hepaestina (Hp). El receptor de transferrina (TfR1) detecta la saturación de la transferrina con hierro y permite una regulación de la expresión de la proteína DMT1. La hepcidina, es una hormona reguladora secretada por el hígado según el estado férrico, esta se une a la FPN1 causando su internalización y subsecuente degradación, previniendo que el hierro salga de la célula. La proteína de hemocromatosis humana (HFE) regula la expresión de hepcidina y la interacción entre el receptor de transferrina y la transferrina; regulando así la absorción de hierro. (Borch-Iohnsen, 2009; Fuqua, 2012; Muñoz, 2009).



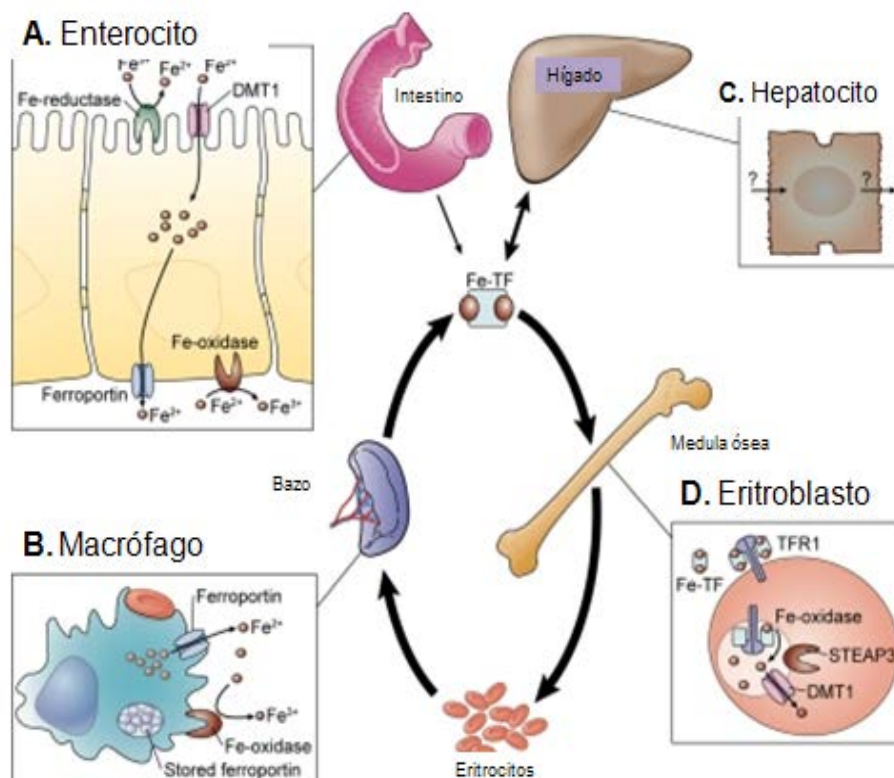
(Modificada de Fuqua, 2012).

El hierro plasmático en personas saludables se mantiene a niveles menores que los niveles de saturación de la transferrina, los cuales son alrededor del 20-30%. Esto permite una regulación de hierro bastante precisa en el organismo. Por el contrario si existe una alta carga con hierro cierta cantidad de este hierro va a ligarse débilmente a otras proteínas o aminoácidos, los ligandos más comunes del hierro aparte de la transferrina son el citrato y a albúmina, o bien va a quedar como hierro libre en el torrente sanguíneo. Todas estas formas del hierro son altamente peligrosas por las propiedades oxidantes que presentan. Es por lo mismo que existe un mecanismo de control entre la concentración de hierro citosólico y la formación de proteínas que regulan la absorción y el almacenamiento de hierro. Este mecanismo de regulación se puede observar en la Figura No.3, donde se observan que existen receptores de transferrina los cuales van a determinar la saturación de ésta con hierro y van a regular la expresión de las proteínas transportadoras de la membrana DMT1. Una baja saturación va a indicar que existen bajos niveles de hierro, lo que induce la síntesis de más proteínas de transporte, para aumentar la concentración de hierro sérico y viceversa. Además de esto existe la expresión de la proteína HFE β la cual es una proteína atípica del complejo de histocompatibilidad mayor y tiene un rol en el transporte y homeostasis del hierro. Bajo condiciones normales este mecanismo de control y la expresión de esta proteína previenen la acumulación de hierro citosólico lábil tóxico; pero dicho mecanismo no es suficiente bajo condiciones patológicas o en personas con administración de dosis altas de hierro. La suplementación con hierro resulta en la formación de radicales hidroxilo tóxicos y pérdida de actividad enzimática. (Breuer, 2000a; Ezquer, 2006; Hershko, 2007; Kolb, 2008; Marx, 2002; van der A, 2006).

Una segunda fuente de hierro es el hierro de los macrófagos (ver Figura No.4), debido a que destruyen a eritrocitos por estar atrofiados, tener cierta madurez o por la tasa del remplazo. Los macrófagos tienen reservas de hierro, las cuales son expulsadas al torrente sanguíneo por medio de la ferroportina en forma ferrosa; esta debe ser transformada a su forma férrica para poder ligarse a la transferrina y llegar a los diferentes órganos o tejidos donde sea necesario. (Ezquer, 2006; Hershko,2007; Kolb, 2008; Marx,2002).

El hierro ya unido a la transferrina es transportado a la médula ósea, en donde el complejo hierro-transferrina entra en contacto con el eritroblasto por medio del receptor de membrana TFR1, permitiendo que el hierro pueda entrar a la célula y pueda utilizarse para la formación de la hemoglobina de los eritrocitos. Este proceso de absorción y transporte de hierro se ejemplifica en la Figura No.4.

Figura No.4 Fuentes, absorción y transporte de hierro. Se muestra el ciclo por el cual el hierro es absorbido por el enterocito u obtenido de los macrófagos para poder unirse a la proteína transportadora transferrina y ser llevada a hígado para su almacenamiento o a la médula ósea para la formación de eritrocitos. Se muestra como un ciclo ya que el hierro utilizado para la formación de los eritrocitos es recuperado cuando estos eritrocitos son fagocitados y destruidos por los macrófagos y este hierro vuelve a estar disponible para su uso.



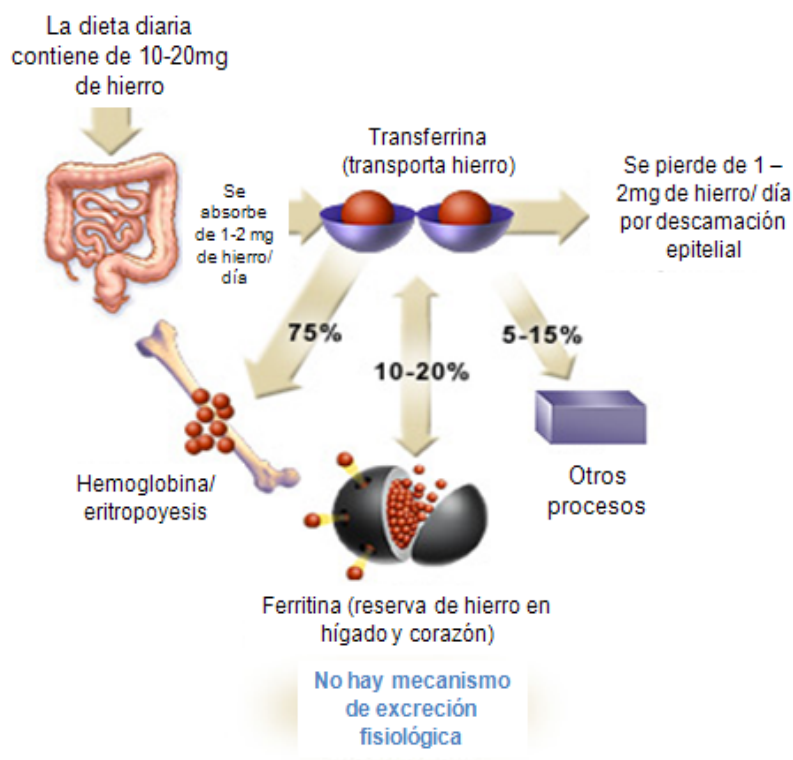
(Tomada de Nature, 2008).

Cuando se tiene una cantidad de hierro mayor a la necesaria para la producción de eritrocitos este forma reservas en el hígado, llamadas ferritina. Estas moléculas tienen una estructura globular en la cual el hierro es atrapado y guardado, una molécula de ferritina puede contener hasta 40,000 átomos de hierro almacenados. La ferritina se va a sintetizar en respuesta a la cantidad de hierro celular disponible, previniendo una intoxicación por exceso de hierro. La ferritina se utiliza cuando no se está absorbiendo lo suficiente como para cumplir con las necesidades del organismo. Esta puede agotarse casi por completo sin que se presente una anemia, y puede llegar a ser hasta 20 veces mayores a lo normal sin causar un daño tisular. La absorción del hierro dependerá del consumo de alimentos que tengan hierro altamente biodisponible y se va a regular por las necesidades para la

producción de eritrocitos y las pérdidas que se puedan presentar. (Ezquer, 2006; Hershko, 2007; Kolb, 2008; Marx, 2002).

Existen dos maneras de pérdida de hierro corporal, la primera es por descamación epitelial la cual es proporcional a la cantidad absorbida diariamente. La segunda es por pérdidas sanguíneas. Pero ninguna de las anteriores constituyen una ruta para la excreción de hierro del cuerpo, por lo que las células deben controlar los niveles de hierro por combinación de mecanismos constitutivos (transduccionales) e inducibles (transcripcionales). (Ezquer, 2006; Hershko, 2007; Kolb, 2008; Marx, 2002). La ruta de absorción, distribución y eliminación del hierro se muestran en la Figura No.5.

Figura No. 5 Ruta de absorción, distribución y eliminación del hierro. Como se observa en condiciones normales, 10% del hierro es absorbido en el intestino, del cual 75% es utilizado para eritropoyesis, entre 10-20% es almacenado y el resto se utiliza para otros procesos. Aún cuando no existe mecanismo de excreción de hierro del organismo, la misma cantidad que se absorbe al día se pierde por descamación del epitelio intestinal.



(Tomada de CDC.gov, 2012).

En la actualidad se han caracterizado muchas proteínas involucradas en la regulación del transporte y absorción celular de hierro. La formación de proteínas regulatorias de hierro en respuesta a niveles de hierro citosólico en condiciones normales previenen acumulación de hierro citosólico lábil tóxico. (Hershko,2007) Pero el mecanismo de protección de estas proteínas puede no ser suficiente en situaciones como:

1. Condiciones hereditarias asociadas con función anormal de una o varias proteínas regulatorias de hierro, lo cual puede causar acumulación anormal de hierro (hemocromatosis). (Hershko,2007)

2. Anemia "ligada a hierro" hereditaria o crónica adquirida asociada con sobredosis de hierro causado por aumento inapropiado de absorción de hierro y transfusiones sanguíneas (anemia sideroblástica). (Hershko,2007)

3. Envenenamiento agudo con hierro que causa una desregulación en el mecanismo de absorción de hierro. (Hershko,2007)

4. Administración de dosis profilácticas de hierro causando daño a organelos. Se presenta una toxicidad aguda hacia el hierro. (Hershko,2007)

B. Anemia

El estado de hierro debe mantenerse en balance, un exceso de hierro puede favorecer el crecimiento y la patogenicidad de microorganismos. El hierro tiene un papel central en la interacción entre el hospedero y el patógeno (virus, bacterias y protozoarios), creando una batalla entre el hospedero y el patógeno para su obtención. Por otro lado un déficit en el estado de hierro va a disminuir las funciones del huésped, principalmente la inmunidad, ver Figura No. 4. (Prentice, 2008).

Existe una patología en cuanto a la cantidad de eritrocitos saludables en circulación, la cual se puede deber a una alta tasa de destrucción o bien una baja producción de eritrocitos. La cual se diagnostica por la cuantificación hemoglobina, una proteína que transporta oxígeno, y hematocrito, cuantifica la cantidad de glóbulos rojos en relación al volumen plasmático total. La anemia es un problema nutricional de alta importancia en Guatemala, tiene varias causas entre las que se pueden mencionar: problemas hereditarios, infecciones, exposición a ciertas toxinas o medicamentos, y deficiencias nutricionales de hierro, siendo esta última la mayor causa de los casos de anemia, alrededor de un 50%. Las

deficiencias nutricionales están directamente relacionadas con los niveles de desnutrición en Guatemala. (Bunn, 2011)

Guatemala tiene la tasa más alta de desnutrición crónica en Latinoamérica y el sexto lugar a nivel mundial, según la UNICEF. Un 49% de la niñez se ve afectada por desnutrición crónica. La prevalencia se duplica en niños mayas con un 69.5%, vs. niños no mayas con un 35.7%. Un 63% de la población experimenta desnutrición aguda. La desnutrición aguda es tres veces mayor cuando las madres no tienen educación formal y cuando los embarazos se dan muy seguidos. (Desnutrición infantil (Crónica y aguda) en Guatemala, 2008).

La principal deficiencia nutricional es de hierro, está se debe a que existe una diferencia entre la cantidad de hierro disponible para absorción y un aumento en las necesidades de hierro y las reservas de hierro están vacías. En Guatemala la principal causa es la dieta la cual combina dos factores: primero, el bajo consumo de fuentes de hierro altamente biodisponible (como lo son el pescado y la carne) y segundo alto consumo de inhibidores de la absorción de hierro (como taninos, polifenoles y calcio presentes en el café y las tortillas). Otra causa que se puede mencionar es la alta cantidad de infecciones parasitarias que causan pérdidas sanguíneas. La población principalmente afectada son niños menores de 5 años por problemas en la ingesta alimenticia. Así como mujeres en edad reproductiva, quienes tienen pérdida sanguínea por el periodo menstrual, y mujeres embarazadas ya que ellas no solo deben cumplir con sus necesidades de hierro si no también con las del feto en desarrollo. Otro problema de alto impacto en Guatemala es la tasa de embarazos, causando que las mujeres no terminen de recuperar sus reservas de hierro normales cuando debe comenzar a suplir las de un nuevo feto en desarrollo. (Bunn, 2011). (Desnutrición infantil (Crónica y aguda) en Guatemala, 2008).

La presencia de anemia va a influir en la cantidad de hierro que se absorbe. Una persona con anemia por deficiencia de hierro absorbe alrededor de 20mg de hierro por el contrario una persona con deficiencia de hierro pero sin anemia absorbe únicamente entre 1-2mg. (Meltzer, 2010).

C. Daño peroxidativo inducido por el hierro

El hierro libre en el torrente sanguíneo tiene la habilidad de cambiar entre sus formas químicas por medio de reacciones redox, pero al oxidarse o reducirse forma radicales libres de hidroxilo y oxígeno. Una forma de controlar la formación los radicales libres altamente reactivos formados a partir del hierro es por medio de antioxidantes celulares y plasmáticos o bien modular la disponibilidad del hierro y permitir que se den únicamente los roles

fisiológicos de los radicales libres seguros. Además del hierro los organelos celulares, la mitocondria y los peroxisomas, producen ROS. Los niveles de las ROS se mantienen controlados por reacciones que los convierten en subproductos no tóxicos. En algunos casos se pueden generar cantidades de ROS citotóxicas, principalmente por problemas inflamatorios o estrés. Un exceso de ROS puede causar daño oxidativo a las macromoléculas entre los que se puede mencionar peroxidación de lípidos, oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos (principalmente cisteína), formación de enlaces cruzados entre proteínas y oxidación del esqueleto carbonado de los polipéptidos causando en fragmentación de proteínas, daño al ADN y rupturas en la cadena de ADN. Esto a largo plazo puede causar enfermedades como cáncer, diabetes, problemas cardiacos, entre otros. (Halliwell, 1992; Hershko,2007).

Se ha demostrado en estudios con ratas *in vivo* que la suplementación con hierro causa la formación de radicales hidroxilo tóxicos y la pérdida de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria. (Kadiiska, 1995) Esto se puede deber a distintos mecanismos entre los que encontramos:

1. Los radicales libres pueden causar un daño peroxidativo a los componentes lipídicos de la membrana mitocondrial ya que están formados por una alta cantidad de ácidos grasos polinsaturados. Este daño puede impedir el funcionamiento de la cadena respiratoria (Richter, 1995).

2. La actividad enzimática se puede perder por una modificación en las proteínas (principalmente el grupo amino de la lisina y los grupos sulfhidrilos) o un grupo aldehído reactivo formado a partir de la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados se va a unir covalentemente a las proteínas (Houglum, 1990).

3. Los aminoácidos se pueden convertir en derivados carbonilos lo que puede llevar a una pérdida de su actividad catalítica y hacerlos susceptibles a degradación proteolítica. Esta conversión se da por especies reactivas de oxígeno formadas por la unión del Fe (II) al sitio de unión de metales de una enzima de la cadena respiratoria y subsiguiente reacción con H₂O₂ (Stadtman, 1990).

La formación de los radicales libres puede verse como un ciclo en donde la pérdida de actividad de las enzimas de la cadena respiratoria va a causar una reducción incompleta del oxígeno molecular, formando así mayor cantidad de radicales libres. (Heales, 1995; Pitkainen, 1996; Zager, 1996).

D. Formación de hierro no ligado a transferrina (NTBI) en el torrente sanguíneo

Los mecanismos de absorción, transporte, metabolismo y almacenamiento de hierro por las células están altamente regulados por las necesidades y pérdidas. Asimismo todos estos mecanismos están controlados y balanceados por la producción de las proteínas necesarias. La proteína encargada del transporte del hierro, que es absorbido en el intestino, es la transferrina; ésta es encargada de llevar el hierro a los órganos donde va a ser utilizado o bien al hígado donde va a ser almacenada por la ferritina. El organismo tiene un sistema de regulación por retroalimentación negativa, en donde al detectar bajos niveles de saturación de la transferrina con hierro se induce transcripcionalmente la producción de una mayor cantidad de proteínas transportadoras de membrana que van a permitir una mayor absorción del hierro.(Breuer, 1996; Hershko, 2007; Klausner, 1993; Rothman, 1992). Sin embargo en situaciones de inflamación los niveles de hierro sérico van a aumentarse artificialmente ya que va a afectar la regulación del metabolismo de hierro y la eritropoyesis. Además va a existir una interacción entre el hierro y la producción de citocinas y radicales de oxígeno (Breuer, 2001; Gosriwatana, 1999). El control y la regulación de todos estos mecanismos va a mantener constantes los niveles de hierro, es decir si no hay consumo de fuentes de hierro altamente biodisponible se van a utilizar las reservas de ferritina, si por el contrario se consume una fuente con alta cantidad de hierro se va a absorber únicamente lo necesario para llenar las reservas y cumplir con las necesidades de formación de eritrocitos el resto no va a entrar al enterocito. Pero existen casos en donde se da una suplementación masiva de hierro, en la que los mecanismos del cuerpo no son suficientes para regular la absorción. Un alto porcentaje de este hierro va a ser absorbido pero no va a poder unirse a la transferrina ya que esta alcanza sus niveles de saturación y va a permanecer como hierro libre no ligado a transferrina (que por sus siglas en inglés es non transferrin bound iron NTBI). Además de la suplementación masiva existen condiciones patológicas como la talasemia, donde se forma NTBI; lo que sucede en este caso es que cierta cantidad del hierro derivado del catabolismo de los eritrocitos llega como NTBI al torrente sanguíneo, debido a una eritropoyesis inefectiva. Existen tratamientos con agentes quelantes de hierro, que son drogas que pueden pasar la membrana citoplasmática y llegar al hierro libre formado.(Breuer, 1996; Hershko,2007; Klausner, 1993; Rothman, 1992).

El NTBI es una forma de hierro sérica lábil y potencialmente tóxica asociado con un desbalance en el metabolismo del hierro. El NTBI ocurre tanto en sobrecarga con hierro (suplementación), como en enfermedades hereditarias, pacientes con hemodiálisis y alcohólicos. Éste puede ser atrapado por queladores de hierro como deferoxamina y deferiprone. (Breuer, 2001; Gosriwatana, 1999).

Se ha determinado por distintos métodos la presencia de hierro lábil quelable en pacientes con una sobredosis de hierro. Este NTBI, como ya se mencionó, va a participar en las reacciones redox con mayor facilidad ya que no se encuentra unido a ninguna proteína y por lo mismo va a propiciar la formación de radicales libres hidroxilo. Estos radicales pueden causar peroxidación de lípidos de la membrana. Se ha demostrado que la absorción de NTBI va a aumentar cuando existe una alta concentración de hierro en los tejidos, es decir no existe un mecanismo de regulación para la absorción de NTBI. (al-Refaie, 1992; Hershko, 2007; Porter, 1996; Randell, 1994; Wagstaff, 1985).

Bajo condiciones normales, la transferrina sérica está saturada entre 20-35% con hierro y es la forma mayoritaria de hierro no-unido al grupo hemo en el plasma. Normalmente la capacidad de unión de la transferrina es suficiente para secuestrar a todo el hierro inorgánico que entra a la circulación. Pero en algunas situaciones en donde se tiene una sobre carga de hierro, no todo el hierro sérico se une a transferrina. El NTBI se cree que ocurre en pacientes con altas cargas de hierro, capaz de sobre pasar la capacidad de unión de la transferrina o en pacientes con enfermedades crónicas como talasemia o hemocromatosis. (Breuer, 2001; Gosriwatana, 1999).

El NTBI es una forma tóxica del hierro en el organismo y ha sido asociado con daño miocardial y hepático. El daño al miocardio solo se presenta en pacientes con un aumento en la saturación de transferrina y niveles altos de NTBI. El daño hepatocelular se presentó únicamente en pacientes con hemocromatosis y talasemia y se evidenció por niveles elevados en el suero de alaninaaminotransferasa (ALT). Estos hallazgos apoyan el concepto de Jensen *et al.* 2003 que dice que el aumento de hepatotoxicidad y daño miocardial está asociado con la expansión de la cantidad de hierro lábil quelable. (Hershko, 2007; Jensen, 2003; Le Lan, 2005).

Existen otros ligandos del hierro además de la transferrina como citrato, fosfato y albúmina, estos se unen más débilmente al hierro por lo que tiene una mayor predisposición de catalizar reacciones redox que el hierro unido a transferrina y puede dar lugar a formación de especies de oxígeno reactivas que pueden causar daño oxidativo. Así mismo el hierro unido a estos ligandos no tiene una regulación tan rigurosa como el unido a transferrina por lo que da una mayor predisposición a una sobrecarga de hierro (Breuer, 2001; Gosriwatana, 1999).

E. Propiedades del NTBI

En cuanto al origen del NTBI, es una fracción de hierro en la circulación, el cual pudo entrar ya sea directamente del sitio de absorción intestinal o por medio de reciclaje de eritrocitos viejos por los macrófagos, en donde se da una degradación incompleta. Dicha fracción aparentemente no logra unirse a la transferrina y queda libre en la circulación. Se puede formar intracelularmente y liberarse luego de las células con sobrecarga de hierro. Si se tiene una suplementación con hierro existe la posibilidad que el NTBI sea transitorio en corto plazo en los pacientes y que en muestras sucesivas no se obtenga nada. (Breuer, 2000; Breuer, 2000a).

El NTBI en el plasma se refiere a hierro unido a otros ligandos que no sea la transferrina, es una forma tóxica del hierro que puede causar daño oxidativo y junto con otros factores estrés oxidativo. La presencia de hierro no ligado a transferrina (NTBI) es patológica, es decir una persona quien tiene las reservas de hierro adecuadas y no está bajo ningún tratamiento de hierro no debería presentarlo. En la mayoría de los casos la aparición del NTBI es precedido o acompañado en un aumento en la saturación de transferrina, lo cual indica una alta liberación de hierro a la circulación, es decir en pacientes con sobrecarga de hierro en donde se pudo inclusive haber sobrepasado la capacidad de unión de la transferrina. Para detectar esto se puede determinar la saturación de transferrina en donde una alta saturación persistente (mayor al 80%) va a indicar una sobrecarga de hierro. También se puede encontrar en pacientes sin saturación total de la transferrina, lo que indica que es una fracción de hierro en una forma que no puede unirse directamente o no es accesible a la transferrina, como lo pueden ser complejos polisacáridos coloidales. Si estos complejos se logran procesar por macrófagos y liberar el hierro, este ya se vuelve accesible a la transferrina, esta fracción del NTBI no tiene potencial reactivo es benigno pero puede ser activado *in vivo* por diversos mecanismos desde algo tan simple con suplementación de vitamina C. Esto último se da principalmente en pacientes con hematomatosis o pacientes que están teniendo diálisis. El tener concentraciones de NTBI detectables indica que existe una alta liberación de hierro al plasma que sobrepasa el uso o bien que existe una acumulación de hierro extra hepática, es decir hay un desbalance en el metabolismo del hierro. Dicho desbalance se puede deber a falta de transferrina o bien a una alta saturación de la transferrina, en ambos casos disminuyendo la capacidad de unión al hierro (Breuer, 2000; Breuer, 2000a; van der A, 2006).

El NTBI es relevante por distintos factores: es un blanco para queladores de hierro, es un indicador del estado férrico y es un factor causante de sobrecarga de hierro en diversos tejidos ya que se encuentra en circulación, entre las patologías que puede causar están

disfunción cardíaca se da oxidación de las lipoproteínas de baja densidad lo que puede ser un elemento clave para el desarrollo de aterosclerosis, disfunción hepática y endócrina. Es importante mencionar que la absorción del NTBI a las células no está regulado, por lo que si existe un exceso este puede ser internalizado por las células y movilizado entre los lisosomas, causando una sobrecarga de hierro celular (Breuer, 2000; Breuer, 2000a).

Cualquier condición patológica o tratamiento que produzca carga de hierro a corto o largo plazo puede potencialmente formar NTBI. A largo plazo puede ser por repetidas transfusiones o hiperabsorción de la dieta y a corto plazo por suplementación con hierro, desbalance de metabolismo de hierro se da principalmente en pacientes con quimioterapia. (Breuer, 2000a)

La composición del NTBI va a variar según el grado de sobrecarga con hierro, la fuente de hierro y si existen o no tratamientos con queladores. En general se puede decir que es heterogéneo, es decir tiene varias fracciones (Breuer, 2000; Breuer 2000a) entre las que se encuentran:

1. Fracción con actividad redox y quelable: Llamada hierro plasmático lábil (por sus siglas en inglés LPI - lábil plasma iron). Es considerado lábil ya que es intercambiable con otros metales y entre ligandos. Es patológico pues permite que el hierro traspase membranas celulares de manera no regulada por medio del cambio de ligandos e ingrese a los órganos donde es potencialmente dañino. Esta fracción es potencial a causar daño oxidativo al tejido hepático, pancreático y cardíaco y componentes plasmáticos, ya que está accesible y puede entrar a la célula y generar ROS. Aún cuando componentes plasmáticos como el citrato, ácido úrico y la albúmina pueden afectar sus niveles es un indicador fiable del contenido total de NTBI, siendo así un marcador de sobrecarga con hierro. Niveles altos prolongados de esta fracción pueden dañar la función de los órganos y causar la muerte tisular. Tiene la propiedad de trascolarse por las membranas celulares de manera no regulada lo que causa una acumulación en el hígado, corazón y páncreas. (Cabantchik, 2005)

- a. Fracción eLPI (por sus siglas en inglés enhanced lábil plasma iron), se utiliza un agente movilizante que no causa liberación del hierro unido a la transferrina, como citrato y albúmina. De esta manera se determina la fracción de NTBI unida sin actividad redox, pues estos ligandos funcionan como antioxidantes séricos. La concentración obtenida con el movilizante (eLPI) es un indicador del NTBI total. En adultos la concentración de eLPI es casi despreciable a comparación de la concentración LPI por lo que la concentración de LPI se puede utilizar como total. En niños la concentración eLPI es mayor que LPI, esto

indica que los niños tienen alta actividad de antioxidantes séricos como parte de sus propiedades plasmáticas pero estas se van perdiendo de manera dependiente de la edad. (Breuer, 2012).

2. En complejo con ligandos orgánicos pequeños. Existen varios métodos para la detección de las formas con actividad redox del hierro. No hay un estándar de oro y los resultados van a depender del ensayo. Entre los métodos más usuales está el utilizar quelantes o agentes movilizantes para obtener el contenido total de NTBI. En el 2012 Breuer *et al.* presentaron un nuevo método para determinar la fracción LPI el cual tiene un alto desempeño, se detecta la fracción LPI directamente y una segunda fracción eLPI en la que se utiliza un agente movilizante, para determinar el NTBI sin actividad REDOX de ligandos. Ambas fracciones son las principales del NTBI y se complementan para determinar el contenido total de NTBI. Existe necesidad de determinar cuál es el más exacto y reproducible pues se sabe que algunos tienden a subestimar los niveles de NTBI. Cada método va a medir distintas características del NTBI, algunos miden la actividad redox del hierro sérico y otros el NTBI quelable. (Jacobs, 2005). Los métodos más usuales de cuantificación son:

a. Utilizar un agente movilizante para el NTBI y separar el hierro quelado por filtración. Se detecta por métodos de espectroscopia, es confiable pero muy laborioso. (Jacobs, 2005).

b. Movilizar y detectar en la misma mezcla, en este caso no es necesario separar el hierro de las proteínas séricas. Entre estos se encuentran:

1) Método bleomicina: Es un antibiótico con propiedades queladoras de hierro se utiliza para formar un complejo con el NTBI. El complejo bleomicina-hierro genera radicales reactivos en presencia de un agente reductor fuerte como el ascorbato. El ascorbato tiene un rol doble: movilizar el NTBI y como agente reductor. La concentración de radicales producida va a ser proporcional a la concentración del complejo bleomicina- hierro y se cuantifica agregando un sustrato oxidable como el ADN donde sus productos de oxidación se pueden determinar por un ensayo colorimétrico. Un problema de este método es que la medición es indirecta y se puede ver afectada por otras sustancias en el suero (Breuer, 2000a; Jacobs, 2005).

2) Detección con sonda de fluorescencia: Se utiliza fluoresceína marcada con fluorescencia (FI-aTf). Estas sondas son altamente sensibles y utilizan métodos de detección muy simples; lo que las hace potenciales para análisis diario de alto número de

muestras. Detecta NTBI movilizado por oxalato, pues se une a los complejos oxalato-hierro con alta afinidad y no extrae el hierro de la transferrina. Se detecta la disminución en fluorescencia cuando el NTBI está presente al compararlo con suero sin NTBI. Se afecta por la turbidez y color del suero (Breuer, 2000a; Jacobs, 2005).

Existen obstáculos en la cuantificación de NTBI entre estos se puede mencionar que los queladores a utilizar tomen el hierro de la transferrina y ferritina. Otro problema puede ser que los queladores o agentes movilizantes faciliten la transferencia de NTBI a transferrina causando una disminución de la concentración de NTBI, lo que se puede evitar si se bloquea la transferrina no ligada a hierro (Breuer, 2000a; Jacobs, 2005).

El estudio de Jacobs, 2005 determinó que el método más apropiado es el que utiliza sonda de fluorescencia con oxalato como agente movilizante, galio como bloqueador y la señal de fluorescencia es dada por FI-aTf. Debido a que este presenta la mayor variación entre muestras lo que significa que tiene alta capacidad de detección, baja variación entre muestras lo que lo hace más reproducible y muestra un aumento en la concentración de NTBI por aumento en saturación de transferrina.

Se han analizado las mismas muestras utilizando un método igual pero en diferentes laboratorios y se han encontrado resultados diferentes lo cuales puede deberse a diversas fuentes de error como contaminación ambiental, de reactivos o de materiales, también el utilizar distinta marca del lector de fluorescencia, en la preparación de los reactivos utilizando el mismo método o bien utilizar diferentes técnicas para la preparación de la curva de calibración. La diferencia entre los métodos puede deberse al uso de distintos queladores o que existen diferentes isoformas de NTBI y cada uno detecta una diferente que puede no ser la mayoritaria pues esta va a depender del grado de la sobrecarga con hierro y el modo de la misma. (Jacobs, 2005).

El NTBI puede utilizarse como advertencia temprana de sobrecarga de hierro y tiene la ventaja que permite diferenciar entre anormalidades del metabolismo de hierro y patologías no relacionadas con el hierro. Además puede utilizarse como indicador de estado férrico. (Breuer, 2000a).

F. Hierro sérico como determinante de absorción de hierro y su relación con NTBI

Existen varios mecanismos que regulan la absorción de hierro, uno de estos es la eritropoyesis, el cual se ve afectado por la formación de células rojas y es independiente de las reservas de hierro totales. La regulación de la absorción, utilización, liberación y almacenaje del hierro ocurre a nivel génico, la hepcidina se considera elemento clave para regular el balance de hierro. (Meltzer, 2010).

Para medir la absorción de hierro se puede utilizar cambios en hierro sérico, que va a indicar cambios en la concentración de hierro circulantes, sin embargo el hierro sérico no es indicativo de las reservas de hierro. Existen diferentes indicadores de las reservas de hierro, como la transferrina y la ferritina, pero estos tienen deficiencias. La transferrina tiene alta variabilidad y baja sensibilidad y la ferritina se puede elevar artificialmente por inflamación (Breuer, 2000a; Hoppe, 2004; van der A, 2006).

Para lograr un cambio de concentración de hierro sérico que tenga una diferencia significativa a la concentración basal, se necesita suplementar con una dosis farmacológica de hierro. Las dosis de hierro bajas no tienen potencial de inducir cambios en el hierro sérico de sujetos con reservas de hierro normales. Para causar un cambio los sujetos deben tener cierto grado de deficiencia y por lo mismo mayor habilidad de absorción de hierro (Hoppe, 2004).

La relación dosis-respuesta muestra una desviación cuando se ha absorbido un 100% del hierro, esto se puede deber a que conforme se da la absorción, se disminuye la concentración de hierro en el lumen, lo que hace más difícil para los transportadores de hierro (DMT1) en las células mucosas de detectar, atraer y transportar el hierro dentro del enterocito. (Hoppe, 2004).

La relación que existe entre el hierro sérico y el NTBI es directamente proporcional, dicha relación se debe a que el NTBI es una fracción del hierro sérico. En donde a mayor concentración de hierro sérico mayor será la concentración de NTBI. Se ha encontrado que si la concentración de hierro sérica es muy baja no se produce NTBI, siendo esto lo deseado. Con base en experimentos *in vitro* se ha demostrado que una sobrecarga con hierro que causa un aumento en la concentración de hierro sérico está relacionado con un aumento de NTBI (Brissot, 2012; Loréal, 2002). Se ha demostrado que el NTBI tiene una correlación fuerte con la cantidad de hierro absorbida. (Hutchinson, 2004; Schümann, 2007).

G. Efectos del hierro en la mitocondria

La mitocondria utiliza aproximadamente un 90% del oxígeno inhalado y es aquí donde se forman las especies reactivas de oxígeno entre los que encontramos superóxido, peróxido de hidrógeno y los radicales de hidroxilo estos se forman como metabolitos fisiológicos de la cadena respiratoria. Es por esto que se dice que la mitocondria tiene un rol primario en la patogénesis del daño peroxidativo (Hershko, 2007; Richter, 1995).

La peroxidación de lípidos de la membrana mitocondrial va a causar una modificación en la fluidez, alterando el transporte de solutos y de iones lo que puede llevar a una inflamación y lisis mitocondrial. La oxidación de los ácidos grasos polinsaturados mitocondriales (PUFAs) forma productos hidroperóxidos que causan modificaciones más drásticas en las propiedades funcionales de la mitocondria. Estos hidroperóxidos también actúan en la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria, por medio de la oxidación de nucleótidos de piridina se abren los poros de Ca^{2+} en la membrana mitocondrial interna. La pérdida mitocondrial de Ca^{2+} va a causar una pérdida de energía y está asociada con daños mitocondriales severos. La liberación de calcio de la mitocondria se ha observado en estudios *in vivo* con ratas alimentadas con hierro en donde se dio una inducción de la reacción lipoperoxidativa la cual se encontraba asociada con la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria. Se obtuvo una mejora en el ciclo del Ca^{2+} por la inducción de liberación de Ca^{2+} de mitocondrias tratadas con hierro, este proceso disipa energía para reacumular el Ca^{2+} liberado en la mitocondria. (Al-Nasser, 1986; Crompton, 1988; Hershko, 2007; McKnight, 1996).

La toxicidad del hierro celular va a depender de varios aspectos y no únicamente de la concentración a la que se encuentre. (Hershko, 2007). Entre los variables que van a afectar la toxicidad del hierro se pueden mencionar:

1. La reducción del hierro que forma como productos secundarios radicales hidroxilo. (Hershko, 2007)
2. El ácido ascórbico es un antioxidante a altas concentraciones pero a bajas concentraciones promueve la peroxidación de lípidos inducida por hierro. Una suplementación de esta a personas con reservas superiores de hierro puede acelerar el desarrollo de enfermedades cardíacas. (Hershko, 2007)
3. El α -tocoferol es un antioxidante natural que va a detener la peroxidación de lípidos de membrana iniciados por radicales libres y va a interferir con la peroxidación de lípidos inducida por hierro en los liposomas. (Hershko, 2007)

4. La deferoxamina, un quelante de hierro, va a remover el hierro directamente de células cardíacas y va a inhibir la peroxidación de lípidos. Además revierte las anomalías en la contracción y ritmo celular inducidos por el hierro. (Hershko, 2007)

Un aumento en la cantidad de hierro libre catalíticamente activo en la mitocondria, que puede ser formado por una sobredosis de hierro o bien por condiciones patológicas, es el responsable de la toxicidad del hierro. Las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial son un blanco de esta toxicidad asociada a la formación de radicales libres. Las mitocondrias tienen un rol central en el metabolismo de energía y presentan una gran cantidad de transportadores de membrana, un daño a estas va a causar una disminución en la producción de ATP, va a alterar la homeostasis de Ca^{2+} . Esto va a conllevar a daños celulares y por consiguiente necrosis (Hershko, 1987; Hershko, 2007; Link, 1989).

Estudios de la actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial por Bacon *et al.* 1993 en hígados de ratas con sobredosis de hierro han mostrado niveles bajos de succinato-citocromo c reductasa, citocromo c oxidasa y ATP, así como una disminución en el consumo de oxígeno. Los estudios de Ceccarelli *et al.* 1995 demostraron que niveles de hierro hepático libre en ratones con sobredosis de hierro aumenta la peroxidación de lípidos y un proceso cíclico de disipación de energía mitocondrial ligado a Ca^{2+} , el cual puede ser responsable por una disminución en el contenido de ATP mitocondrial.

Estudios en células cardíacas de ratas con dosis altas de hierro han mostrado una pérdida en la actividad de succinato deshidrogenasa, NADH-ferricianatoreductasa, succinatoubiquinonaoxidoreductasa, succinato citocromo c oxidoreductasa y rotenone-sensitiva NADHcitocromo c oxidoreductasa. Estos datos demuestran que las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial son el blanco principal de la toxicidad del hierro tanto en el corazón como en el hígado (Hershko, 2007; Link, 1998; Zhang, 1990).

Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* por una serie de investigaciones que el hierro causa fragilidad de la membrana lisosomal, que conlleva a una pérdida del estado lisosomal latente y un aumento de la actividad de la enzima libre. (Hershko, 2007; Link, 1993; Mak, 1985)

H. Envenenamiento ocasionado por hierro

Al estudiar los cuadros clínicos de pacientes que presentan envenenamiento con hierro se puede deducir cual es la toxicidad del hierro. Entre estos se observa claramente el daño mitocondrial peroxidativo. El consumo accidental de una sobredosis de hierro es la causa

mayoritaria de muerte por intoxicación de niños menores de 6 años. La muerte se ha presentado desde consumir 200mg de hierro hasta 5,850mg de hierro. Una dosis tóxica se considera al consumir más de 50mg/kg de peso. Existen 4 estados clínicos del envenenamiento de hierro y para prevenir la muerte el tratamiento se debe empezar de inmediato. (Hershko, 2007; Stein, 1976).

1. Se da después de la ingestión, el hierro se encuentra en el intestino. Se presentan vómitos y diarrea. En algunos casos puede involucrar pérdida sanguínea intestinal debido a necrosis hemorrágica y ulceración de la parte superior del intestino. Luego de esto se da un colapso circulatorio por la alta cantidad de hierro en el torrente sanguíneo lo que causa una pérdida de la conciencia. Se presenta NTBI en el suero. Aumenta el escape capilar y hay pérdida del fluido intestinal causando hipovolemia, acidosis metabólica y perfusión cerebral. La causa de la muerte es hipovolemia, se puede evitar por reemplazo de fluido. Se debe eliminar el hierro del intestino induciendo vómitos o por lavado gástrico. (Hershko, 2007)

2. En la segunda fase se da una falsa estabilidad y el paciente recupera la conciencia. Los niveles de hierro plasmático disminuyen ya que hay baja captación celular. (Hershko, 2007)

3. La tercera etapa es causada por toxicidad de hierro intracelular y es la más crítica. El hierro cataliza daño peroxidativo de la membrana interna de la mitocondria, lo que interrumpe la cadena respiratoria mitocondrial. Asimismo se disminuye la síntesis de ATP lo que produce disfunción celular y muerte tisular. Se desarrolla hipotensión entre 2 a 5 días después de la ingesta de hierro. Se presenta disfunción de órganos severa principalmente el hígado, el corazón y el cerebro. Hay un fallo hepático fulminante con hipoglucemia, coagulopatía y acidosis metabólica agravada. Este curso de eventos es fatal. (Hershko, 2007)

4. Rara vez se presenta, se desarrollan obstrucciones intestinales (Hershko, 2007). Las principales causas de muerte son fallo del hígado, coagulopatía y shock. Las consecuencias clínicas de envenenamiento con hierro se manifiestan en horas y los efectos de sobrecarga de hierro se observan después de varios años de acumulación de hierro gradual; pero ambos son similares. Después de romper los mecanismos de defensa natural, cantidades tóxicas de hierro se entregan como NTBI y se acumulan en los órganos vitales (hígado y corazón) ambos con una alta cantidad de mitocondrias. Causando un daño peroxidativo a la membrana interna de la mitocondria. Esto conlleva a una pérdida de producción de ATP y la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} (Hershko, 2007; Singhi, 2003).

I. Efectos de suplementación profiláctica con hierro y ácido fólico

Este trabajo se inició debido a un estudio realizado en África del Sur, específicamente la isla de Pemba en Zanzibar, la cual es un área con altas prevalencias de anemia, un 75% de la población, y es endémica de malaria. El estudio se llevó a cabo con niños de hasta 35 meses de edad, a los cuales se suplementó con hierro y ácido fólico para tratar la anemia. A los niños participantes no se les realizó un tamizaje previo a la suplementación para determinar sus reservas de hierro, esto causó que se incluyeran a niños con buenas reservas de hierro. La suplementación en estos niños causó un aumento en la hospitalización y en la tasa de mortalidad de los niños. Razón por la cual el estudio fue suspendido antes de lo previsto. (Sazawal, 2006).

Los investigadores buscaron explicación de que era lo que estaba sucediendo en estos niños y obtuvieron cuatro teorías de porque el hierro libre es dañino para el huésped y favorece al patógeno:

1. El hierro libre va a inhibir la absorción de zinc lo que va a comprometer la respuesta inmune hacia la infección con malaria. (Sazawal, 2006).

2. Propicia el crecimiento del patógeno intracelular. Se ha comprobado que una limitación del hierro metabólicamente activo en las células invadidas por el patógeno va a inhibir el crecimiento del patógeno. (Sazawal, 2006).

3. El hierro libre bloquea indirectamente la síntesis de óxido nítrico, ya que inhibe transcripcionalmente la sintasa de óxido nítrico (iNOS). Si no hubiera hierro libre en la célula se da una estimulación del interferón normal que aumenta la síntesis de óxido nítrico (NO) y que mata al patógeno. (Sazawal, 2006).

4. Se ha comprobado que el hierro libre es esencial para la multiplicación de bacteria. (Sazawal, 2006).

Así mismo encontraron estudios en pacientes con Hepatitis C en los que un exceso de depósitos de hierro en el hígado va a disminuir la respuesta del interferón y que la sobrecarga con hierro da progresión de la enfermedad. (Sazawal, 2006).

Por lo que se cree que lo que sucede es que en niños con reservas normales de hierro todo el hierro suplementado va a permanecer como hierro libre el cual va a ser utilizado por el parásito para hacerse más fuerte y esto sería lo que causó la muerte de los niños. (Sazawal, 2006).

De este estudio los investigadores concluyen que únicamente los niños que presenten anemia por deficiencia de hierro van a beneficiarse de la suplementación y que se debe evaluar el área previo a la suplementación pues en áreas endémicas de malaria la suplementación puede presentar un riesgo y no un beneficio para los sujetos. (Sazawal, 2006).

J. Riesgo de agravar la infección de malaria por administración de hierro

Con los estudios realizados hasta el momento se ha demostrado que los patógenos intracelulares requieren de hierro para su crecimiento y para aumentar su patogenicidad, comprobando así que el hierro es esencial para la supervivencia del parásito de la malaria. (Hershko, 2007)

El trofozoito intraeritrocítico se encuentra en una vacuola y obtiene sus nutrientes al ingerir el citoplasma del eritrocito incluyendo la hemoglobina por medio de un citostoma. La hemoglobina del huésped se degrada en la vacuola de alimentos del parásito y el grupo hemo liberado en este proceso se polimeriza para formar hemozoina. Así mismo el parásito toma nutrientes directamente del medio extracelular por un ducto parasitóforo. Por lo que se cree que el hierro se puede derivar ya sea de los eritrocitos del huésped o del ambiente extracelular, siendo la segunda menos probable (Cuadro No. 1 y No. 2.), asimismo se cree existe una influencia de las condiciones férricas del huésped que van a modificar la fuente de hierro que el parásito utilice. (Aikawa, 1988; Hershko, 2007; Pollack, 1988; Pouvellé, 1991).

Cuadro 1 Fuente probable de hierro esencial para malaria. Se mencionan las razones por las que se cree que la utilización de hierro del medio extracelular es poco probable.

Los receptores de transferrina no se expresan en eritrocitos maduros parasitados.
Ausencia de hierro ligado a transferrina no interfiere con el crecimiento del parásito. El patógeno no utiliza hierro ligado a transferrina.
Sobre-dosis de hierro con NTBI no tiene efecto en la severidad de malaria en una rata modelo con <i>P. berghei</i> .

(Obtenido de Hershko, 2007)

Cuadro 2 Utilización de hierro derivado del grupo hemo. Se mencionan las razones por las que se cree que el parásito utiliza hierro derivado de los eritrocitos del huésped obtenidos por medio del cistosoma del parásito.

El grupo hemo, con altas cantidades de hierro, es liberado de la hemoglobina por proteólisis en la vacuola de alimentación.
Uso directo del hierro lábil intracelular en los eritrocitos del huésped.

(Obtenido de Hershko, 2007)

Otra potencial fuente de obtención de hierro, es por el metabolismo de eritrocitos decadentes lo cual provee hierro circulante que se une a la transferrina, esto es realizado por los macrófagos. La infección con malaria va a quebrantar la homeostasis de hierro y va a desencadenar una respuesta inflamatoria asociada con la producción de citocinas, óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno; todas estas van a afectar la manera en que los macrófagos obtienen y almacenan el hierro. (Hershko, 2007; Mulero, 2005). La expresión de citocinas va a ser modificada por el estado de hierro, una deficiencia de hierro va a aumentar la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-4, por lo que se dice que la deficiencia de hierro tiene un efecto protector en la malaria. Además se ha determinado que la respuesta de citocinas en malaria es diferente a la de cualquier otra infección y que los niveles de las citocinas proinflamatorias en niños con malaria son mayores que en adultos, explicando porque esta es más severa en niños. El balance entre citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias va a determinar la severidad de la reacción inflamatoria y la manera en la que se manipula el hierro por el macrófago. (Hershko, 2007; Jason, 2001; Nyakeriga, 2004; Nyakeriga, 2005).

A partir de estudios *in vivo* en ratas infectadas con *P. bergheise* determinó que el hierro intracelular lábil derivado del catabolismo del grupo hemo quelable es utilizado por el parásito, por lo que se cree que al usar queladores se agota este hierro, dándole la acción antimalárica a los queladores de hierro, su mecanismo de acción es la inhibición reversible de la reductasaribonucleotidasa, que a su vez inhibe la síntesis de ADN. La infección con malaria se ha tratado de controlarla utilizando queladores de hierro pero no ha sido exitoso. Se realizó un estudio más para comprobar la hipótesis anterior, en donde se monitoreo la concentración del hierro lábil en eritrocitos parasitados y no parasitados utilizando una sonda fluorescente sensible a hierro, calceína. Se determinó a partir de este estudio que la cantidad de hierro lábil era menor en eritrocitos parasitados que en no parasitados, lo que lleva a pensar que este hierro lábil es usado o almacenado durante el crecimiento del

parásito. (Gabay, 1993; Hershko, 2007; Loyevsky, 1999; Nyholm, 1993; Sánchez-López, 1992; Tsafack, 1996).

Por lo anterior mencionado se cree que el parásito de malaria utiliza el hierro obtenido por el catabolismo del eritrocito del huésped y se ha demostrado que ni la deficiencia de hierro ni la suplementación con este tiene efectos en la severidad de la malaria, ya que no modifica la disponibilidad de hierro para el parásito. Lo que indica que el parásito es independiente del estado férrico del huésped. Pero se cree que existe un efecto adverso de la suplementación de hierro en malaria, para lograr comprender esto se deben analizar los mecanismos de defensa del huésped y las razones de porque algunas infecciones con malaria van a ser más severas que otras. (Hershko, 2007)

Según estudios realizados la suplementación con hierro oral en países no endémicos con malaria no aumenta el riesgo de la infección. Un estudio realizado en Nepal, una región sin malaria, la suplementación no aumento el riesgo de mortalidad y mostró un efecto protector, aunque no estadísticamente significativo, hacia la diarrea, disentería y enfermedades respiratorias agudas. (Tielsch, 2006). Sin embargo si el área es endémica de malaria el riesgo de contraerla puede aumentar hasta un 50%. En un estudio en Zanzíbar, región endémica de malaria, se mostró un aumento en el riesgo de mortalidad después de la suplementación con hierro, además se presentaron efectos adversos en sujetos no anémicos donde la suplementación era innecesaria y aparentemente dañina. (Sazawal, 2006). Así mismo se demostró un mayor riesgo en personas con inmunidad suprimida y quienes son suplementados con dosis altas de hierro sin tener necesidad fisiológica lo que causa un exceso de hierro libre. (Gera, 2002; Hershko, 1993; Hershko, 1998; Hershko, 2007; Oppenheimer, 2001). La deficiencia de hierro *per se* limita la severidad de la respuesta inflamatoria, pero se puede volver más severa si se administra hierro de manera no-selectiva, es decir a personas que no lo necesitan. Por lo que se cree que el NTBI puede tener un rol central en los efectos dañinos del hierro en la malaria.

K. Diferencias entre sexo y reservas de hierro

Es necesario hacer énfasis en que existe diferencia entre sexo, por lo que conducir estudios experimentales por separado es necesario. En el pasado solo se utilizaba a hombres y los resultados se consideraban representativos en general (mujeres, niños), pues ésta era la única información disponible. Pero se han encontrado una gran cantidad de factores biológicos, que influyen la cinética bajo el control directo de hormonas sexuales y no biológicos, que hacen posible que hombres y mujeres respondan diferente. Así mismo se cree que cada ión tiene un mecanismo específico de acción que va a causar las diferencias

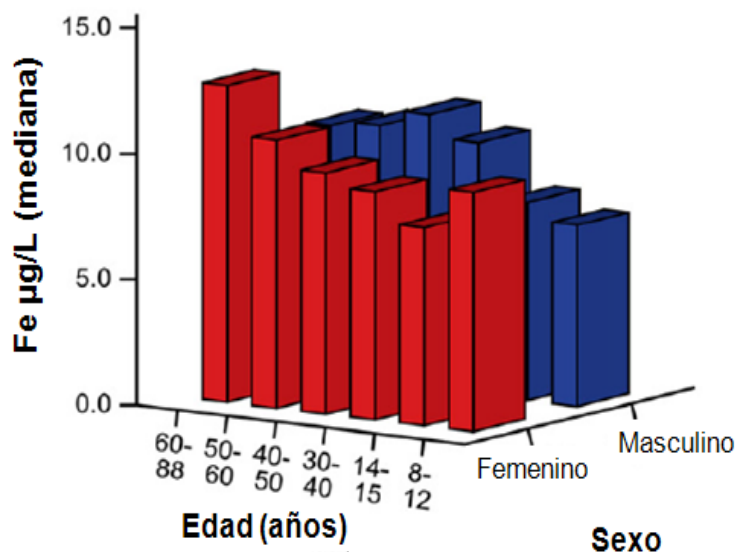
entre sexo, por regulación hormonal y daño dirigido. Se han realizado diversos estudios para ver el efecto del sexo en las concentraciones de distintos metales (Rahman, 2011; Vahter, 2007a). Se han reportado diferencias en los metales tóxicos y elementos por sexo, edad, fumar y estado nutricional. (Rahman, 2011; Vahter, 2007).

Un aumento en la concentración de metales tóxicos indica mayor absorción gastrointestinal, que sucede a deficiencia de micronutrientes como es el caso de reservas de hierro inferiores. Se sabe que cuando existen reservas de hierro inferiores, lo cual es más común en mujeres que en hombres (Figura No. 6), se regula positivamente el transportador de metales divalentes (DMT1) en el intestino, el cual aumenta la absorción de hierro y otros metales divalentes como el manganeso, cadmio. Durante el embarazo las necesidades de hierro aumentan lo que causa una regulación positiva en DMT1. Esto conlleva a un mayor riesgo por parte de las mujeres a tener niveles elevados de metales tóxicos, los cuales se absorben paralelos al hierro. (Kippler, 2009; Kippler, 2010; Rahman, 2011).

Entre los elementos básicos y esenciales se encuentra el hierro, junto con el calcio, magnesio, zinc, manganeso, molibdeno y selenio. Todos estos son necesarios en determinadas cantidades y tienen funciones biológicas importantes como cofactores de enzimas importantes para procesos biológicos como fosforilación oxidativa, regulación génica y homeostasis de radicales libres. Los niveles de estos elementos esenciales influyen en la absorción y la toxicidad de metales. Niveles bajos de algunos de estos, como el hierro, pueden contribuir a absorción de metales tóxicos, pero un exceso puede tener propiedades tóxicas y puede tener efectos negativos en varios sistemas (urinario, nervioso, cardiovasculares). (Meltzer, 2010; Rahman, 2011).

El patrón general es que las mujeres tienen una concentración mayor de metales tóxicos, por ejemplo de manganeso se ha reportado que las mujeres tienen mayores concentraciones que los hombres a cualquier edad, esto sugiere que existe una diferencia biológica en el metabolismo. Así como deficiencia de elementos básicos y esenciales, por ejemplo para el hierro la deficiencia o reservas inferiores son más comunes en mujeres (17%), que en hombres (6%), esto se puede observar en la Figura No. 6. En cuanto a hombres se ha reportado que tienen concentraciones normales de elementos básicos y esenciales, lo que a su vez disminuye la absorción de metales tóxicos (Rahman, 2011). Una de las principales causas de lo anterior es que las mujeres tienen un consumo menos frecuente de comidas nutritivas y esto es combinado con baja ingesta de energía lo que las vuelve más vulnerables a deficiencia de micronutrientes. (Rahman, 2011).

Figura No. 6. Diferencia de hierro sérico entre hombres y mujeres en diferentes rangos de edad. Se puede observar que las mujeres tienen un patrón de menores concentraciones de hierro hasta llegar al rango de edad 50-60, en donde comienzan a igual a los hombres. Esto se debe a que ya no están en etapa reproductiva y han pasado la etapa de la menopausia.



(Tomada de Berglund, 2011)

La ferritina es el mejor y más ampliamente utilizado indicador de las reservas de hierro e indicador de sobrecarga. Se ha reportado que presentar reservas de hierro inferiores va a afectar la absorción y transporte de metales divalentes. Se ha encontrado que mujeres con deficiencia de hierro tienen concentraciones altas de manganeso, cobalto y cadmio, dando una idea que las reservas de hierro inferiores pueden afectar la cinética de algunos iones metálicos. (van der A, 2006; Meltzer, 2010).

El determinar que las células tenían un transportador común de metales (DMT1) ayudó a comprender la relación existente entre la absorción de los metales divalentes. El DMT1 se localiza en la superficie apical del enterocito, es un transportador acoplado a protones de iones metálicos transmembranario. Está regulado positivamente por restricción de hierro o aumento en la demanda del mismo, es decir deficiencia de hierro, causando un aumento en la absorción de hierro y por lo mismo en las concentraciones. Pero no solo transporta el hierro si no también manganeso, cadmio, cobalto, cobre, níquel, plomo y zinc. El DMT1 se encuentra principalmente en el duodeno, cerebro, riñón y reticulocitos. La relación de

absorción de metales divalentes es que a reservas de hierro inferiores se va a aumentar la expresión de DMT1, lo cual afecta la absorción de los demás metales (Berglund, 1994; Kippler, 2007; Kippler, 2009; Meltzer, 2010; Tallkvist, 2001; Vahter, 2007; Vahter, 2007a).

Las reservas de hierro inferiores son un indicador de absorción aumentada de otros iones metálicos divalentes. Se ha reportado que a concentraciones de ferritina menores de 12mg/L existe concentración elevada de manganeso, cobalto y cadmio. La asociación encontrada para todos los casos es inversa y muy fuerte, lo cual comprueba que existe un mecanismo de absorción común, probablemente mediado por DMT1 y ferroportina 1 (FPN1). Se ha demostrado que a bajas concentraciones de hierro estos metales compiten con el hierro por un sitio de unión común en el transportador DMT1 (Berglund, 1994; Kippler, 2007; Kippler, 2009; Meltzer, 2010; Tallkvist, 2001; Vahter, 2007; Vahter, 2007a). En resumen la concentración de manganeso, cobalto y cadmio es mayor en mujeres que en hombres, esto debido a una mayor absorción por las reservas de hierro inferiores. (Kippler, 2007; Vahter, 2007a).

Aún cuando se ha reportado que el cobre es transportado también por DMT1 no se encontró asociación entre la concentración de cobre con las concentraciones de ferritina. (Meltzer, 2010). En cuanto al plomo existen diferentes datos, se ha dicho que no existe asociación entre este y la concentración de ferritina (Meltzer, 2010), otros estudios demuestran que absorción gastrointestinal de plomo se incrementa a reservas de hierro inferiores. (Vahter, 2007). Sucede lo mismo con el zinc algunos estudios han reportado que no existe asociación entre la concentración de este y la concentración de ferritina (Meltzer, 2010), pero otros estudios han demostrado que la deficiencia de zinc aumenta el hierro intracelular y disminuye los niveles de mRNA de DMT1. El zinc regula el DMT1 y FPN1 en el intestino, la región promotora 5' del DMT1 contiene elementos responsivos a metal (MREs), al cual el factor de transcripción de respuesta a metales (MTF-1) se une de manera dependiente del zinc. Por lo que la deficiencia de zinc no aumenta el transporte de metales tóxicos por DMT1, pero una concentración elevada de zinc aumenta los niveles de mRNA y proteína de DMT1 y FPN1 en las células intestinales (Kippler, 2007; Kippler, 2009). Una tercera investigación prueba que la deficiencia de zinc aumenta la absorción de metales tóxicos. (Rahman, 2011).

Se ha comprobado que las diferencias de estado férrico entre hombres y mujeres desaparecen luego que las mujeres pasan la etapa de la menopausia, después de dicha etapa las reservas de hierro aumentan considerablemente igualando a los hombres (Vahter, 2007). Esto se muestra gráficamente en la Figura No. 6.

En este caso se utiliza un método para cuantificar NTBI en el suero, para la cuantificación se utiliza apotransferrina marcada con fluoresceína, que pierde la fluorescencia después de unirse al hierro. Es simple, altamente sensible y detecta el NTBI que se encuentra en el suero con baja saturación de transferrina. Ya que el NTBI no está disponible para la detección se moviliza con oxalato 10mM. La apotransferrina se bloquea con galio (III) 0.1mM, que se une a la apotransferrina marcada pero no elimina su fluorescencia ni interfiere en la unión con el hierro. La fluorescencia se determina después de 1 hora utilizando un fluorómetro con lector de placas ELISA. (Breuer, 2001; Gosriwatana, 1999).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Métodos

1. Sujetos de Estudio.

a. Definición de la población: La población para el estudio fueron todos los habitantes de Escuintla a los que se tenía acceso por medio de los colaboradores de CARITAS, de esta población se tomó una muestra de 40 sujetos. Se trabajó en conjunto con los colaboradores de dicha institución para lograr reclutar a los sujetos de estudio que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión establecidos. Para ejecutar el tamizaje se realizaron viajes de campo a las aldeas de Escuintla donde se encontraban los potenciales sujetos de estudio, al encontrarlos estos eran convocados a una única participación experimental en CARITAS de Escuintla. Este proceso fue realizado por el equipo de investigación de CeSSIAM.

b. Tipo de muestra y muestreo. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, pues no todos los sujetos de la población de Escuintla tenían la misma posibilidad de ser elegidos y se eligieron según los criterios de inclusión de la investigación, su disponibilidad para participar en el estudio, las reservas de hierro que presentaron y las necesidades del estudio, es decir si faltan sujetos con niveles superiores de hierro y en el tamizaje se encuentra a un sujeto con niveles de hierro bajos este no se incluyó en la investigación pues este grupo ya estaba completo. Se incluyeron sujetos únicamente de las aldeas donde CARITAS y el Centro de Salud tienen colaboradores y solamente personas con las que estos colaboradores tienen un contacto directo, por lo que se dice es un muestreo no probabilístico. Una vez identificados los sujetos de estudio y con un consentimiento informado se pudo comenzar con el tamizaje.

c. Tamaño de muestra. La muestra con lo que se trabajó fue de 40 sujetos, siendo 10 hombres con reservas inferiores de hierro ($<30 \mu\text{g/dL}$) y 10 hombres con reservas superiores de hierro ($>70 \mu\text{g/dL}$); así como 10 mujeres con reservas inferiores de hierro ($<30 \mu\text{g/dL}$) y 10 mujeres con reservas superiores de hierro ($>70 \mu\text{g/dL}$). Este número de muestra se calculó a partir de la calculadora del departamento de estadística de la Universidad de British Columbia, Canadá. La cual está disponible en línea en www.stat.ubc.ca/rollin/stats/ssize/n2.html. Se utilizó un alfa de 0.05, un poder 0.80 y una prueba de dos colas. Se utilizó la media de los cambios en la concentración de NTBI al ser suplementados con sulfato ferroso de una investigación anterior (17.3) y la desviación estándar de esta media (12.7). Con esto se obtuvo un tamaño de muestra de 9 sujetos, ya

que en estudios anteriores se han utilizado 10 sujetos de estudio y estos han demostrado resultados significativo se decidió utilizar diez sujetos de estudio. Este estudio no pretendía verificar prevalencia de ninguna condición metabólica si no caracterizar el cambio en las concentraciones de hierro no ligado a transferrina en respuesta a administración profiláctica de sulfato ferroso y las diferencias que existen entre hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores y superiores.

d. **Selección de muestra.** La selección de la muestra fue realizada por el grupo de investigación de CeSSIAM. Ellos trabajaron en conjunto con CARITAS Escuintla, que colaboraron en este proceso indicando posibles sujetos dispuesto a participar en el proyecto. CARITAS cuenta con colaboradores en las distintas aldeas de Escuintla, fueron ellos quienes se comunicaron con los pobladores de dicha aldea para ver si existían voluntarios. Una vez encontró a un grupo de voluntarios ellos se comunicaron con CeSSIAM para que se llegara a realizar el tamizaje a la aldea. Durante este tamizaje se buscaba verificar si los posibles sujetos de estudio cumplían con los criterios de inclusión y exclusión y podían formar parte de la fase experimental. Para ser incluidos en el tamizaje todos los sujetos debían firmar un consentimiento informado y si se comprobaba que cumplían con los requerimientos del estudio, CeSSIAM se contactaba con los sujetos para confirmar que estuvieran dispuestos a seguir en la investigación. Así mismo se trabajó en colaboración con un Centro de Salud en la Ciudad de Guatemala, quienes también ayudaron a identificar voluntarios que pudieran cumplir con los criterios de inclusión y exclusión establecidos. Una vez se identificaban estos potenciales sujetos de estudio el equipo de investigación se dirigía a un lugar de reunión donde se explicaban los objetivos y el procedimiento. Por medio del tamizaje se seleccionaron los sujetos que se encontraban dentro de cada uno de los grupos establecidos y fue con ellos con quienes se continuó el estudio.

e. **Consentimiento informado.** Una vez las personas se seleccionaron en las reuniones se explicó que la participación era voluntaria, se realizó un pre-tamizaje por el análisis de los 3 aspectos físicos que son indicadores la palidez de la palma de mano, color debajo de las uñas y la conjuntiva del ojo. Este es un método verificado por Romero-Abal, 1995 y además previno la toma innecesaria de muestras sanguíneas. A las personas seleccionadas se les extrajo una muestra de sangre para realizar el tamizaje en el laboratorio clínico del Hospital Nuestra Señora del Pilar, los métodos utilizados para dicho tamizaje se describen a detalle adelante. Antes de dicha extracción se le leyó a cada participante el primer consentimiento informado y se les explicó cualquier duda que surgió; se preguntó si estaba de acuerdo con las condiciones, de ser afirmativa su respuesta se les pidió que firmaran o pusieran su huella en el consentimiento y

se procedió a la extracción de la muestra sanguínea. Según los resultados de este tamizaje, los sujetos de estudio que estuvieron dentro de uno de los cuatro grupos deseados se les pidió su colaboración para seguir con el estudio y se citaron para continuar. Antes de continuar con el estudio se leyó un segundo consentimiento informado donde se explicaba en qué consistía la segunda etapa del experimento y se les pidió que lo firmaran si estaban de acuerdo con las condiciones explicadas. En la sección de ANEXOS se muestran los consentimientos que se les dieron a los sujetos de investigación. Este proceso se realizó por el equipo de investigación de CeSSIAM.

f. Criterios inclusión Para poder ser parte del estudio los sujetos debieron de firmar o poner su huella (si no sabían escribir) en el consentimiento escrito y aceptar las condiciones. Se comprometieron a no consumir alcohol 24 horas previas al estudio y no fumar durante el día que se realizó. Para la selección de los sujetos de estudio con reservas de hierro inferiores ($<30 \mu\text{g/dL}$) se examinó que cumplieran con las características observables deseadas que eran palidez en palma de mano, color debajo de la uña y conjuntiva de ojo. En cuanto a mujeres se buscaba que estuvieran en edad reproductiva, ya que por la pérdida sanguínea del periodo menstrual las reservas de hierro suelen ser bajas. Para la selección de los sujetos de estudio con reservas de hierro superiores ($>70 \mu\text{g/dL}$) se determinó la robustez de la persona y en mujeres que fueran postmenopáusicas. Los sujetos de estudio, tanto hombres como mujeres, debían ser mayores de edad y aparentemente sanos.

g. Criterios exclusión. No se incluyeron en el estudio personas alcohólicas, que padezcan enfermedades crónicas, anemias de grado terapéutico o que tengan cualquier dificultad en proporcionar la muestra de sangre.

h. Reclutamiento. Los sujetos de estudio se reclutaron en una reunión a la que se convocaron por medio de un Centro de Salud en Guatemala y de CARITAS en Escuintla donde se explicaron los objetivos del estudio y procedimientos. La participación de todos los sujetos de estudio fue voluntaria. Se tomó un grupo de 35 hombres del cual se seleccionaron 10 hombres con reservas de hierro inferiores ($<30 \mu\text{g/dL}$), este fue el grupo más difícil de reclutar pues es raro que los hombre tengan niveles de hierro bajos, y 10 hombres con reservas de hierro superiores ($>70 \mu\text{g/dL}$). Este reclutamiento se realizó según características explicadas en criterios de inclusión.

Para la selección de 10 mujeres con reservas de hierro inferiores se trabajó con mujeres edad reproductiva, ya que por la pérdida sanguínea del periodo menstrual las

reservas de hierro de estas mujeres suelen ser inferiores ($<30 \mu\text{g/dL}$) y para encontrar mujeres con reservas de hierro superiores ($>70 \mu\text{g/dL}$) se trabajó con mujeres postmenopáusicas.

Una vez se encontraron a los candidatos, tanto hombres como mujeres, se tomó una muestra de sangre de 5mL, para realizar un tamizaje y determinar si realmente estas personas estaban dentro de uno de los grupos de estudio. Al reclutarlas 10 personas de cada sexo con las reservas de hierro deseadas, es decir los 40 sujetos de estudio, se continuó a la siguiente etapa. El proceso de selección de sujetos de estudio se detalla en la Figura No.7

Figura No. 7. Diagrama de flujo para el reclutamiento de los sujetos de estudio. Se detallan los pasos realizados para poder encontrar a los sujetos de estudio.



2. **Aprobación ética:** El grupo de investigación de CeSSIAM presentó un protocolo para la aprobación del proyecto al comité de ética de la misma institución. Se explicó en qué consistía el proyecto y todo el procedimiento a seguir con los sujetos de estudio. Este protocolo fue revisado por el Institutional Review Board – IRB de CeSSIAM, el cual es un comité designado para aprobar, monitorear y revisar investigaciones biomédicas que involucren a humanos, este comité realizó un análisis de riesgo-beneficio para determinar si la investigación debe llevarse a cabo. Dicho comité aprobó el proyecto ya que el estudio no presenta un peligro grave para los sujetos de estudio ya que se administrará una única dosis de sulfato ferroso. La dosis administrada en el estudio es menor (100mg) a la que el MSPAS administra (120mg) como prevención de la anemia. Los sujetos de estudio que participaron recibieron una compensación monetaria, la cual únicamente cubre sus gastos de traslado.

3. Diseño, enfoque y tipo de investigación

a. **Diseño.** Experimental prospectivo pues quiere determinar si existe mecanismos de defensa hacia dosis profilácticas de hierro en mujeres con reservas de hierro normales.

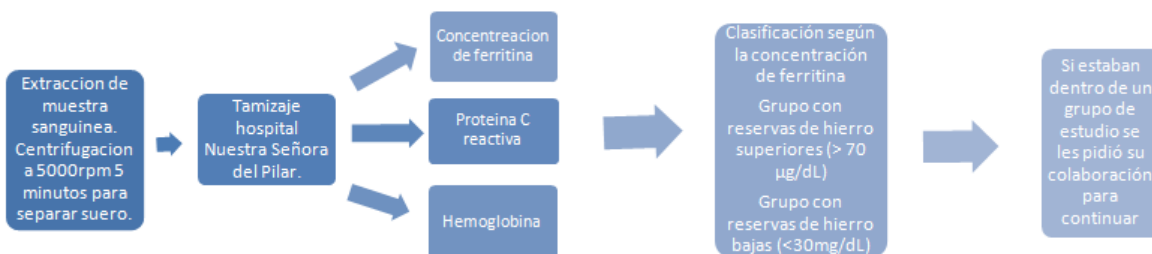
1) **Tipo de experimento.** Este estudio es un pre – experimento ya que no se cuenta con aleatorización de los sujetos, estos se seleccionan por conveniencia, aunque existe un control, donde los sujetos son su propio control.

b. **Enfoque.** Cuantitativo ya que los datos obtenidos del análisis fluorométrico son numéricos.

c. **Tipo de Investigación.** Correlacional nos da la relación entre dos variables donde se busca la asociación existente. En este caso es la relación entre el cambio de concentración de NTBI por el tratamiento con sulfato ferroso en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores y superiores.

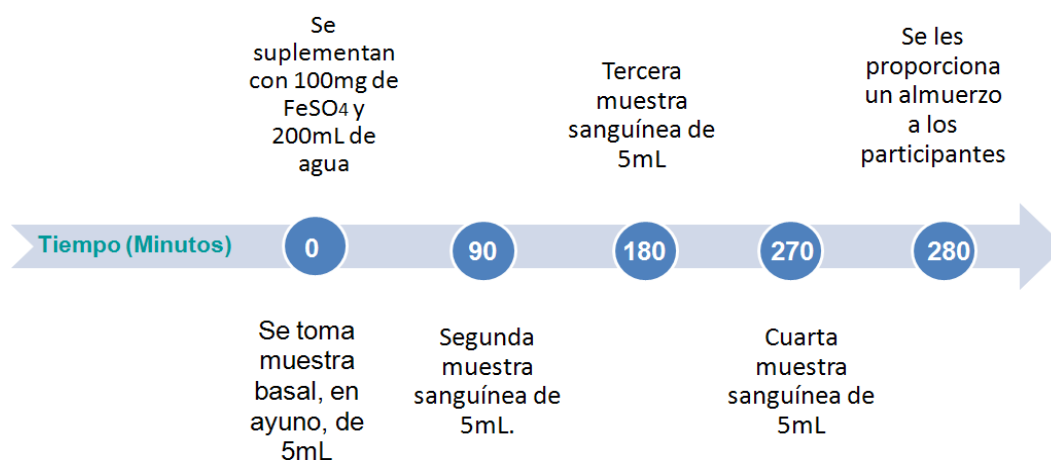
d. **Fase I: Tamizaje.** Una vez se encontraron a los candidatos, tanto hombres como mujeres, se tomó una muestra de sangre de 5mL, para realizar un tamizaje y determinar si realmente estas personas estaban dentro de uno de los grupos de estudio. El tamizaje se realizó en el Laboratorio Clínico de Nuestra Señora del Pilar por la Licda. Isabel Massanet de Ramírez. Para el tamizaje se siguieron los métodos descritos a continuación
cuantificación de hemoglobina se realizó en un analizador hematológico automatizado CELL-RUBY, Ruby™, Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA, Proteína C Reactiva (PCR) por medio de turbidimetría y Ferritina Sérica se analizó por electroquimioluminiscencia (Axim, Roche). Los exámenes que se realizaron fueron cuantificación de hemoglobina el cual es un examen que sirve para determinar la presencia de anemia en los posibles sujetos de estudio. Proteína C reactiva para determinar que no exista un proceso inflamatorio que artificialmente eleve los valores de hierro y ferritina la cual sirve para determinar las reservas de hierro. Se clasificaron según la concentración de ferritina obtenida dentro del grupo con reservas de hierro superiores (>70 µg/dL) o el grupo con reservas de hierro inferiores (<30mg/dL), los sujetos que no se encontraban dentro de ninguno de estos grupos fueron descartados por no cumplir con los criterios de inclusión. Los puntos de corte de las reservas de hierro se seleccionaron siguiendo un criterio arbitrario. Al reclutar al menos 10 personas de cada sexo con las reservas de hierro deseadas, es decir los 40 sujetos de estudio, se continuó a la siguiente etapa. El proceso de tamizaje se detalla en la Figura No.8

Figura No. 8. Diagrama de flujo para el tamizaje de los posibles sujetos de estudio. Se detallan los pasos realizados para el tamizaje.



e. **Fase II: Intervención.** El proceso de intervención de los sujetos de estudio fue realizado por el equipo de investigación de CeSSIAM, esto se realizó en Septiembre, 2011. Para el presente estudio se utilizaron las muestras de suero previamente recolectadas e identificadas con un código numérico sin ninguna identificación personal. Una vez se reclutaron todos los sujetos de estudio, se acordó un día con todos para que llegaran a CeSSIAM entre 8:00 – 8:30am. Las personas conocían de antemano que para esta segunda fase se requería que permanecieran aproximadamente 5 horas en el lugar acordado y debieron llegar con al menos 12 horas de ayuno. Al llegar todos los participantes se les tomó una muestra basal en ayunas siendo esta la primera muestra sanguínea de 5mL en el tiempo cero. Esta se utilizó para tener niveles de comparación y se considera el control. Después de esto se les suplementó oralmente con 100mg de sulfato ferroso (FeSO_4) acompañado de 200mL de agua, se utilizó la misma cantidad para todos los sujetos pues la suplementación no es dependiente del peso del sujeto, al momento de tomar la suplementación se anotó la hora para cada persona pues se tenían minutos de diferencia. Se monitoreó la respuesta a esta suplementación durante cuatro horas y media por medio de la concentración de hierro no ligado a transferrina, la concentración de hierro sérico, los niveles de transferrina en el suero y la saturación de esta. Esto se logró por la toma de tres muestras sanguíneas más de 5mL cada una, a los 90, 180 y 270 minutos después de la suplementación. Después de la extracción de sangre del tiempo 180 minutos los sujetos recibieron un refrigerio ligero y después de la última muestra (270 minutos) se les proporcionó un almuerzo. Este proceso de suplementación se esquematiza en la Figura No. 9

Figura No. 9 Proceso de suplementación. Los sujetos de estudio fueron reunidos en CeSSIAM, ellos se presentaron a tempranas horas de la mañana en ayuno para poder empezar con el proceso. Antes de empezar con la tomas de muestra fue necesario que los sujetos de estudio leyeran, entendieran y estuvieran de acuerdo con el consentimiento informado indicándolo al firmarlo. Luego de esto los sujetos permanecieron durante las cuatro horas y media en las instalaciones de CeSSIAM, finalmente se les proporcionó un almuerzo para poder evitar cualquier complicación por las horas que permanecieron en ayuno luego de lo cual los participantes se retiraron. Si algún sujeto deseaba retirarse antes de concluir con el estudio este lo podría haber hecho libremente pues la participación era voluntaria.



4. Colección de muestra

a. Toma de muestra. Las muestras de suero fueron tomadas por el equipo de investigación de CeSSIAM y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis. Estas fueron tomadas por una flebotomista y por la Licda. María Eugenia Romero. Se utilizó material descartable nuevo y las muestras se extrajeron con tubos vacutainer para evitar hemólisis, ya que esta afecta la medición de NTBI. Cuando los sujetos de estudio llegaron a CeSSIAM se les asignó un código, el cual es únicamente conocido por una persona del equipo de investigación de CeSSIAM y el archivo con los datos de estas personas que los correlacionan con los códigos asignados se encuentran en las instalaciones de CeSSIAM en una gaveta con llave a donde solo el director tiene acceso. La sangre se extrajo de la vena antero – cubital. Se tomó una primera muestra sanguínea de 5mL para el tamizaje, ésta se tomó en dos tubos vacutainer uno con anticoagulante, EDTA, para la cuantificación de hemoglobina y el segundo tubo sin anticoagulante, este centrifugó por 5 minutos a 5,000rpm. A partir de esta se obtuvo aproximadamente 1mL de suero el cual fue alicuotado en un tubo eppendorf y se identificó con el código asignado al sujeto de

estudio. Esta muestra siguió una cadena fría hasta llegar al laboratorio del Hospital Nuestra Señora del Pilar donde se realizaron los exámenes de tamizaje, el laboratorio se encuentra dirigido por la Licda. Isabel Massanet. Se utilizó la muestra de sangre completa para determinar la hemoglobina y el suero para realizar la proteína C reactiva y determinar los niveles de ferritina. A partir de los resultados de tamizaje se seleccionaron a los sujetos de estudio, los cuales fueron convocados a una segunda reunión. En este caso se tomaron cuatro muestras sanguíneas de 5mL cada una, para evitar hematomas se alternaron entre los brazos en los que se realizaba la extracción de sangre. Estas muestras sanguíneas se centrifugaron a 5,000rpm por 10 minutos. A partir de los 5mL de sangre se obtuvo aproximadamente 2.5mL de suero, el suero se separó en dos alícuotas en tubos eppendorf 1.5mL para hierro sérico y 1mL para determinación de NTBI, ambas alícuotas fueron identificadas con el código de cada sujeto. Se siguió una cadena fría hasta llegar al laboratorio donde se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Lo que no se utilizó de las muestras sanguíneas extraídas fue descartado siguiendo las normas de bioseguridad pertinentes.

b. **Dosis de hierro.** Los sujetos que fueron seleccionados a partir del tamizaje participaron en el proceso de suplementación con dosis profilácticas de hierro. Ya que en estudios previos se comprobó que la mayor respuesta de NTBI es causada por sulfato ferroso, este fue utilizado como fuente de hierro en este estudio. Se proporcionó sulfato ferroso marca Ferrinsol fabricado por Industrias Bioquímicas en Guatemala. Según las especificaciones del fabricante este jarabe contiene 2mg de hierro/mL. Ya que se les quería administrar con 100mg de hierro se les suministro con 4mL de Ferrinsol. Este volumen se midió un día previo a la intervención y se alícuotó en viales de plástico con tapadera y cubiertos con papel aluminio para evitar cualquier modificación por exposición a la luz. El día de la intervención se le entregó a cada sujeto de estudio el vial con el volumen de Ferrinsol que debían tomar, al finalizar de tomarlo pudieron consumir 200mL de agua. Luego de esto los sujetos debieron permanecer en las instalaciones de CeSSIAM para las tomas de muestras sanguíneas consecutivas. Además por la composición del jarabe los sujetos de estudio podían presentar náuseas y debían permanecer bajo observación para evitar cualquier problema.

c. **Laboratorio de análisis.** Los análisis del tamizaje basal (determinación de hemoglobina, proteína C reactiva y concentración de ferritina) se realizaron en el Laboratorio Clínico del Sanatorio Nuestra Señora del Pilar. Los análisis de hierro sérico, niveles de transferrina y porcentaje de saturación de la transferrina se realizaron en el laboratorio colaborador en Innsbruck, Austria dirigido por el Dr. Schümann.

El análisis de hierro no ligado a transferrina (NTBI) se efectuará como parte de la presente tesis en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala.

5. Variables

Cuadro 3 Operacionalización de Variables.

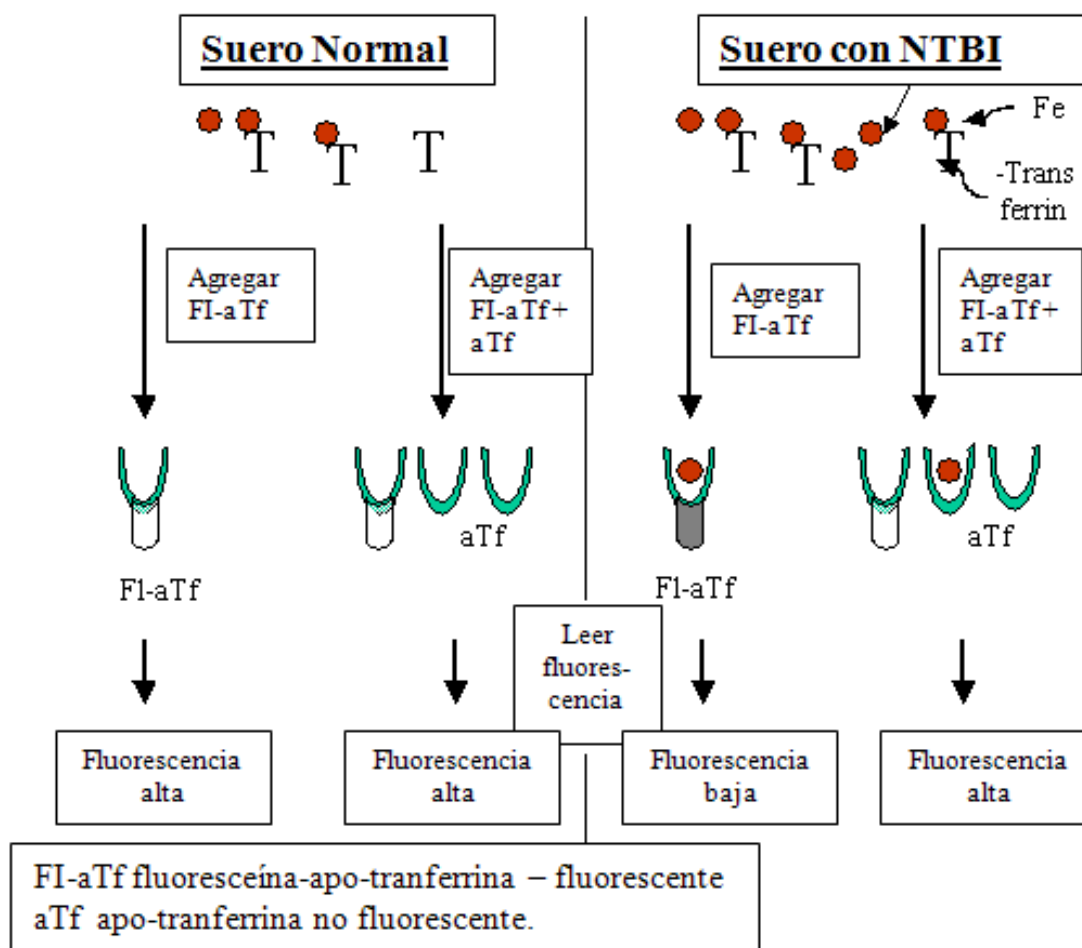
Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicador	Escala
<p>Concentración de NTBI</p> <p>Concentración de hierro sérico</p> <p>Transferrina y niveles de saturación de transferrina</p> <p>Independiente: Administración de 100mg de Sulfato Ferroso. (es una variable controlada), reservas de hierro (inferiores o menores a 30µg/dL y altas o superiores a 70µg/dL) y sexo (masculino, femenino)</p> <p>Interviniente: Fumar, consumo de bebidas alcohólicas, consumo de comida en las últimas 12 horas.</p> <p>Origen de la variable: Atributiva.</p> <p>Respecto al número de valores que toma es: Polítonica continua.</p>	<p>Naturaleza: Cuantitativa</p> <p>Relación: Dependiente - Concentración de NTBI.</p> <p>Nivel de medición: Razón o proporción</p>	<p>Variable dependiente: Concentración de NTBI es la concentración de hierro no ligado a transferrina en el suero de los 40 sujetos de estudio, la cual se va a expresar en µg/dL.</p> <p>Variable Independiente: El sulfato ferroso es un fármaco administrado a personas que se cree tienen reservas de hierro inferiores, se administras 100mg ya que es la dosis que el MSPAS administra a la población guatemalteca.</p>	<p>Concentración de NTBI, de hierro y determinación de niveles de transferrina y porcentaje de saturación de la misma en el suero de hombres con niveles bajos de hierro.</p> <p>Concentración de NTBI, de hierro y determinación de niveles de transferrina y porcentaje de saturación de la misma en el suero de hombres con niveles superiores de hierro.</p> <p>Concentración de NTBI, de hierro y determinación de niveles de transferrina y porcentaje de saturación de la misma en el suero de mujeres con niveles bajos de hierro.</p> <p>Concentración de NTBI, de hierro y determinación de niveles de transferrina y porcentaje de saturación de la misma en el suero de mujeres con niveles superiores de hierro.</p>	<p>Se va a medir la fluorescencia de las muestras en unidades de FUI a partir de la razón de fluorescencia y con una curva de calibración realizada previamente con estándares se va a determinar la concentración de NTBI en el suero de los sujetos de estudio.</p> <p>Se va a calcular la concentración de hierro sérico.</p> <p>Se va a determinar los niveles de transferrina y los porcentajes de saturación de esta.</p>	<p>Niveles de hierro bajos menores que 30 µg/dL</p> <p>Niveles de hierro superiores mayores que 70 µg/dL</p> <p>Sexo masculino</p> <p>Sexo femenino</p>

6. Métodos realizados como parte de la tesis - Análisis químicos

a. NTBI Antes de empezar es importante recordar que por el tipo de medición que se va a realizar toda la cristalería y el material que se utilizó para pesar debe ser de plástico, no se pudo utilizar agitador magnético, ya que se está usando fluoresceína todos los reactivos cubrieron con papel aluminio y para evitar contacto directo con la solución las bocas de los beaker o cualquier otro recipiente se cubrió primero con plástico y luego con aluminio, se trabajó en la medida de lo posible en la oscuridad y todo se almacenó a -80°C hasta ser utilizado. Se prepararon todos los reactivos a utilizar para la preparación del reactivo A y B de NTBI. Primero se preparó el buffer HBS libre de hierro. Este se preparó mezclando 150mM de NaCl con 20mM de Hepes, en esta etapa no se ajustó el pH. Para eliminar el hierro se mezclaron 100mL de HBS con 1g de Chelex y se filtró utilizando papel filtro. Luego de esto se ajustó el pH a 7.1 utilizando NaOH 5M. El buffer HBS es un buffer altamente utilizado para mantener las condiciones biológicas. El segundo reactivo que se preparó fue el cloruro de galio (GaCl_3) 100mM, este es distribuido en una ampolla de vidrio la cual se limpió por el exterior y se colocó dentro de un beaker, se trabajó bajo una campana y utilizando lentes de protección por la alta reactividad. La ampolla se quebró utilizando un objeto de madera y se mezcló inmediatamente después con 286mL de agua doble destilada estopara disolver el galio. La solución obtenida de cloruro de galio era estable por lo que alicuotó y congeló. El GaCl_3 funcionó bloqueando la apo-transferrina. Luego de esto se preparó la fluoresceína apo-transferrina (FI-aTf). Se pesaron 80mg de apo-transferrina y se disolvieron en 10mL de una solución de bicarbonato de sodio 100mM, el pH en este paso fue 8.4, no se ajustó. La solución obtenida tenía una concentración de 100 μM . Luego de esto se preparó una solución de 10mM de 5`-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluoresceína (DCTAF) en dimetilsulfoxido, esta solución debió estar protegida de la luz. Se agregó 0.1mL de la solución anterior, DCTAF, a 10mL de la solución de apo-transferrina. Esta solución se incubó por 30 minutos a 37°C y luego de esto se agregó 0.1mL de una solución de L-lisina 0.5M en 100mM de NaHCO_3 , la cual paró la reacción. Luego de esto se realizó diálisis de 10mL de FI-aTf contra 2 litros de HBS utilizando un tubo de diálisis con un punto de corte de 12kDa. Al finalizar esta primera diálisis se realizó una segunda diálisis. Para comprobar la preparación de FI-aTf se tomó una lectura de 0.2mL del FI-aTf diluido en HBS en razón 1:160. Esto se almacenó, la concentración final de esta preparación fue de 100 μM con una razón FI: aTf de 1:1. Ya con esto se pudo comenzar a preparar el reactivo para el ensayo de NTBI, se comenzó agregándole a 1 litro de HBS 10mM de oxalato de sodio, 1mL de la solución de GaCl_3 para tener una concentración de 0.1mM, el pH en esta etapa fue 7.3. Luego de esto se agregaron 0.625 μM de FI-aTf. Esta solución de un litro se dividió en 2 porciones de 500mL cada una, la primera porción

correspondió al reactivo A y a la segunda porción se le agregó 1g de aTf y este será el reactivo B. Estos reactivos se alicuotaron y se almacenaron a -20°C . Todos los reactivos y la preparación de la muestra se realizaron en el laboratorio y no se utilizó un kit para realizar esta medición ya que es muy delicada. Ya con esto se construyó la curva de calibración. Las soluciones de la curva de calibración se debían preparar el mismo día que se utilizaban ya que son estables únicamente por 2 horas. Se preparó una solución de 20mM de sulfato de amonio férrico (FAS) en agua doble destilada. Se mezclaron 0.5mL de la solución anterior con 0.5mL de una solución de nitrilo-acetato 200mM a pH 7.0, lo que formó Fe: NTA en razón 10:100. Se preparó una solución madre de $50\mu\text{M}$ diluyendo en HBS y se realizaron diluciones seriadas de esta solución madre para obtener concentraciones de 12 hasta $0\mu\text{M}$. Se colocaron $10\mu\text{L}$ de cada estándar en cuadruplicado en una placa de 96 pozos, a los primeros dos pozos se les agregó $200\mu\text{L}$ del reactivo A a cada uno y a los otros dos pozos $200\mu\text{L}$ del reactivo B a cada uno. Se calculó la razón de fluorescencia entre el reactivo A/B de los estándares de hierro y a partir de las concentraciones de estos y las razones de fluorescencia se construyó la curva de calibración. Luego de esto se analizaron las muestras se colocaron $10\mu\text{L}$ en cuadruplicado en un placa de 96 pozos, donde cada muestra de suero será analizada en duplicado con cada reactivo de NTBI. En el reactivo A si existe hierro libre en el suero se va a unir a la FI-aTf disminuyendo su fluorescencia. En el reactivo B si existe hierro libre en el suero este se va a unir a la aTf no fluorescente en lugar de la FI-aTf no afectando así la lectura de fluorescencia. Una vez mezclado los reactivos con el suero la placa se dejó en una cámara oscura durante una hora y luego se leyó la fluorescencia (CytoFluor® 4000, Applied Biosystems) con filtro de excitación (485nm) y filtro de emisión de (538nm). Una vez se obtienen todas las lecturas de fluorescencia se determinó la razón de fluorescencia entre el reactivo A y B para cada muestra. En el suero normal se espera que esta razón sea 1 o muy cercana a este, pues no existe hierro libre que puede afectar la fluorescencia de los reactivos. En un suero con hierro libre la fluorescencia del reactivo A va a ser menor que la del reactivo B, por lo que la razón de fluorescencia va a ser menor a 1. Luego a partir de una curva de calibración se determinó la concentración de NTBI. En la Figura No. 10 se esquematizan los pasos fundamentales del ensayo fluorométrico a realizar y las diferencias entre un suero normal y un suero con hierro libre.

Figura No. 10 Método de medición de concentración de NTBI En suero normal y con NTBI



(Tomada de Breuer, 2001).

b. Instrumento de medición. Se determinó la concentración de hierro no ligado a transferrina ($\mu\text{g/dL}$) a partir de la curva de calibración que relacionaba la fluorescencia de las muestras con la concentración de hierro no ligado a transferrina, la relación que se establece es una relación lineal siguiendo la ley de Beer- Lambert. Para medir la fluorescencia tanto de los estándares como de las muestras se utilizó un fluorómetro (CytoFluor® 4000, Applied Biosystems) las unidades de fluorescencia utilizadas fueron FUI. La razón de fluorescencia entre el reactivo A y B es la que se utilizó para calcular la concentración de hierro no ligado a transferrina ($\mu\text{g/dL}$) a partir de la curva de calibración.

c. Determinación de hierro sérico y su correlación con NTBI.

Una de las alícuotas obtenidas del suero antes y después de la suplementación con 100mg de sulfato ferroso a los sujetos de estudio fue enviada a un laboratorio colaborador en Innsbruck, Austria a cargo del Dr. Schümann. Se determinó la concentración de hierro sérico utilizando espectrofotometría de absorción atómica por medio del ensayo basado en ferrozina (Roche). Se calcularon los cambios en la concentración de hierro durante el tiempo, también llamados deltas. Se obtuvo un promedio de estos deltas para cada tiempo dentro de un mismo grupo. Es decir el grupo de hombres con reservas de hierro inferior estuvieron cuatro deltas de hierro sérico el del tiempo 0, tiempo 90, tiempo 180 y tiempo 270 y de igual manera los otros tres grupos de sujetos de estudio. A partir de estos promedios se construyeron curvas de cambio en el tiempo y se calculó el área bajo la curva de estas curvas, lo cual fue un indicador del cambio de concentración de hierro sérico. Además de esto la concentración de hierro sérico se utilizó para correlacionarla con las concentraciones de NTBI sérico, pues en estudios previos se ha demostrado que estas son directamente proporcionales. Esto permitió analizar de mejor manera si existen diferencias en las concentraciones de NTBI sérico entre sexo y reservas de hierro.

d. Determinación de niveles de transferrina y saturación de transferrina.

En la misma alícuota de suero que se manda al laboratorio colaborador en Innsbruck, Austria se determinaron los niveles de transferrina los cuales son indicadores de los niveles de hierro sérico. Además de esto se determinó el porcentaje de saturación de transferrina para determinar que esta sea la reportada por la literatura y poder determinar cuál es el nivel de saturación mínimo al que se comienza a formar NTBI sérico.

7. Análisis estadístico

a. Análisis estadístico.

Se realizó utilizando SPSS versión 17.0 (Statistical Package for the Social Science, Chicago, Illinois, USA)

1) ANOVA: Se cuantificó la magnitud de las concentraciones de NTBI y hierro sérico, en cada intervalo después de las dosis iniciales de hierro. Se calcularon deltas, o cambios en el tiempo, de estas concentraciones con las que se van a construir curvas de cambio en el tiempo y se determinará el área bajo la curva (AUC por sus siglas en inglés), calculando los cambios en concentraciones en cada tiempo de extracción con respecto al valor obtenido en tiempo cero del día de la suplementación. Antes de realizar un análisis paramétrico fue necesario revisar que cumpliera con los supuestos de

normalidad y homogeneidad de varianzas. Ya que en todos los casos los valores lo cumplieron se procedió a realizar el ANOVA. Se utilizó un ANOVA de dos factores y dos niveles, del modelo general lineal univariado, para determinar si existe efecto significativo del sexo o de las reservas de hierro sobre el cambio de concentración de NTBI sérico, así como un segundo ANOVA para determinar si existe efecto significativo del sexo o de las reservas de hierro sobre la concentración máxima de NTBI sérico. Se realizaron los mismos dos ANOVAS para comprobar si existía efecto de alguno de estos factores sobre la concentración de hierro sérico. El primer factor del ANOVA es el género y sus dos niveles son hombres o mujeres y el segundo factor son las reservas de hierro donde sus dos niveles son superiores o inferiores. Se utilizó una prueba de dos colas, con un nivel de significancia del 5%. Las hipótesis que se quieren probar con el ANOVA se mencionan a continuación.

a) Hipótesis nulas (H_0)

i. No existe efecto del género sobre la concentración de hierro no ligado a transferrina.

ii. No hay efecto de las reservas de hierro sobre la concentración de hierro no ligado a transferrina.

iii. No hay efecto de la interacción entre género y reserva de hierro en la concentración de hierro no ligado a transferrina.

b) Hipótesis alternativa (H_a)

i. Existe un efecto significativo del género sobre la concentración de hierro no ligado a transferrina.

ii. Existe un efecto significativo de las reservas de hierro sobre la concentración de hierro no ligado a transferrina

iii. Existe un efecto de la interacción entre género y reserva de hierro en la concentración de hierro no ligado a transferrina.

Así mismo se realizó un análisis Post- Hoc de LSD (por sus siglas en inglés least significant difference- diferencia mínima significativa) para determinar entre que grupos se encontraba la diferencia si es que esta existía.

2) Análisis de correlación: Para determinar la relación entre el hierro circulante y la concentración de hierro no ligado a transferrina. Se realizará un análisis de correlación de Spearman y un análisis de correlación de Pearson. Al igual se graficó hierro sérico contra NTBI y se hizo un ajuste lineal para obtener la ecuación de regresión lineal. La hipótesis a probar por este análisis fue:

a) Hipótesis nulas (H_0)

i. No hay relación entre el hierro circulante y la concentración de hierro no ligado a transferrina.

b) Hipótesis alternativa (H_a)

i. Existe una relación entre el hierro circulante y la concentración de hierro no ligado a transferrina.

Para ejemplificar mejor que se va a comparar contra que, se construyó una tabla donde se observan los sujetos de estudio y como se van a comparar, Figura No. 11

Figura No. 11. Tabla de comparación. Nos indica que sujetos de estudio se van a comparar.

	Hombres reservas superiores (n = 10)	Hombres reservas inferiores (n = 10)
Mujeres reservas superiores (n = 10)	✘	✘
Mujeres reservas inferiores (n = 10)	✘	✘

B. Materiales

1. Recursos humanos. Para el reclutamiento de los sujetos de estudio y la fase experimental de este proyecto se contó con la ayuda de la Licda. María Eugenia Romero, Química Bióloga del equipo que realizó la extracción de las muestras sanguíneas. Los análisis del tamizaje sanguíneo para la selección de los sujetos de estudio se trabajó con la colaboración del Laboratorio Clínico del Sanatorio Nuestra Señora del Pilar, en donde la Licda. Isabel Massanet realizó la determinación de hemoglobina, proteína C reactiva y determinación de niveles de ferritina. Los análisis de concentración de NTBI se realizaron en el laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala con la Dra. Mónica Orozco como investigadora principal y Gabriela Samayoa como investigador auxiliar.

2. Recursos materiales y financieros. Los fondos para este proyecto fueron dados por CeSSIAM, pues este es un proyecto de esta institución. El fluorómetro para realizar las mediciones de concentración de hierro no ligado a transferrina es proporcionado por la Universidad del Valle de Guatemala. En el Cuadro 4 se detallan los recursos materiales principales y los costos aproximados de dicho proyecto.

Cuadro 4 Presupuesto del proyecto

Rubro	CeSSIAM (Q.)	UVG (Q.)	Total (Q.)
Reactivos y equipo de laboratorio descartable	34,000.00		34,000.00
Lámpara y filtros del fluorómetro	15,000.00		6,000.00
Tamizaje en el Laboratorio de Sanatorio Nuestra Señora del Pilar	3,000.00		3,000.00
Viáticos	10,000.00		10,000.00
Gastos con los sujetos de estudio	24,000.00		24,000.00
Fluorómetro		80,000.00	50,000.00
Instalaciones de laboratorio		43,000.00	38,500.00
TOTAL	86,000.00	123,000.00	209,000

3. Ubicación. Los análisis de concentración de hierro no ligado a transferrina (NTBI) en los 40 sujetos de estudio en los cuatro tiempos (0, 90, 180 y 270 minutos) se realizó en la Universidad del Valle de Guatemala.

C. Cronograma de actividades

Cuadro 5. Cronograma de actividades

No	ACTIVIDAD	Mes 2011-2012														
		Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
ACTIVIDADES PREVIO A TRABAJO EXPERIMENTAL																
1	Cotización y solicitud de reactivos															
2	Elaboración de PNOs															
3	Calibración y evaluación equipo															
4	Compra de repuestos del equipo															
5	Segunda evaluación equipo															
6	Elaboración protocolo															
7	Revisiones y entrega de protocolo															
TRABAJO EXPERIMENTAL																
8	Preparación reactivos															
9	Implementación del método															
10	Análisis de muestras															
ANÁLISIS DE RESULTADOS																
11	Análisis estadístico															
12	Preparación y entrega de informe final															

IV. RESULTADOS

A. Hierro sérico

Cuadro No. 6. Promedios de hierro sérico. Se determinó el promedio de cambio máximo y delta para cada grupo de estudio luego de la suplementación con 100mg de sulfato ferroso.

Grupo	Hombres con reservas de hierro superiores	Hombres con reservas de hierro inferiores	Mujeres con reservas de hierro superiores	Mujeres con reservas de hierro inferiores
Cambio máximo en [Hierro]($\mu\text{g/dL}$) ¹	110.0 \pm 40.5 [109.1] (a) ²	213.3 \pm 71.7 [210.4] (b)	211.7 \pm 97.7 [178.3] (b)	183.9 \pm 63.3 [195.3] (b)
Cambios en 4.5 horas de la [Hierro] ($\mu\text{g/dL}$) ¹	254.4 \pm 131.4 [216.8] (a)	508.4 \pm 206.6 [531.2] (b)	470.7 \pm 211.7 [419.6] (b)	455.4 \pm 152.2 [458.7] (b)

¹Media \pm desviación estándar [mediana]

²Las letras en paréntesis representan la comparación de ANOVA de dos factores (masculino y femenino) y dos niveles (reservas de hierro superiores e inferiores)- Anexos Cuadros No.13 y 14, los valores con diferente letra son estadísticamente diferentes usando la prueba post-hoc de diferencia mínima significativa (LSD)- Anexos Cuadros No. 15 y 16

Figura No. 12. Cambios en la concentración de hierro sérico en el tiempo. Se presentan las medias de los cambios de hierro sérico expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se muestran los 4 grupos de estudios: hombres con reservas de hierro superiores, hombres con reservas de hierro inferiores, mujeres con reservas de hierro superiores y mujeres con reservas de hierro inferiores. Por cuestiones de visualización no se presentan las barras de error, sin embargo en las gráficas siguientes si se incluyen.

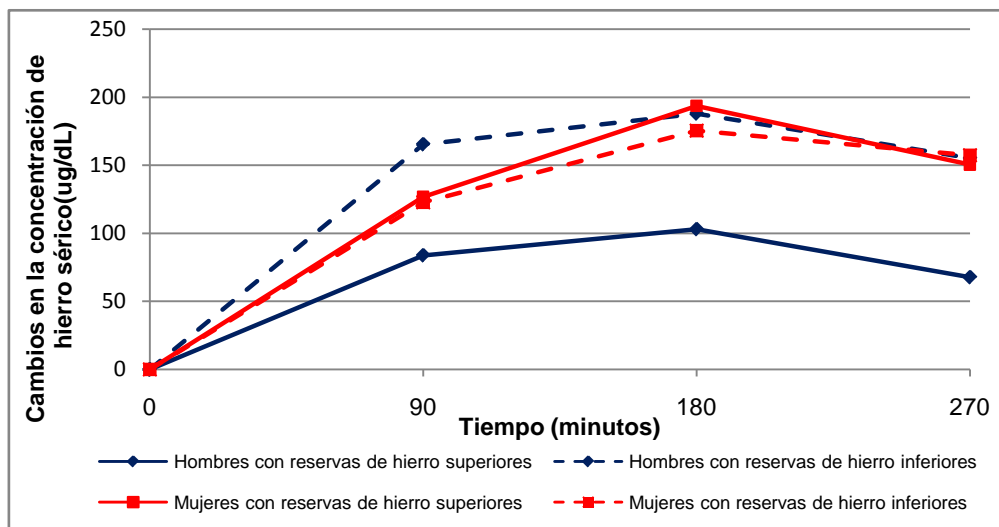


Figura No. 13. Cambios en la concentración de hierro sérico en el tiempo de mujeres: con reservas de hierro superiores y con reservas de hierro inferiores, para poder comparar su comportamiento. Se presentan las medias de los cambios de hierro sérico expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se muestran las barras de error negativas.

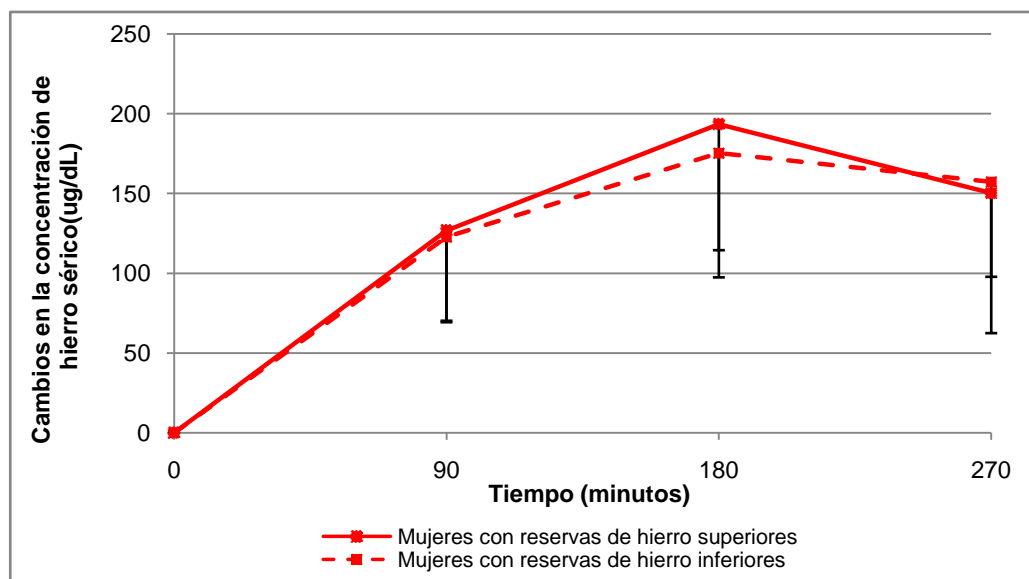


Figura No. 14. Cambios de concentración de hierro sérico en el tiempo de hombres: con reservas de hierro superiores y con reservas de hierro inferiores. Se observan las medias de los cambios de hierro sérico expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se incluyen las barras de error negativas.

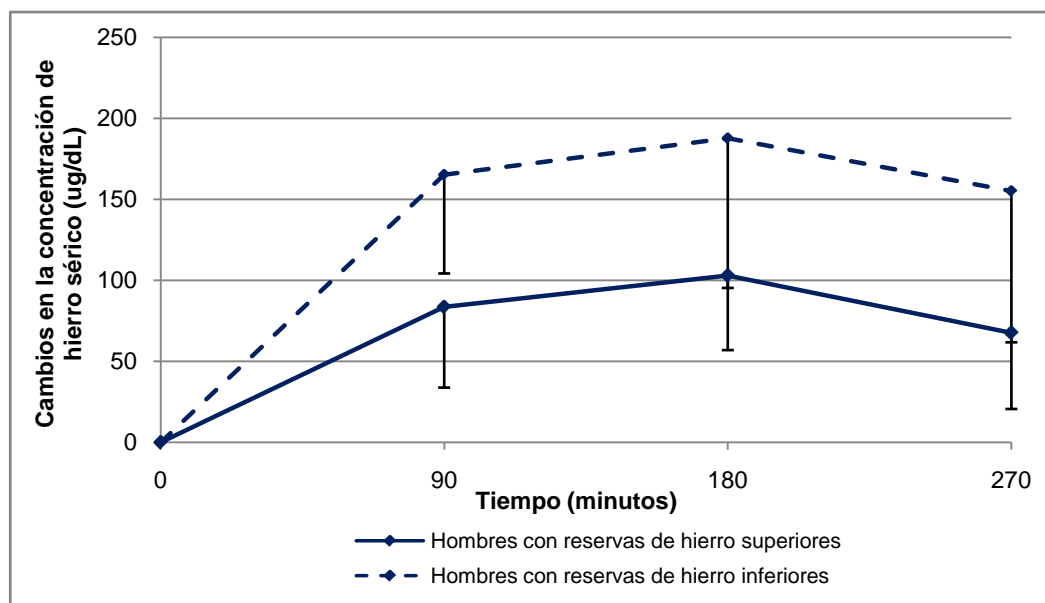


Figura No. 15. Comparación de los cambios de concentración de hierro sérico en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro superiores. Se observan las medias de los cambios de hierro sérico expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se incluyen las barras de error negativas.

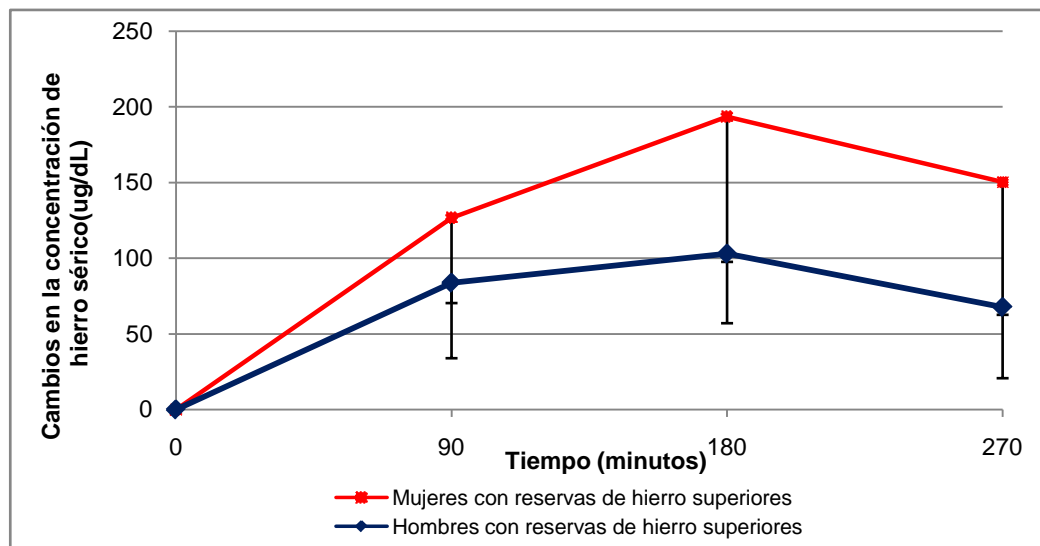
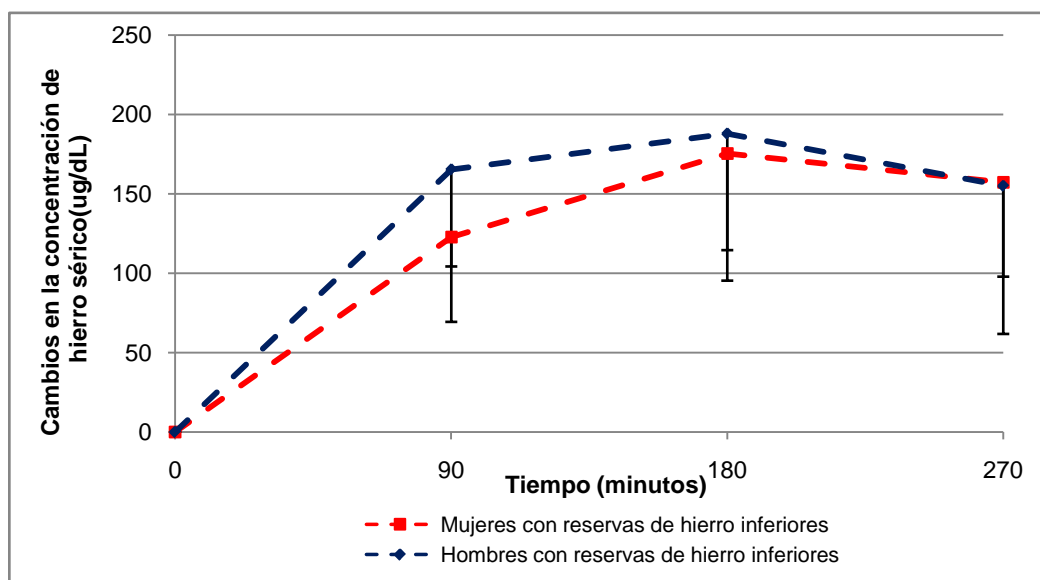


Figura No. 16. Comparación de los cambios de concentración de hierro sérico en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores. Se observan las medias de los cambios de hierro sérico expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se muestran las barras de error negativas



A. Hierro no ligado a transferrina - NTBI

Cuadro No. 7. Promedios de NTBI. Se determinó el promedio de cambio máximo y delta para cada grupo de estudio luego de la suplementación con 100mg de sulfato ferroso.

Grupo	Hombres con reservas de hierro superiores	Hombres con reservas de hierro inferiores	Mujeres con reservas de hierro superiores	Mujeres con reservas de hierro inferiores
Cambio máximo en [Hierro]($\mu\text{g/dL}$) ¹	2.3 \pm 0.9 [2.0] (a)	3.2 \pm 2.1 [2.6] (a)	2.8 \pm 0.9 [2.5] (a)	3.2 \pm 1.3 [3.2] (a)
Cambios en 4.5 horas de la [Hierro] ($\mu\text{g/dL}$) ¹	5.6 \pm 2.7 [5.3] (a)	8.2 \pm 5.6 [7.0] (a)	6.3 \pm 2.0 [5.8] (a)	8.2 \pm 3.3 [7.7] (a)

¹Media \pm desviación estándar [mediana]

² Las letras en paréntesis representan la comparación de ANOVA de dos factores (masculino y femenino) y dos niveles (reservas de hierro superiores e inferiores)- Anexos Cuadros No.18 y 19, los valores con diferente letra son estadísticamente diferentes usando la prueba post-hoc de diferencia mínima significativa (LSD)- Anexos Cuadros No. 20 y 21

Figura No. 17. Cambios en la concentración de NTBI en el tiempo. Se presentan las medias de los cambios de hierro no ligado a transferrina (NTBI) circulante expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se muestran los 4 grupos de estudios: hombres con reservas de hierro superiores, hombres con reservas de hierro inferiores, mujeres con reservas de hierro superiores y mujeres con reservas de hierro inferiores. No se muestran las barras de error por cuestiones de visualización, sin embargo en las gráficas siguientes se incluyen.

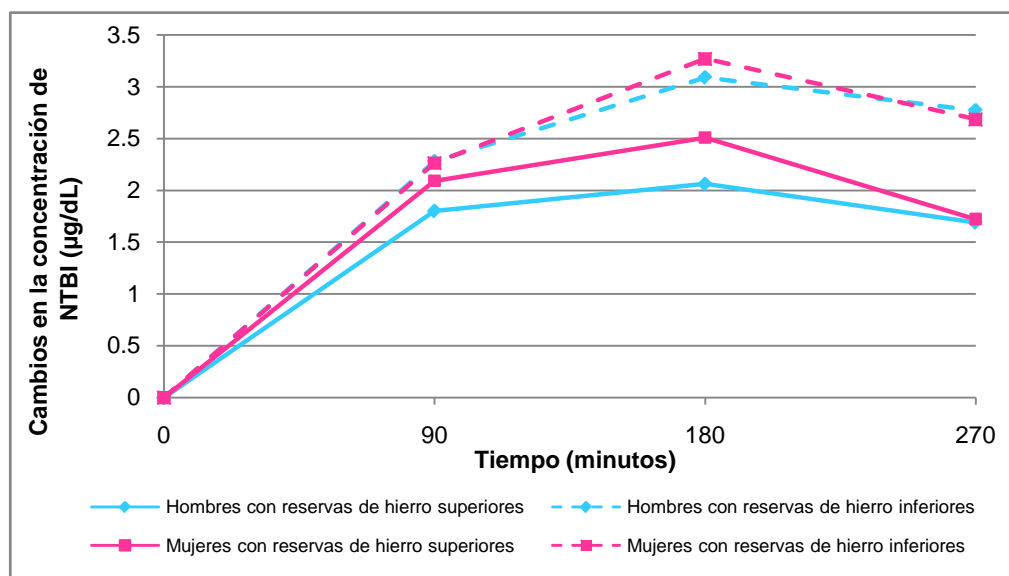


Figura No. 18. Cambios en la concentración de NTBI en el tiempo de mujeres: con reservas de hierro superiores y con reservas de hierro inferiores, para poder comparar su comportamiento. Se presentan las medias de los cambios de hierro no ligado a transferrina (NTBI) circulante expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se muestran las barras de error.

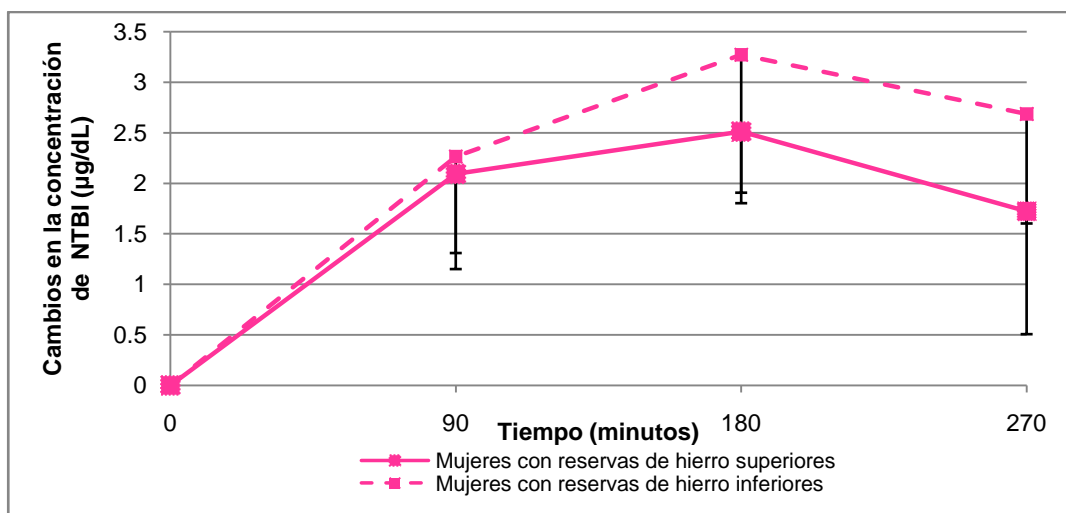


Figura No. 19. Cambios de concentración de NTBI en el tiempo de hombres: con reservas de hierro superiores y con reservas de hierro inferiores. Se observan las medias de los cambios de hierro no ligado a transferrina (NTBI) circulante expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se muestran las barras de error.

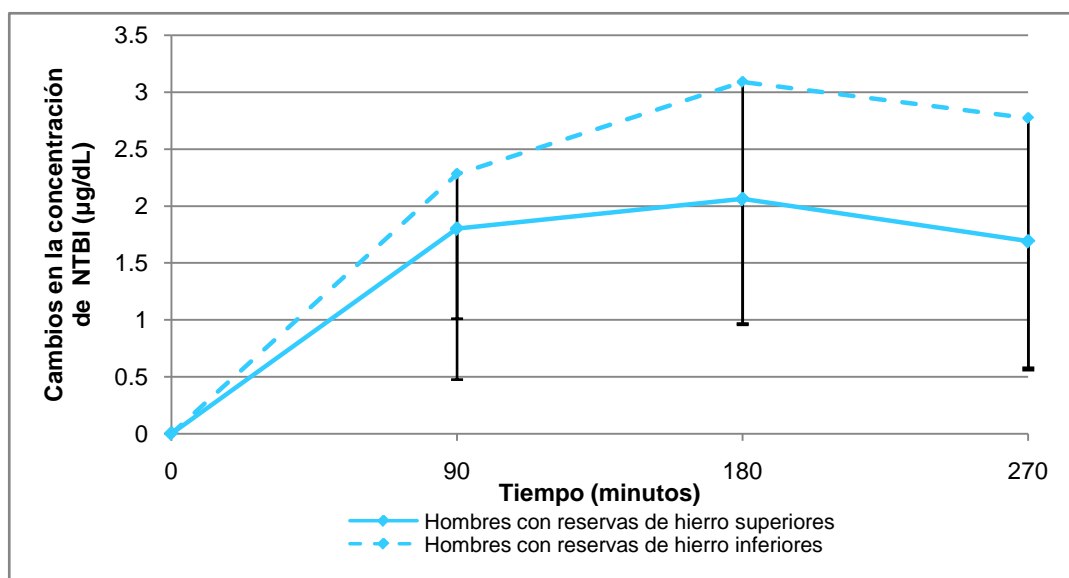


Figura No. 20. Comparación de los cambios de concentración de NTBI en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro superiores. Se observan las medias de los cambios de hierro no ligado a transferrina (NTBI) circulante expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se presentan las barras de error.

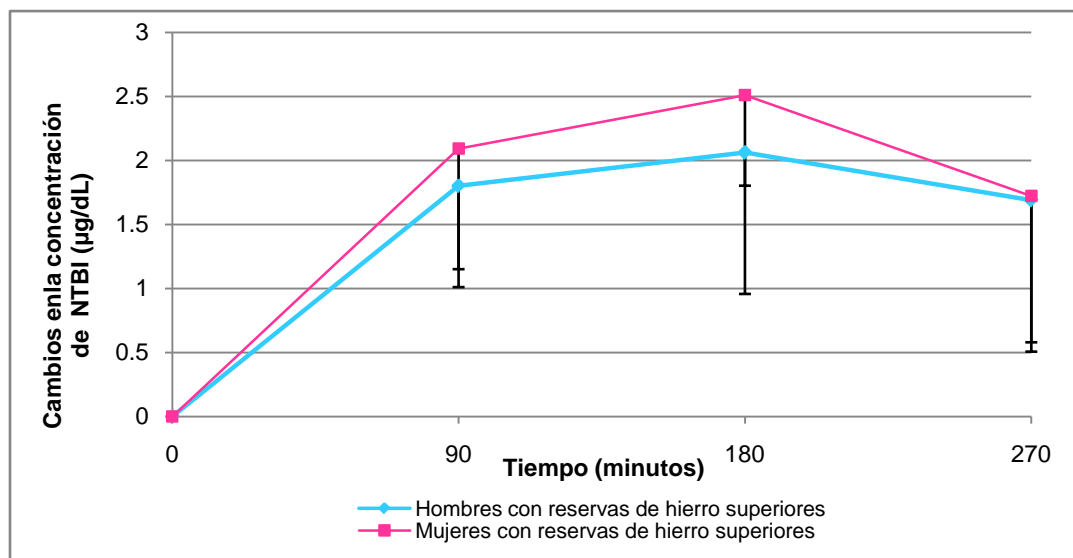
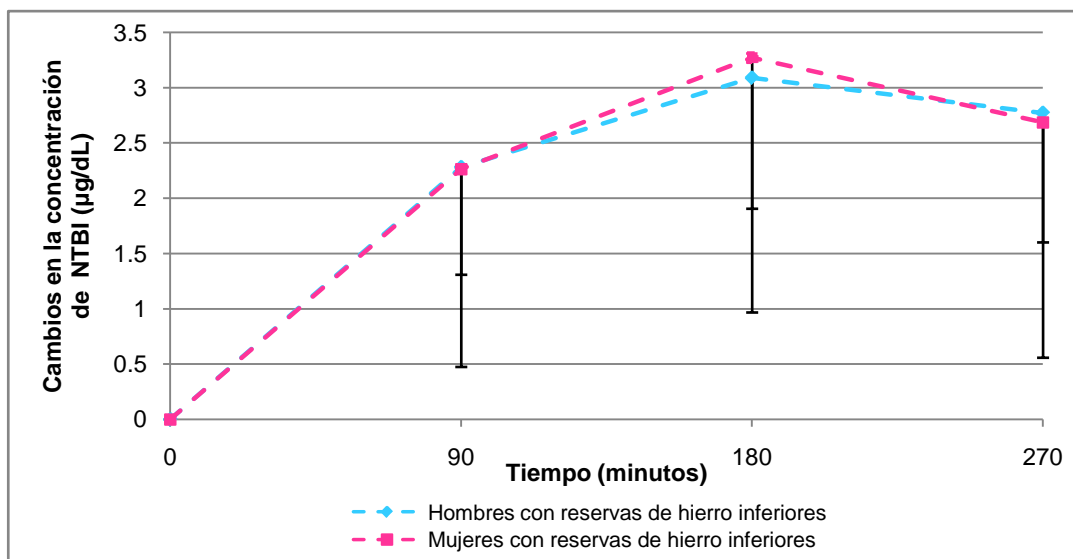


Figura No. 21. Comparación de los cambios de concentración de NTBI en el tiempo, en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores. Se observan las medias de los cambios de hierro no ligado a transferrina (NTBI) circulante expresadas en $\mu\text{g/dL}$, durante 3 intervalos de 90 minutos cada uno después de la dosificación de 100mg de sulfato ferroso. Se muestran las barras de error.

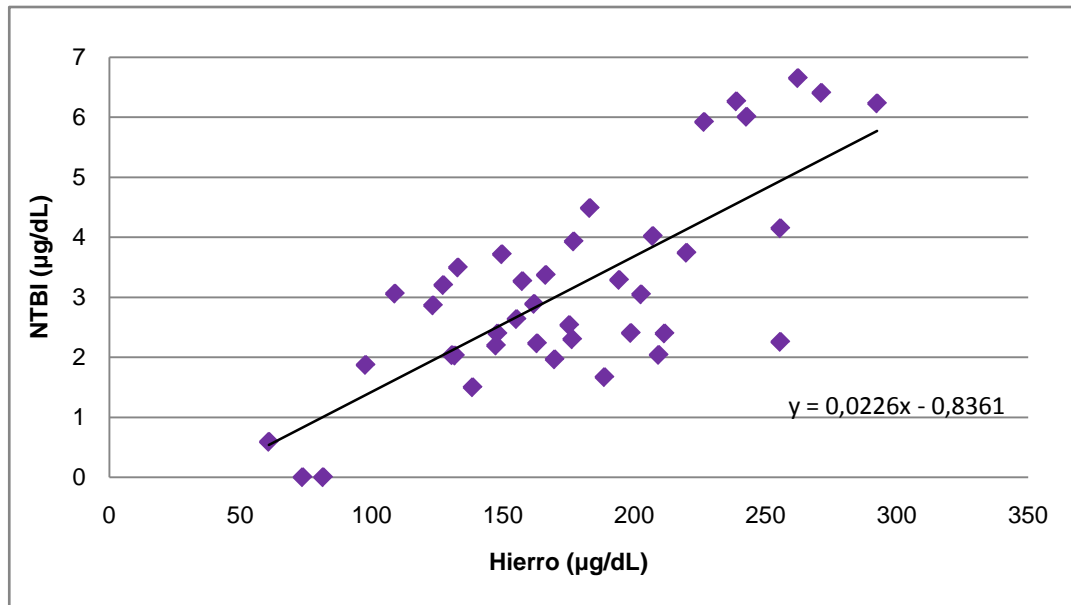


B. Correlaciones hierro sérico- hierro no ligado a transferrina (NTBI)

Cuadro No. 8 Análisis de correlación de hombres con reservas de hierro superiores. Se determina la correlación existente entre los cambios en hierro sérico y los cambios en NTBI, se utilizan los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman.

Coefficiente de correlación de Spearman	Probabilidad	Coefficiente de regresión de Pearson	Probabilidad
0.64	0.000000	0.76	2 colas: 1.5×10^{-8} 1 cola: 7.4×10^{-9}

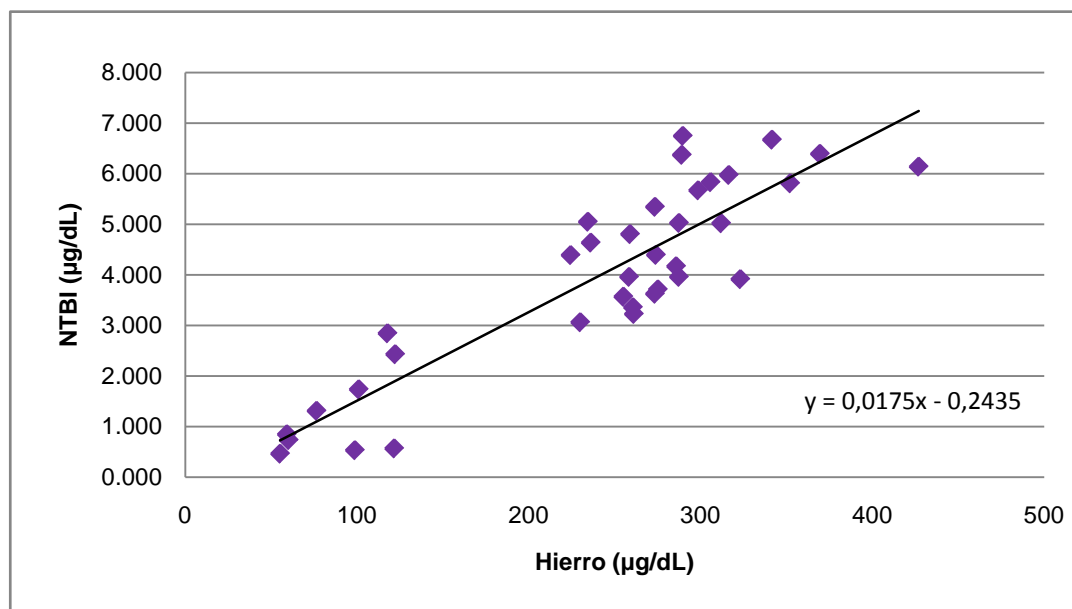
Figura No. 22. Correlación entre hierro sérico – NTBI en hombres con reservas de hierro superiores. Se grafican los valores pareados de las 40 muestras analizadas dentro de este grupo, se gráfica concentración hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$) en el eje horizontal y concentración de NTBI ($\mu\text{g/dL}$) en el eje vertical y se realiza una adecuación a un modelo lineal.



Cuadro No. 9 Análisis de correlación de hombres con reservas de hierro inferiores. Se determina la correlación existente entre los cambios en hierro sérico y los cambios en NTBI, se utilizan los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman.

Coeficiente de regresión de Spearman	Probabilidad	Coeficiente de regresión de Pearson	Probabilidad
0.84	0.000000	0.89	2 colas: 2.4×10^{-13} 1 cola: 1.8×10^{-13}

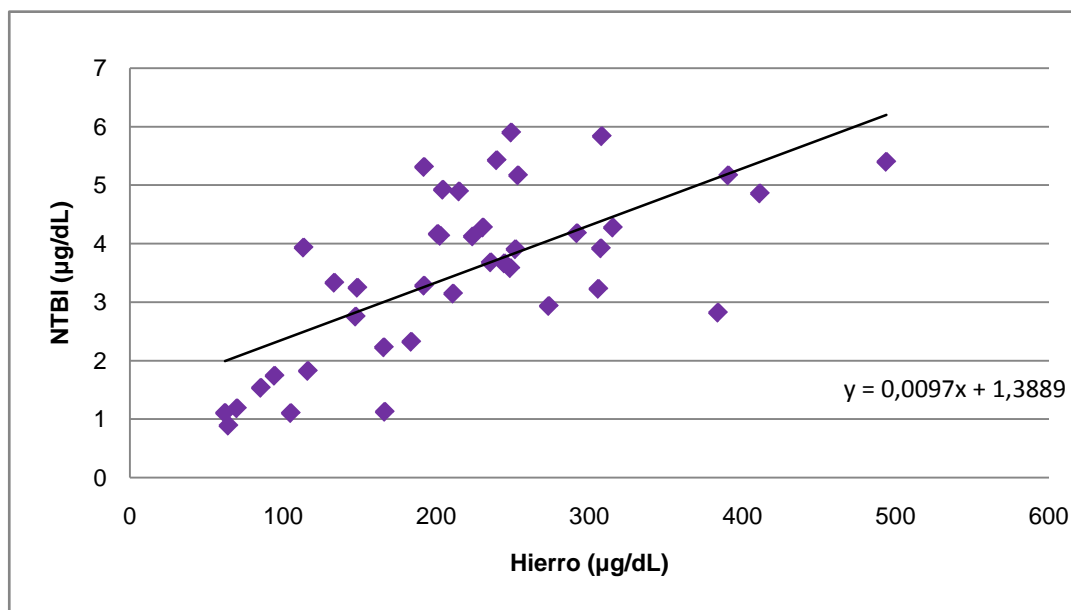
Figura No. 23. Correlación entre hierro sérico – NTBI en hombres con reservas de hierro inferiores. Se grafican los valores pareados de las 40 muestras analizadas dentro de este grupo, se gráfica concentración hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$) en el eje horizontal y concentración de NTBI ($\mu\text{g/dL}$) en el eje vertical y se realiza una adecuación a un modelo lineal.



Cuadro No. 10. Análisis de correlación de mujeres con reservas de hierro superiores. Se determina la correlación existente entre los cambios en hierro sérico y los cambios en NTBI, se utilizan los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman.

Coefficiente de regresión de Spearman	Probabilidad	Coefficiente de regresión de Pearson	Probabilidad
0.66	0.000000	0.67	2 colas: 2.2×10^{-6} 1 cola: 1.1×10^{-6}

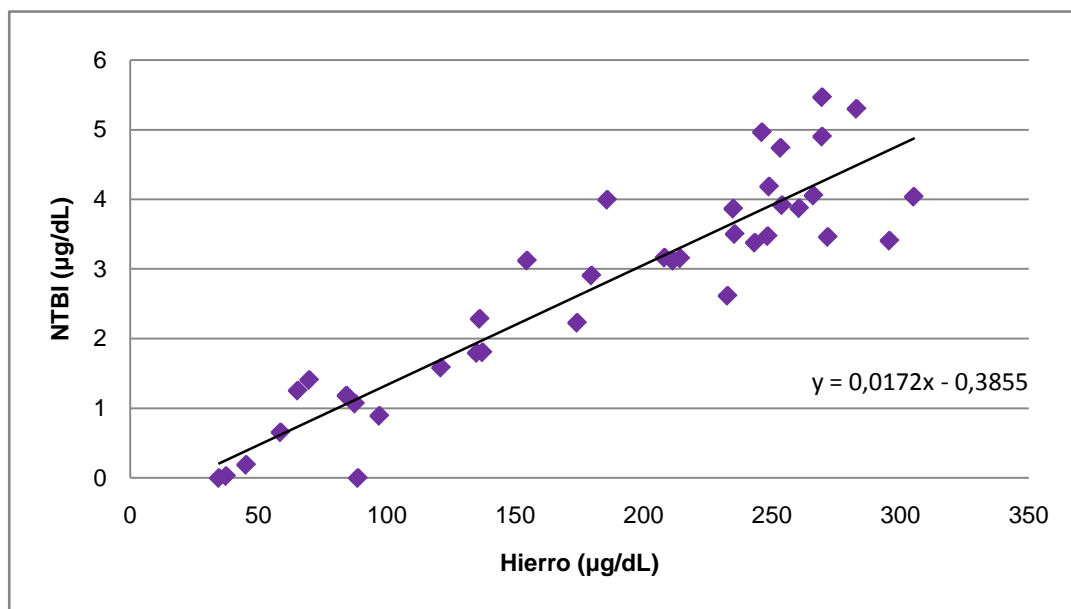
Figura No. 24. Correlación entre hierro sérico – NTBI en mujeres con reservas de hierro superiores. Se grafican los valores pareados de las 40 muestras analizadas dentro de este grupo, se gráfica concentración hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$) en el eje horizontal y concentración de NTBI ($\mu\text{g/dL}$) en el eje vertical y se realiza una adecuación a un modelo lineal.



Cuadro No. 11. Análisis de correlación de mujeres con reservas de hierro inferiores. Se determina la correlación existente entre los cambios en hierro sérico y los cambios en NTBI, se utilizan los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman.

Coefficiente de regresión de Spearman	Probabilidad	Coefficiente de regresión de Pearson	Probabilidad
0.90	0.000000	0.92	2 colas: 2.22×10^{-16} 1 cola: 1.11×10^{-16}

Figura No. 25. Correlación entre hierro sérico – NTBI en mujeres con reservas de hierro inferiores. Se grafican los valores pareados de las 40 muestras analizadas dentro de este grupo, se gráfica concentración hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$) en el eje horizontal y concentración de NTBI ($\mu\text{g/dL}$) en el eje vertical y se realiza una adecuación a un modelo lineal.



Cuadro No. 12. Comparación de pendientes de las correlaciones de los cuatro grupos de estudio de la presente investigación. Se presentan las pendientes de los grupos de estudio con fines comparativos.

	Hombres con reservas de hierro superiores	Hombres con reservas de hierro inferiores	Mujeres con reservas de hierro superiores	Mujeres con reservas de hierro inferiores
Pendiente ($\mu\text{g NTBI/} \mu\text{g de Fe}$)	0.0226	0.0175	0.0097	0.0172

C. Comparación con estudios anteriores

Se han realizado anteriormente estudios de NTBI por CeSSIAM, ya que durante la ejecución de dicho proyecto no se contaba con el conocimiento necesario para realizar el método en Guatemala las muestras se analizaron en Utrecht. Estos estudios previos se realizaron con dos grupos de estudio, mujeres con reservas inferiores de hierro y hombres con reservas superiores de hierro. Fue en estos mismos estudios donde se encontraron las tendencias que se mencionan en antecedentes y de donde sale la idea de extender dicha investigación al proyecto actual. Con fin de comparación de resultados a continuación se presentan los coeficientes de correlación de Pearson y las pendientes de dichos estudios y se comparan con los resultados actuales.

Cuadro No. 13. Coeficiente de correlación y pendiente de dos grupos de estudios anteriores. Se presenta el coeficiente de correlación y la pendiente de una regresión lineal entre hierro sérico y NTBI. Se muestran únicamente los dos grupos que estuvieron incluidos en estudios previos.

	Coeficiente de correlación de Pearson	Pendiente*
Hombres con reservas de hierro superiores Utrecht	0.93	0.077
Hombres con reservas de hierro superiores Guatemala	0.76	0.0226
Mujeres con reservas de hierro inferiores Utrecht	0.88	0.0225
Mujeres con reservas de hierro inferiores Guatemala	0.92	0.0172

*Pendiente en $\mu\text{g NTBI}/\mu\text{g de hierro}$

V. DISCUSIÓN

El hierro es esencial en la dieta, su función biológica incluye desde la producción de eritrocitos hasta la síntesis de ADN. El hierro absorbido a través de los enterocitos, entra al torrente sanguíneo y es ligado a la transferrina, evitando la oxidación a nivel celular. No obstante dicha proteína tiene un límite de saturación, si se tiene una suplementación profiláctica de hierro una fracción de este no se une a la transferrina y es fijado someramente a otras proteínas o queda como hierro libre, llamado hierro no ligado a transferrina (por sus siglas en inglés Non transferrine bound iron NTBI). El NTBI puede tener efectos negativos sobre la salud, ya que tiene la habilidad de participar en reacciones redox lo que lo hace altamente peligroso, pues forman radicales libres y especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés reactive oxygen species – ROS). Estas son citotóxicas y pueden causar daño oxidativo a macromoléculas, como peroxidación de lípidos, oxidación de aminoácidos, fragmentación de proteínas y daños al ADN. A largo plazo pueden causar problemas más severos como diabetes y cáncer. (Harrison-Findik, 2010; Hershko, 2007; Kolb, 2008; Marx, 2002). Es por esto que mantener niveles bajos de NTBI es esencial. En estudios previos se ha encontrado una relación directamente proporcional entre las concentraciones de hierro circulante y la concentración de NTBI, así como un patrón en las mujeres de formar menos NTBI que hombres suplementados con la misma dosis (Schümann, 2011). Este estudio pretende evaluar si la diferencia observada en la respuesta de NTBI es influida o determinada por el estado de hierro o el sexo. La relevancia de conocer a fondo el metabolismo del hierro es entender los factores que influyen en la formación de NTBI para prevenirlos y evitar el riesgo a la población.

Este trabajo tenía como objetivo determinar los cambios en las concentraciones de hierro no ligado a transferrina (NTBI) y hierro sérico en respuesta a la administración profiláctica de sulfato ferroso en hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores y superiores y determinar si dichos cambios eran significativamente diferentes entre sexos o reservas de hierro. Lo que indicaría diferencias en la absorción o el metabolismo del hierro, que puede ser tanto benéfico como perjudicial, o bien un mecanismo que disminuya la formación de NTBI. Al igual confirmar la relación entre el hierro circulante y NTBI que se observó en Schümann, 2011. Esto es importante pues si la suplementación profiláctica conlleva a la formación de altas concentraciones de NTBI en el suero, se van a producir radicales de oxígeno reactivos que pueden causar oxidación de diversos componentes celulares (Halliwell, 1992; Hershko, 2007; Kolb, 2008 y Marx, 2002).

Las características de los cuarenta sujetos de estudio pertenecientes a esta investigación se presentan en la sección de Anexos Cuadros No. 14 – 17 así como un resumen estadístico de dichas características en el Cuadro No. 18 de Anexos. Se presentan los factores tomados en cuenta para el reclutamiento que permitieron la clasificación de los sujetos de estudio respecto a sus reservas de hierro y previnieron que se utilizaran sujetos con cualquier patología que pudiera interferir o bien tuvieran alteradas las reservas por inflamaciones. Se presenta así la edad, la concentración de hemoglobina, la concentración de ferritina inicial y la concentración de proteína C reactiva.

A. Hierro sérico

Se analizaron los cambios en las concentraciones de hierro sérico respecto al tiempo para determinar si los cambios en concentración tenían algún patrón respecto al sexo o bien a las reservas de hierro. Se utilizaron dos criterios para el análisis de resultados: máximo de concentración y área bajo la curva de cada sujeto, Cuadro No. 6. Estos valores se analizaron usando un ANOVA antes de realizarlo se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, dichos resultados se encuentran en Anexos Cuadro No. 22. Se determinó que los dos factores (reservas de hierro y sexo) en conjunto afectan la concentración máxima de hierro sérico. Se comprobó que existe variación en el cambio de concentración de hierro sérico durante 4.5 horas (delta) según las reservas de hierro y la interacción reservas de hierro – sexo. No se logra determinar así un efecto significativo de las reservas de hierro en mujeres sobre la concentración de hierro sérico máximo ni sobre el cambio total. Por el contrario en hombres se determinó un efecto significativo de las reservas de hierro, es decir hombres con reservas de hierro altas y bajas tiene un comportamiento diferente tal como se esperaba.

Se determinó que no existe diferencia significativa entre hombres con reservas de hierro inferiores, mujeres con reservas de hierro superiores y mujeres con reservas de hierro inferiores. Por el contrario los hombres con reservas de hierro superiores muestran una diferencia significativa con el resto de los grupos (Figura No. 12). En estudios previos se ha comprobado que reservas de hierro inferiores aumentan los niveles de absorción de hierro y por lo mismo causan mayores cambios en la concentración de hierro sérico (Hoppe, 2004). A partir de esto se puede decir que los hombres muestran un comportamiento normal, en donde los hombres con reservas de hierro inferiores tienen un mayor cambio en la concentración de hierro sérico, debido a sus necesidades, por el contrario los hombres con reservas de hierro superiores tienen un cambio leve en la concentración de hierro sérico, pues no tienen necesidad del hierro, esto se observa gráficamente en la Figura No. 14. Tal como se creía las mujeres con reservas de hierro superiores e inferiores se comportan de manera similar, no

existe diferencia significativa entre ambos grupos, indicando un comportamiento diferente al esperado por parte de las mujeres con reservas de hierro superiores quienes no deberían tener un cambio en la concentración de hierro sérico tan alto pues tienen las reservas suficientes, esto se puede observar en la Figura No. 13. La deficiencia de hierro ha demostrado ser más común en mujeres, esto causa una regulación en la formación del transportador de metales divalentes (DMT1) aumentando así la absorción de hierro (Berglund, 2011). Esto explica el comportamiento de las mujeres con reservas de hierro inferiores. En cuanto al grupo de mujeres con reservas de hierro superiores se observa que no hay una supresión en la absorción de hierro, una idea de porque sucede esto es porque siempre tuvo reservas de hierro inferiores y cualquier fuente de hierro que llegaba al torrente sanguíneo era absorbida, por el largo periodo que duro este comportamiento en dichas mujeres puede que se haya establecido sin importar las reservas de hierro, aún así esto no es más que una idea y se debe clarificar la razón de dicho comportamiento. Al comparar entre sexo se puede ver que los hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores tienen un comportamiento similar sin diferencia significativa (Figura No. 16) por el contrario los hombres y mujeres con reservas de hierro superiores muestran una diferencia significativa (Figura No. 15). Esto último comprueba la idea de que existe un comportamiento distinto al esperado en el cambio de concentración de hierro sérico en mujeres con reservas de hierro superiores, quienes están absorbiendo como si sus reservas de hierro fueran inferiores y tuvieran necesidad del mismo.

En las gráficas, que tienen únicamente dos series de datos (Figura No. 12-16) se muestran las barras de error negativas las cuales indican la variación que presentan los datos, esta es bastante alta debido a la dispersión de los valores observada entre los 10 sujetos de estudio en cada tiempo.

B. Hierro no ligado a transferrina (NTBI)

Para la cuantificación de NTBI se utilizó el método de fluorescencia de Breuer, William y Z. Cabantchik, 2001. Se estandarizó dicho método en la Universidad del Valle de Guatemala utilizando un fluorómetro de Applied Biosystems. Se utilizó dicho método ya que se demostró ser reproducible pues tienen baja variación dentro de una muestra y es exacto debido a la alta variación entre muestras (Jacobs, 2005).

Se utilizaron dos parámetros de análisis: máximo de concentración de NTBI y área bajo la curva para cada sujeto (Cuadro No. 7). Cada parámetro de los datos se analizó utilizando un ANOVA luego de verificar los supuestos (Anexos Cuadro No. 27). Se concluye que ninguno de los dos factores analizados tiene un efecto significativo sobre la concentración de NTBI, por lo que no existe diferencia significativa entre los cuatro grupos de estudio. Respecto a los

promedios presentados en el Cuadro No. 7, estos resultados tienen lógica pues las concentraciones de NTBI son muy similares o incluso iguales entre sí, pero no cumplen con la idea que las mujeres con reservas de hierro superiores forman menos NTBI que sus contrapartes masculinas.

Aún así se puede mencionar que se observan distintas tendencias en las gráficas mostradas en las Figuras No. 17 – 21. La primera de dichas tendencias es que tanto hombres como mujeres con reservas de hierro inferiores forman más NTBI que los grupos con reservas de hierro superiores, se observa en la Figura No. 17. Esto probablemente porque los grupos con reservas inferiores absorben altas concentraciones del hierro suplementado pero no tienen capacidad de utilizarlo por lo que mucho de este hierro queda como NTBI. Las mujeres con reservas de hierro inferiores son las que mayor cambio en la concentración de NTBI muestran, aún cuando la diferencia con el resto de los grupos no es significativa. Si se analiza la Figura No. 20 se puede observar que las mujeres con reservas de hierro superiores tienen un cambio de concentración de NTBI mayor al de los hombres con reservas de hierro superiores, esto no es lo esperado pues se creía que las mujeres iban a formar menos NTBI que sus contrapartes masculinas. Al comparar las reservas de hierro se puede observar que la diferencia es mayor entre hombres con reservas de hierro superiores e inferiores, tal como se observa en la Figura No. 19, que entre mujeres con reservas de hierro superiores e inferiores, Figura No. 18. Las mujeres con reservas de hierro superiores tienen mayor concentración de NTBI siguiendo la tendencia de las mujeres inferiores. Por último al comparar hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores (Figura No. 21) se puede observar un comportamiento bastante similar, indicando que ambos grupos de sujetos se comportan según lo esperado.

Un factor importante que se debe recordar es que las mujeres con reservas de hierro superiores absorbieron la misma cantidad de hierro que las mujeres con reservas de hierro inferiores, pero no formaron NTBI en la misma proporción. Al comparar la pendiente de la correlación hierro sérico- NTBI se puede observar que las mujeres con reservas de hierro superiores forman aproximadamente 1.77 veces menos NTBI que las mujeres con reservas de hierro inferiores. Esto indica que las mujeres con reservas de hierro superiores tiene un mecanismo que protege de la formación de NTBI, pues estas al absorber las altas cantidades y no utilizarlas se esperaría formen más NTBI. Si se comparan a las mujeres con reservas de hierro superiores con sus contrapartes masculinas se puede observar que las mujeres forman aproximadamente 2.33 veces menos NTBI que los hombres, esto se analiza a partir de las pendientes de las correlaciones Figura No. 22 y Figura No. 24.

En todas las gráficas con no más de dos series de datos se colocaron las barras de error, como se puede observar existe una alta variación de los datos. Esto es lo que puede causar que la diferencia observada no sea significativa.

C. Correlación hierro sérico - hierro no ligado a transferrina (NTBI)

Se calcularon las correlaciones existentes entre la concentración de hierro sérico y la concentración de NTBI para todos los sujetos de cada grupo de estudio. La relación que se esperaba obtener era de proporcionalidad directa pues el NTBI es una fracción del hierro sérico absorbido. Se realizaron correlaciones de Spearman y Pearson las cuales se presentan con sus respectivas probabilidades en los Cuadros No. 8-11. Así mismo se presenta la dispersión de los datos y su ajuste a una regresión lineal en las Figuras No. 22-25, en cada figura se incluye la ecuación de la regresión lineal.

En general se puede decir que todas las correlaciones obtenidas son positivas, en donde el aumento de hierro sérico va a causar un aumento de NTBI, es decir existe asociación entre las variables, tal como se esperaba. Todas las correlaciones determinadas son fuertes pues son mayores a 0.5 e inclusive la correlación observada en el grupo de mujeres con reservas de hierro inferiores es altamente fuerte pues es mayor a 0.9. Esto nos indica que conforme aumenta la concentración de hierro sérico aumenta la concentración de NTBI, aunque a diferentes proporciones en cada grupo.

Con los resultados presentados se puede observar que los grupos con reservas de hierro superiores tanto hombres como mujeres tienen una correlación más baja que los grupos con reservas de hierro inferiores tanto hombres como mujeres. La alta correlación en los grupos con reservas de hierro inferiores se debe a que conforme se incrementa la concentración de hierro sérico se forma más NTBI, por el contrario en los grupos con reservas superiores los hombres no necesitan aumentar drásticamente la concentración de hierro sérico antes de formar NTBI y las mujeres necesitan un cambio mayor en hierro sérico antes de formar NTBI disminuyendo así las correlaciones.

Se puede observar que las mujeres con reservas de hierro inferiores ($m = 0.0172$) forman mayores concentraciones de NTBI que las mujeres con reservas de hierro superiores ($m = 0.0097$). Esto se puede deber a que las mujeres con reservas de hierro superiores aún cuando su cambio de concentración de hierro sérico es igual al de mujeres con reservas de hierro inferiores, tienen algún mecanismo que previene que formen NTBI, el cual no existe en mujeres con reservas de hierro inferiores por lo que al absorber altas concentraciones del hierro suplementado y no lograr utilizarlo forman NTBI rápidamente. Se puede observar que los

hombres con reservas de hierro superiores ($m = 0.0226$) forman más rápidamente NTBI que los que tienen reservas de hierro inferiores ($m = 0.0175$), esto se puede deber a que en los últimos la suplementación debe sobrepasar las necesidades antes de formar NTBI. En cuanto a hombres y mujeres con reservas de hierro inferiores estos forman NTBI a la misma proporción que aumenta la concentración de hierro sérico y a la misma velocidad. Como ya se mencionó anteriormente si se comparan mujeres con reservas de hierro superiores ($m = 0.0097$) contra los hombres con reservas de hierro superiores ($m = 0.0226$), se puede observar que las mujeres forman aproximadamente 2.33 veces menos NTBI que los hombres. Lo cual es consistente con resultados previos (Schümann, 2011), indicando que existe algún sistema de protección en mujeres con reservas de hierro superiores que las previene de formar NTBI. Es importante mencionar que se ha comprobado en estudios previos que los hombres acumulan más hierro que las mujeres (Harrison, 2010), lo que puede causar que bajas cantidades de hierro formen NTBI a diferencia de las mujeres.

En general se ha observado efecto del sexo en distintas patologías del hierro, por ejemplo que los hombres padecen más de hemocromatosis que las mujeres. (Harrison, 2010). Así mismo se ha observado que la concentración de ferritina es mayor en hombres que en mujeres (Berglund, 2011).

D. Comparación con estudios anteriores

Para determinar que las cuantificaciones se realizaron de la manera adecuada y que el método se estandarizó exitosamente se comparó el coeficiente de correlación de Pearson y la pendiente de la correlación entre hierro sérico y NTBI. En esta comparación se incluyeron únicamente los dos grupos de estudios que se estaban repitiendo los cuales eran hombres con reservas de hierro superiores y mujeres con reservas de hierro inferiores, las características de dichos sujetos de estudio se presentan en Anexos Cuadros No.19-21. La comparación se puede observar en el Cuadro No. 13, al analizarlo se encontró correspondencia entre los parámetros comparados, inclusive con una correlación de Pearson mejor en el estudio actual que en el anterior siendo esta la del grupo de mujeres con reservas de hierro inferiores.

En cuanto al grupo de hombres con reservas de hierro superiores el análisis realizado en Guatemala obtuvo una pendiente menor, indicando un menor cambio de NTBI por cambio de hierro y es por lo mismo que el coeficiente de correlación de Pearson es menor si se compara con el análisis previo. En el grupo mujeres con reservas de hierro inferiores la pendiente del análisis realizado en Guatemala es un poco menor que la del análisis previo pero aún así son

muy similares e inclusive el coeficiente de correlación de Pearson del análisis realizado en Guatemala es mejor que el anterior.

Si se analiza por separado los resultados de hierro sérico y NTBI del estudio anterior y el estudio actual se pueden observar distintas relaciones. Se observa que el cambio en las concentraciones de hierro sérico en el tiempo después de la suplementación con sulfato ferroso es un fenómeno altamente reproducible y como los análisis se están realizando en el mismo laboratorio de Innsbruck, Austria con el mismo método y por el mismo técnico la tendencia observada en el estudio actual fue muy similar que la del estudio anterior dando resultados consistentes e inclusive en hombres con reservas de hierro superiores (Figura No. 26 Anexos) los valores fueron muy similares. El grupo de mujeres con reservas de hierro inferiores (Figura No. 27 Anexos) los valores siguen una tendencia similar excepto en el tiempo 270 minutos donde los resultados del estudio anterior muestran un aumento en la concentración, en general las concentraciones de hierro sérico del estudio anterior son mayores que el estudio actual. En cuanto a la cuantificación de las concentraciones de NTBI ya que se montó el método en un nuevo laboratorio en Guatemala dándole así más fuentes de variación pues en el estudio anteriores dicha cuantificación se realizó en Utrecht. Se puede observar que en hombres con reservas de hierro superiores (Figura No. 28 Anexos) aún cuando la tendencia es similar que el estudio anterior, el estudio anterior tuvo concentraciones mayores de NTBI y se formó un pico más definido en el tiempo 180 minutos. En mujeres con reservas de hierro inferiores (Figura No. 29 Anexos) la tendencia sigue siendo la misma pero los valores del estudio anterior son mayores. Aún así los resultados muestran correspondencia indicando que se realizó una estandarización del método adecuada.

Se lograron todos los resultados esperados. Se pudo determinar que aún cuando la diferencia obtenida de concentración de NTBI no fue significativa se observa tendencia de los valores. Se pudo determinar una diferencia significativa en la concentración de hierro sérico entre mujeres y hombres con reservas de hierro superiores. Se pudo determinar que existe una diferencia significativa en la concentración de hierro sérico luego de la suplementación con sulfato ferroso tal como era esperada en hombres. Esto no sucedió en el grupo de mujeres ya que las mujeres con reservas de hierro superiores se comportaron como mujeres con reservas de hierro inferiores, indicando que existe algún mecanismo que las hace absorber como si sus reservas fueran inferiores. Se determinó que existía relación entre el cambio de concentración de NTBI y el hierro sérico en todos los grupos de estudio, en algunos grupos dicha relación fue más fuerte que en otros.

Un factor que pudo intervenir en los resultados fueron las edades de los grupos. Aún cuando entre sexos los grupos de edades son similares existe diferencia con el sexo opuesto. Esto se debe principalmente a que para encontrar a los sujetos de estudio de los grupos de mujeres se buscaron edades avanzadas en los que las mujeres hayan pasado ya la menopausia y tengan así reservas superiores de hierro. En hombres no fue el caso y se utilizaron sujetos de estudio de edades menores. Este factor se trató de disminuir en medida de lo posible durante las etapas de reclutamiento de sujetos pero aún así las diferencias pueden afectar los resultados.

VI. CONCLUSIONES

- A. El lograr montar exitosamente el método de detección de NTBI permitió determinar los cambios de concentración de NTBI en respuesta a la suplementación con 100mg de sulfato ferroso a hombres y mujeres con reservas superiores e inferiores de hierro.
- B. Se puede concluir que existe un efecto de la interacción sexo- reservas de hierro sobre la concentración de hierro sérico, pues se determinó una diferencia significativa entre los cambios de concentración de hierro sérico en mujeres con reservas de hierro superiores y hombres con reservas de hierro superiores.
- C. Se encontró que no existe un efecto significativo de las reservas de hierro sobre la concentración de hierro sérico, en mujeres.
- D. Se determinó que existe un efecto significativo de las reservas de hierro sobre la concentración de hierro sérico, en hombres. Indicando un comportamiento esperado según sus reservas de hierro en hombres.
- E. Se concluye que no existe ningún efecto significativo del sexo ni de las reservas de hierro sobre la concentración de NTBI. Aún así se observan tendencias interesantes que se deben corroborar con estudios posteriores.
- F. Existe asociación positiva y alta entre las dos variables analizadas concentración de hierro sérico y concentración de NTBI, indicando que un cambio en hierro sérico va a causar un cambio en NTBI
- G. Los grupos con reservas de hierro superiores tienen una correlación más baja que los grupos con reservas de hierro inferiores. La alta correlación observada en los grupos con reservas de hierro inferiores se debe a que conforme aumenta la concentración de hierro sérico se forma más NTBI; por el contrario los grupos con reservas de hierro superiores no necesitan un cambio alto en la concentración de hierro sérico para formar NTBI causando una correlación baja.
- H. Los hombres con reservas superiores de hierro forman NTBI más rápidamente que los hombres con reservas inferiores, esto probablemente porque los primeros no tienen necesidad del hierro y muy poco de lo que absorben es realmente utilizado causando formación rápida de NTBI.

- I. Las mujeres con reservas de hierro superiores forman aproximadamente 2.33 veces menos NTBI que sus contrapartes masculinas. Lo que indica que existe algún mecanismo protector en mujeres con reservas de hierro superiores

VII. RECOMENDACIONES

- A. Trabajar con agua doble desionizada, evitar utilizar únicamente agua destilada pues afecta los resultados de los análisis.
- B. Verificar que los sujetos no padezcan de ninguna patología que altere los niveles de hierro como hemocromatosis o bien tener un intervalo de 2 sujetos de estudio extra por si se comprueba la existencia de una patología en alguno de los sujetos iniciales, no se afecte el número de sujetos de estudio.
- C. Repetir el estudio o realizar un estudio complementario con un número de muestra mayor en medida de lo posible, para determinar si las tendencias observadas con respecto a la formación de NTBI son estadísticamente significativas.
- D. Tratar de disminuir el factor de edad entre los grupos de estudio para evitar que esto afecte los resultados.
- E. Realizar un estudio complementario con niños para determinar si la diferencia de sexo comprobado en esta investigación está presente desde tempranas edades.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aikawa, Masamichi. *et al.* 1988. «Fine structure of malaria parasites in the various stages of development». In: Scheibel LW, Sherman IW, eds. Principles and practice of malariology. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone. 97–130.
- Al-Nasser, Ibrahim y M. Crompton. 1986. «The reversible Ca^{2+} -induced permeabilization of rat liver mitochondria». *Biochemistry Journal* 239:19–29.
- al-Refaie, Faris, *et al.* 1992. «Serum non-transferrin-bound iron in beta-thalassaemia major patients treated with desferrioxamine and L1». *British Journal of Haematology*. 82:431–6.
- Bacon, Bruce; R. O'Neill y RS.Britton. 1993. «Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload». *Gastroenterology*. [United States of America] 105:1134–40.
- Beard, John. 2006. «Iron. In: Bowman BA, Russell RM. Present knowledge in nutrition». *ILSI Press* [Washington DC]. 430- 444.
- Berglund, Marika; *et al.* 1994. «Intestinal absorption of Dietary Cadmium in Women Depends on Body Iron Stores and Fiber Intake». *Environmental Health Perspectives*.102: 1058-1066.
- Berglund, Marika, *et al.* 2011. «Gender and age differences in mixed metal exposure and urinary excretion». *Environmental Research*.111: 1271-1279.
- Borch-Iohnsen, Berit; *et al.* 2009. «Regulation of the iron metabolism». *Tidsskr Nor Laegeforen*. 129(9):858-62.
- Breuer, William; S. Epsztejn y Z. Cabantchik. 1996. «Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells». *FEBS Letters*.382(3):304–8.

- Breuer, William; *et al.* 2000. «The assessment of serum non transferrin bound iron in chelation therapy and iron supplementarion». *Blood*.95(9):2975-2982.
- _____; Hershko, C.; Cabantchik, Z. 2000a. «The importance of non- transferrin bound iron in disorders of iron metabolism». *Transfusion Science*. 23: 185-192.
- Breuer, William y Z. Cabantchik. 2001. «A Fluorescence-Based One-Step Assay for Serum Non-Transferrin-Bound Iron». *Analytical Biochemistry*. [Israel]. (299):194–202.
- Breuer, William; *et al.* 2012. «Non- transferrin bound iron in Thalassemia: differential detection of redox active forms in children and older patients». *American Journal of Hematology*. 87: 55-61.
- Brissot, Pierre; *et al.* 2012. «Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity». *Biochimica et Biophysica Acta*. 1820: 403-410.
- Bunn, H. 2011. En Goldman L y Schafer, Al. Cecil Medicine. 24ava edición. «Approach to the anemias». Philadelphia, Elsevier.
- Cabatchnick, loav; *et al.* 2005. «LPI-labile plasma iron in iron overload». *Best Practice and Research Clinical Haematology*. 18: 277-287.
- Ceccarelli, Daniela, *et al.* 1995. «Relationship between free iron level and rat liver mitochondrial dysfunction in experimental dietary iron overload». *Biochem Biophys Res Commun*. 209:53–9.
- Crompton, Martin y A. Cost. 1988. «Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload». *European Journal of Biochemisty*. 178: 489–501.
- Desnutrición infantil (Crónica y aguda) en Guatemala. 2008. Secretaria de seguridad alimentaria y nutricional de Guatemala.

- Frei, Balz; K. Winterhalter y C. Richter. 1985. «Quantitative and mechanistic aspects of the hydroperoxide-induced release of Ca^{2+} from rat liver mitochondria». *European Journal of Biochemistry*.149:633–9.
- Fuqua, Brie; C. Vulpe; G. Anderson. 2012. «Intestinal Iron Absorption». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 26(2-3):115-119.
- Gabay, Tamir y H. Ginsburg.1993. «Haemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate—A possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites». *Experimental Parasitology*. [Israel] 77(3):261–72.
- Gera, Tarun y H. Sachdev. 2002. «Effect of iron supplementation on incidence of infectious illness in children: Systematic review». *British Medical Journal*. [India] 325(7373):1142.
- Gosriwatana, Itsaraet, *et al.* 1999. «Quantification of Non-Transferrin-Bound Iron in the Presence of Unsaturated Transferrin». *Analytical Biochemistry*. [London]. (273): 212–220.
- Halliwell, Barry y J. Gutteridge. 1992. «Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation». *FEBS Letter*. 307:108–12.
- Harrison-Findik, Duygu. 2010. «Gender-related variations in iron metabolism and liver Diseases» *World Journal Hepatology*. 27; 2(8): 302-310.
- Heales, Simon, *et al.* 1995. «Depletion of brain glutathione is accompanied by impaired mitochondrial function and decreased N-acetyl aspartate concentration». *Neurochemistry Research*.20:31–8.
- Hershko, Chaim; G. Link y A. Pinson. 1987. «Modification of iron uptake and lipid peroxidation by hypoxia, ascorbic acid, and α -tocopherol in iron-loaded rat myocardial cell cultures». *Journal of Laboratory Clinical Medicine*.110:355–61.
- Hershko, Chaim. 1993. «Iron, infection and immune function». *Proc Nutrition Society*.52:165–74.

- Hershko, Chaimy T. Peto. 1998. «Deferoxamine inhibition of malaria is independent of host iron status». *Journal of Experimental Medicine*. 168:375–87.
- Hershko, Chaim. 2007. «Mechanisms of iron toxicity» *Food and Nutrition Bulletin*. [Naciones Unidas].28(4): Suplemento.
- Hoppe, Michael; Hulthén, L. y Hallberg, L. 2004. «The validation of using serum iron increase to measure iron absorption in human subjects». *British Journal of Nutrition*.92:458-488.
- Houglum, Karl, *et al.* 1990. «Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload». *Journal of Clinical Investestigation*.86:1991–8.
- Hutchinson, Carol, *et al.* 2004. «Oral Ferrous Sulphate leads to a marked increase in pro-oxidant nontransferrin- bound iron». *European Journal of Clinical Investigation*.34: 782-784.
- Jacobs, Esther, *et al.* 2005. «Results of an international round robin for the quantification of serum non-transferrin-bound iron: Need for defining standardization and a clinically relevant isoform». *Analytical Biochemistry* 341:241–250.
- Jason, John, *et al.* 2001. «Cytokines and malaria parasitemia». *Clinical Immunology*.100:208–18.
- Jensen, Peter, *et al.* 2003. «Relationship between hepatocellular injury and transfusional iron overload prior to and during iron chelation with desferrioxamine: A study in adult patients with acquired anemias». *Blood*101:91–6.
- Jensen, Peter, *et al.* 2003. «Evaluation of myocardial iron by magnetic resonance imaging during iron chelation therapy with desferrioxamine: Indication of close relation between myocardial iron content and chelatable iron pool». *Blood*101:4632–9.
- Kadiiska, Maria, *et al.* 1995. «Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation». *Journal Clinical Investigation*.96:1653–7.

- Kippler, María; *et al.* 2007. «Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women». *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222: 221-226.
- Kippler, María; *et al.* 2009. «Factors influencing intestinal cadmium uptake in pregnant Bangladeshi women – A prospective cohort study». *Environmental Research*.109: 914-921.
- Kippler, María; *et al.*2010. «Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus». *Toxicology letters*. 192: 162-168.
- Klausner, Richard; T. Rouault y J. Harford. 1993. «Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism». *Cell*.72:19–28.
- Kolb, A. *et al.* 2008. «Non-transferrin bound iron measurement is influenced by chelator concentration». *Analytical Biochemistry*.
- Le Lan, Caroline, *et al.*2005. «Redox active plasma iron in C282Y/ C282Y hemochromatosis». *Blood* 105:4527–31.
- Link, Gabriela, *et al.* 1989. «Iron loading modifies the fatty acid composition of cultured rat myocardial cells and liposomal vesicles: Effect of ascorbate and α -tocopherol on myocardial lipid peroxidation». *Journal of Laboratory Clinical Medicine*.114:243–9.
- Link, Gabriela; A. Pinson y C. Hershko. 1993. «Iron loading of cultured cardiac myocytes modifies sarcolemmal structure and increases lysosomal fragility». *Journal Laboratory Clinical Medicine*.121:127–34.
- Link, Gabriela, *et al.* 1998. «Mitochondrial respiratory enzymes are a major target of iron toxicity in rat heart cells». *Journal of Laboratory Clinical Medicine*.131:466–74.
- Loréal, Olivier; *et al.* 2002. «Aceruloplasminemia: new clinical, pathophysiological and therapeutic insights». *Journal of Hepatology*. 36: 851-856.

- Loyevsky, Mark, *et al.* 1999. «Chelation of iron within the erythrocytic *Plasmodium falciparum* parasite by iron chelators». *Molecular Biochemistry Parasitology*.101:43–59.
- Mak, Tong y WB. Weglicki. 1985. «Characterization of iron-mediated peroxidative injury in isolated hepatic lysosomes». *Journal of Clinical Investigation*.75:58–63.
- Marx, Joannes y R. Hider.2002. «Iron: an essential but potentially harmful nutrient» *European Journal of Clinical Investigation*.[London]. 32(1): 1–2.
- McKnight, Robert y F. Hunter. 1966. «Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous ion. II. Composition and enzymatic activity». *Journal of Biological Chemistry*.241:2757–65.
- Meltzer, Helle; *et al.*2010. «Low iron stores are related to higher blood concentrations of manganese, cobalt and cadmium in non-smoking, Norwegian women in the HUNT 2study». *Environmental Research*.110: 497-504.
- Mulero, Victoriano y J. Brock. 2005. «Disturbance in iron homeostasis. In: Weiss G, Gordeuk VR, Hershko C, eds. Anemia of chronic disease».[United States of America]. *Taylor & Francis*.105–26.
- Muñoz, Manuel; I. Villar; J. García-Erce. 2009. «An update in iron physiology». *World Journal of Gastroenterology*. 15(37): 4617-4626.
- Nyakeriga, Alice, *et al.* 2004. «Malaria and nutritional status in children living on the coast of Kenya». *American Journal of Clinical Nutrition*.80:1604–10.
- Nyakeriga, Alice, *et al.* 2005. «Cytokine mRNA expression and iron status in children living in a malaria endemic area». *Scandinavia Journal of Immunology*.61:370–5.
- Nyholm, Sussane, *et al.* 1993. «Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators». *Journal Biological Chemistry*.268:26200–5.

- Oppenheimer, Stephen. 2001. «Iron and its relation to immunity and infectious disease». *Journal of Nutrition*.131:616S–35S.
- Orozco, Monica, *et al.* 2012. «Studies on variation in fecal reactive oxidative species generation in free-living populations in Guatemala». *Pure Appl. Chemistry*. 84(2):325-333.
- Pitkainen, Saul y B. Robinson. 1996. «Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase». *Journal of Clinical Investigation*.98 (2):345–51.
- Pollack, Siniy y V. Schnelle. 1988. «Inability to detect transferrin receptors on *P. falciparum* parasitized red cells». *British Journal of Haematology*.68:125–9.
- Porter, John, *et al.* 1996. «Kinetics of removal and reappearance of non-transferrin- bound plasma iron with deferoxamine therapy». *Blood*.88:705–13.
- Pouvelle, Bruno, *et al.* 1991. «Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites». *Nature*353:73–5.
- Prentice, Andrew. 2008. «Iron Metabolism, Malaria, and Other Infections: What Is All the Fuss About?» *The Journal of Nutrition*. 138: 2537-2541.
- Randell, Edward, *et al.* 1994. «Uptake of non-transferrin-bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron». *Journal of Biological Chemistry*.269(23):16046–53.
- Richter, Christopher, *et al.* 1995. «Oxidants in mitochondria: From physiology to diseases». *Biochimica et Biophysica Acta*.1271(1):67–74.
- Romero-Abal, María E., *et al.* 1995. «Hematological status of preschool and school children in urban and rural areas of Guatemala. *Food and Nutrition Bulletin*. 16: 60-66.

- Rothman, Ronald; A. Serroni y J. Farber. 1992. «Cellular pool of transient ferric iron, chelatable by deferoxamine and distinct from ferritin that is involved in oxidative cell injury». *Molecular Pharmacology*. 42:703–10.
- Sanchez- Lopez, Rosana y K. Haldar. 1992. «A transferrin-independent iron uptake activity in *Plasmodium falciparum*-infected and uninfected erythrocytes». *Molecular and Biochemical Parasitology*. [United States of America]. 55(1-2):9–20.
- Sazawal, Sunil, *et al.* 2006. «Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: Community-based, randomised, placebo-controlled trial». *The Lancet*. 367(9505):133–43.
- Schümann, Klaus, *et al.* «On risks and benefits of iron supplementation recommendations of iron intake revisited». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 21: 147-168.
- Schümann, Klaus, *et al.* « Impact of iron status and oral iron challenges on circulating non-transferrin-bound iron (NTBI) in healthy Guatemalan males ». *Nutrition* (submitted for publication).
- Schümann, Klaus, *et al.* «Oral administration of ferrous sulphate, but not iron polymaltose and sodium iron EDTA, results in a substantial increase in non-transferrin-bound iron in healthy men ». *Food Nutrition Bulletin* (submitted for publication).
- Schümann, Klaus, *et al.* «Detectable increases in circulating non-transferrin-bound iron are observed after oral administration of ferrous sulfate, sodium iron EDTA and iron polymaltose in women with marginal or depleted iron stores». En preparación.
- Singh, Surinder; R. Hider y J. Porter. 1990. «A direct method for quantification of non-transferrin bound iron (NTBI)». *Analytical Biochemistry*. 186(2):320–3.
- Singhi, Sunity y A. Baranwal. 2003. «Acute iron poisoning: Clinical picture, intensive care needs and outcome». *Indian Pediatrics*. [India]. 40(12):1177–82.

- Stadtman, Earl. 1990. «Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences». *Free Radical Biology and Medicine*.9(4):315–25.
- Stein, Martin, *et al.* 1976. «Acute iron poisoning in children». *The Western Journal of Medicine*. [United States of America] 125:289–97.
- Tallkvist, Jonas; Bowlus, C. y Lönnerdal, B. 2001. «DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes». *Toxicology Letters*. 122:171-177.
- Tielsch, James, *et al.* 2006. «Effect of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on preschool child mortality in southern Nepal: Community-based, cluster-randomised, placebo controlled trial». *The Lancet*. 367(9505):144–52.
- Tsafack, Appolinaire, *et al.* 1996. «Mode of action of iron (III) chelators as anti-malarials. IV. Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoylhydrazonederivatives». *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*.127:574–82.
- Van der A, Daphne; *et al.*2006. «Non- Transferrin- Bound Iron and Risk of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women». *Circulation*. 113: 1942-1949.
- Vahter, Marie; *et al.* 2007. « Gender differences in the disposition and toxicity of metals». *Environmental Research*.104:85-95.
- _____; *et al.* 2007a. «Implications of gender differences for human health risk assessment and toxicology». *Environmental Research*.104: 70-84.
- Wagstaff, Michael, *et al.* 1985. «Free iron and iron toxicity in iron overload». *British Journal of Haematology*.61:566–7.
- Zager, Richard. 1996. «Mitochondrial free radical production induces lipid peroxidation during myohemoglobinuria». *Kidney International*. [United States of America].49:741–51.
- Zhang, Yin, *et al.* 1990. «The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase». *The Journal of Biological Chemistry*. [United States of America].265(27): 16330-6.

IX. ANEXOS

Consentimiento informado mujeres fase tamizaje

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD E
IMPEDIMENTOS Y ALTERACIONES METABOLICAS -CESSIAM**
17 Av. 16-89 (interior) zona 11
Teléfono /Fax 24733942
CeSSIAM@guate.net.net

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
TITULO DE LA INVESTIGACIÓN**

**Respuesta Comparativa del NTBI al Tratamiento con Sulfato Ferroso en Mujeres con
Reservas Bajas y Elevadas de Hierro**

FASE TAMIZAJE

INTRODUCCIÓN

En estudios que hemos llevado a cabo en los últimos años en Guatemala, hemos encontrado que al tratar a hombres y mujeres con las mismas dosis de hierro, similares a las que se usan para tratar la anemia, no obtenemos los mismos resultados. Esto puede deberse a que los hombres no tienen anemia y por no tener menstruación tienen buenas reservas de hierro, en cambio las mujeres, debido a la menstruación frecuentemente tienen anemia y su reserva de hierro es pobre.

Para tener una mejor idea de cómo responde el cuerpo al tratamiento de hierro, queremos comparar los resultados de las pruebas de laboratorio que nos indican como están los depósitos de hierro en el cuerpo y cuanto hierro se libera a la sangre después de tomar tratamiento con hierro, pero esta vez en dos grupos de mujeres, uno con reservas de hierro bajas y otro grupo de mujeres con reservas buenas. Esto lo mediremos por medio de una prueba de laboratorio que se llama NTBI o sea hierro no ligado a transferrina; esta es una sustancia que se ocupa de transportar el hierro a todos los lugares donde su cuerpo pueda necesitar hierro, pero algunas veces hay tanto hierro que no hay suficiente transferrina para llevarla y a ese hierro si su transporte es a lo que se llama NTBI.

Propósitos del Estudio.

1. Determinar si el FeSO₄ en dosis de 100 mg en dosis única produce una respuesta de NTBI por arriba del basal en un grupo de mujeres con niveles de ferritina bajos y normales.
2. Comparar las áreas bajo la curva obtenidas para NTBI en un intervalo de 270 minutos después de la ingesta de hierro entre el grupo de mujeres con ferritina baja y normal.
3. Comparar el patrón de respuestas del hierro sérico del grupo de mujeres con estado marginal y normal de hierro.

Procedimientos a seguir:

El estudio en su totalidad durará 2 días no consecutivos. En el primer día, durante la fase de tamizaje, se le pedirá que nos permita sacarle una muestra de sangre de 5 ml, o sea una cantidad igual a una cucharada, para poder determinar su nivel de ferritina. La ferritina es una prueba de laboratorio que nos dice como esta su reserva de hierro. Si sus niveles de ferritina caen dentro de los límites de reservas de hierro en los extremos inferior y superior de todo el grupo que está siendo tamizado, entonces usted podrá participar voluntariamente en el resto del estudio, si no le agradeceremos su intención de ayudarnos y le daremos su resultado de hemoglobina que le dice si tiene anemia o no.

Es posible que también llevemos a cabo otros dos análisis en su muestra de sangre inicial: el análisis de Receptores de Transferrina y/o Saturación de Transferrina.

Después de la extracción de sangre usted recibirá un pequeño desayuno.

Molestias y riesgos:

Un riesgo menor es el de la extracción de sangre, ya que si sus venas son frágiles puede quedar un morete. Las molestias serán que se comprometerá a estar disponible el día asignado para la toma de la muestra, lo cual puede afectar su horario y que además deberá estar en ayunas hasta después de la toma de la muestra.

Alternativas terapéuticas:

Ya que usted es una persona aparentemente sana, no hay una alternativa terapéutica que ofrecerle. Pero si los resultados de las pruebas demuestran que usted está anémico, pero no deficiente de hierro, es decir su ferritina no esta baja nosotros le ofreceremos un tratamiento terapéutico similar al que se dará en el estudio.

Exclusiones:

Usted no podrá participar en el estudio si tiene alguno de los siguientes inconvenientes: alguna enfermedad crónica diagnosticada (diabetes, problemas circulatorios, etc.); si no puede comprometerse a participar durante los días del estudio; si después de recibir el sulfato de hierro manifiesta que no tolera el jarabe o si ha tenido malas experiencias previas con el sulfato de hierro; si sus venas presentan demasiada fragilidad a la extracción de sangre, si está tomando otros tratamientos con hierro y otros oxidantes y si no firma el consentimiento informado. Tampoco podrá participar si no garantiza poder presentarse a la extracción de sangre sin haber consumido bebidas alcohólicas **24 horas** antes del estudio.

Beneficios:

Usted está ayudando a que se entiendan mejor los efectos que los tratamientos con hierro tienen sobre nuestra población, específicamente en aquellas mujeres que tienen reservas bajas y superiores de hierro. Los resultados de este estudio podrían en el futuro ayudar entender el efecto que tienen las reservas de hierro de una persona en la forma de manejar el hierro suplementado.

Remuneración:

Por su participación en el tamizaje para determinar ferritina y hematología, no recibirá compensación económica, únicamente los resultados de sus pruebas de laboratorio. Sin embargo si usted es invitada a participar en el estudio de cuatro semanas, por las molestias causadas usted recibirá una remuneración de aproximadamente 75.0 USA \$ el último día del estudio.

Indemnizaciones:

Si usted necesita algún medicamento para contrarrestar los efectos secundarios del tratamiento, el estudio cubrirá el costo de los mismos. Si usted necesita un tratamiento para efectos no asociados con el tratamiento suministrado no nos hacemos responsables por los mismos.

Compensación por lesiones:

Desafortunadamente en Guatemala no existen seguros con cobertura para extracciones de sangre, por lo que no le podemos ofrecer compensaciones por esta causa. No se espera que un tratamiento con sulfato de hierro incurra en lesiones secundarias que requieran tratamiento médico, por lo que no se ofrece cobertura médica.

Gastos:

Usted no tiene que incurrir en ningún gasto por concepto de pruebas de laboratorio en sangre, ni pagar el jarabe o el tratamiento de hierro que se le pueda ofrecer en caso de estar anémico. Los alimentos que recibirán también son cortesía del proyecto.

Confidencialidad:

La información obtenida en el estudio será codificada numéricamente, su nombre solo será conocido por los investigadores en contacto con usted. Los resultados serán publicados eventualmente pero codificados, nunca aparecerán los nombres. Tampoco se le harán otras pruebas de laboratorio que usted no nos autorice en este documento.

Contactos: Si usted tiene alguna pregunta sobre los procedimientos o cambios de citas realizadas con nosotros puede contactar a Licda. María Eugenia Romero Abal al teléfono 24733942. Si usted tiene dudas sobre cualquier aspecto de derechos humanos de los participantes en este estudio, por favor contacte al Dr. Fernando Beltranena (Director del Comité de Derechos Humanos) al teléfono 23310928. La dirección de nuestra oficina donde también puede contactarnos está en el membrete de este documento.

Participación voluntaria:

Los investigadores estamos en libertad de dar por terminada la participación de usted si el consentimiento no está firmado, si no cumple con su cita, si es imposible tomar muestras de sangre adecuadas o si se consume bebidas alcohólicas antes de cualquier día de evaluación.

Consentimiento:

Yo _____ he conocido los objetivos de este estudio, entiendo que es un estudio de investigación y entiendo sus riesgos y beneficios así como la confidencialidad que me ofrecen. Sé que el estudio es gratuito y que no debo pagar un solo centavo por participar pero recibiré los resultados de la prueba de hematología y consejo médico en caso padezca de alguna anomalía hematológica. Entiendo que no hay seguro que cubra ninguna eventualidad médica no relacionada con el tratamiento que se me dará. Voluntariamente quiero participar en el estudio y entiendo que en cualquier momento que yo quiera me puedo retirar del estudio sin represalias de ningún tipo.

Nombre del Participante _____

Número de Cédula _____ Fecha _____

Dirección _____

Investigador _____

Firma _____

Cedula _____

Consentimiento informado mujeres fase experimental

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD E
IMPEDIMENTOS Y ALTERACIONES METABOLICAS -CESSIAM**
17 Av. 16-89 (interior) zona 11
Teléfono /Fax 24733942
CeSSIAM@guate.net.net

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
TITULO DE LA INVESTIGACIÓN**

**Respuesta Comparativa del NTBI al Tratamiento con Sulfato Ferroso en Mujeres con
Reservas Bajas y Elevadas de Hierro**

FASE EXPERIMENTAL

INTRODUCCIÓN

En estudios que hemos llevado a cabo en los últimos años en Guatemala, hemos encontrado que al tratar a hombres y mujeres con las mismas dosis de hierro, similares a las que se usan para tratar la anemia, no obtenemos los mismos resultados. Esto puede deberse a que los hombres no tienen anemia y por no tener menstruación tienen buenas reservas de hierro, en cambio las mujeres, debido a la menstruación frecuentemente tienen anemia y su reserva de hierro es pobre.

Para tener una mejor idea de cómo responde el cuerpo al tratamiento de hierro, queremos comparar los resultados de las pruebas de laboratorio que nos indican como están los depósitos de hierro en el cuerpo y cuanto hierro se libera a la sangre después de tomar tratamiento con hierro, pero esta vez en dos grupos de mujeres, uno con reservas de hierro bajas y otro grupo de mujeres con reservas buenas. Esto lo mediremos por medio de una prueba de laboratorio que se llama NTBI o sea hierro no ligado a transferrina; esta es una sustancia que se ocupa de transportar el hierro a todos los lugares donde su cuerpo pueda necesitar hierro, pero algunas veces hay tanto hierro que no hay suficiente transferrina para llevarla y a ese hierro si su transporte es a lo que se llama NTBI.

Propósitos del estudio.

1. Determinar si el FeSO₄ en dosis de 100 mg en dosis única produce una respuesta de NTBI por arriba del basal en un grupo de mujeres con niveles de ferritina bajos y normales.
2. Comparar las áreas bajo la curva obtenidas para NTBI en un intervalo de 270 minutos después de la ingesta de hierro entre el grupo de mujeres con ferritina baja y normal.
3. Comparar el patrón de respuestas del hierro sérico del grupo de mujeres con estado marginal y normal de hierro.

Procedimientos a seguir:

El estudio durará 1 día durante el cual se le pedirá que tome una dosis de 100 mg de hierro en forma de FeSO₄ o sea el tratamiento que dan en los puestos de salud para tratar la anemia.

Colección de muestras de sangre: Los estudios se llevarán a cabo cualquier día de la semana en el que sea de su conveniencia; ese día usted deberá presentarse en ayunas al laboratorio de CESSIAM, el ayuno deberá ser de al menos 12 horas. Se le extraerá sangre únicamente un día y luego se extraerán 4 muestras cada 90 minutos después de haber ingerido el suplemento, es decir en tiempos 0, 90, 180 y 270 minutos. Durante los primeros 180 minutos solo podrá tomar agua, después de este periodo se le ofrecerá un desayuno y al coleccionar la siguiente muestra de sangre se le ofrecerá un almuerzo.

En la sangre se harán las siguientes pruebas: hierro no ligado a transferrina (NTBI) y hematología completa incluyendo ferritina. El análisis de NTBI se llevará a cabo fuera del país, por lo que no le ofrecemos los resultados inmediatamente en el caso de que usted los quiera conocer, sin embargo no son pruebas comunes de laboratorio, por lo que carecen de valor para usted o su médico como diagnósticas. Excepto en el caso de la hematología completa y ferritina, ya que estas si le ayudan al médico a hacer diagnóstico de su estado de hierro.

Experiencia anterior con el tratamiento: Los suplementos de hierro que usted tomará una vez por semana son un tratamiento común usado en Guatemala para tratar la anemia de niños y mujeres embarazadas principalmente, por lo que no representan un riesgo para su salud ya que es un tratamiento común y conocido en Guatemala y el mundo.

Molestias y riesgos: La dosis de hierro puede provocar en algunas personas problemas gástricos, como náusea, vómitos en el peor de los casos. El color de las heces se pondrá oscuro pero esto es normal y no representa señal de peligro. Otro riesgo menor es el de la extracción de sangre, ya que si sus venas son frágiles puede quedar un morete. Las molestias serán que se comprometerá a estar disponible para la toma de muestras y del jarabe, lo cual puede afectar su horario y que además deberá estar en ayunas hasta después de la toma de muestras. Además deberá permanecer en las instalaciones de CESSIAM asignadas para el proyecto para asegurar el correcto intervalo de extracción de sangres, durante las cuatro horas y medio que dura el día de trabajo.

Alternativas terapéuticas: Ya que usted es una persona aparentemente sana, no hay una alternativa terapéutica que ofrecerle. Pero si los resultados de las pruebas demuestran que usted está anémico, pero no deficiente de hierro, es decir su ferritina no esta baja nosotros le ofreceremos un tratamiento terapéutico similar al que se dará en el estudio.

Exclusiones: Usted no podrá participar en el estudio si tiene alguno de los siguientes inconvenientes: alguna enfermedad crónica diagnosticada (diabetes, problemas circulatorios, etc.); si no puede comprometerse a participar durante los días del estudio; si después de recibir el sulfato de hierro manifiesta que no tolera el jarabe o si ha tenido malas experiencias previas con el sulfato de hierro; si sus venas presentan demasiada fragilidad a la extracción de sangre, si está tomando otros tratamientos con hierro y otros oxidantes y si no firma el consentimiento informado. Tampoco podrá participar si no garantiza poder presentarse a la extracción de sangre sin haber consumido bebidas alcohólicas **24 horas** antes del estudio.

Beneficios: Usted está ayudando a que se entiendan mejor los efectos que los tratamientos con hierro tienen sobre nuestra población, específicamente en aquellas mujeres que tienen reservas bajas y superiores de hierro. Los resultados de este estudio podrían en el futuro ayudar entender el efecto que tienen las reservas de hierro de una persona en la forma de manejar el hierro suplementado.

Remuneración: Por su participación y por las molestias causadas usted recibirá una remuneración de aproximadamente 75.0 USA \$ el último día del estudio.

Indemnizaciones: Si usted necesita algún medicamento para contrarrestar los efectos secundarios del tratamiento, el estudio cubrirá el costo de los mismos. Si usted necesita un tratamiento para efectos no asociados con el tratamiento suministrado no nos hacemos responsables por los mismos.

Compensación por lesiones: Desafortunadamente en Guatemala no existen seguros con cobertura para extracciones de sangre, por lo que no le podemos ofrecer compensaciones por esta causa. No se espera que un tratamiento con sulfato de hierro incurra en lesiones secundarias que requieran tratamiento médico, por lo que no se ofrece cobertura médica.

Gastos: Usted no tiene que incurrir en ningún gasto por concepto de pruebas de laboratorio en sangre. Los alimentos que recibirán también son cortesía del proyecto.

Confidencialidad: La información obtenida en el estudio será codificada numéricamente, su nombre solo será conocido por los investigadores en contacto con usted. Los resultados serán publicados eventualmente pero codificados, nunca aparecerán los nombres. Tampoco se le harán otras pruebas de laboratorio que usted no nos autorice en este documento.

Contactos: Si usted tiene alguna pregunta sobre los procedimientos o cambios de citas realizadas con nosotros puede contactar a Licda. María Eugenia Romero Abal al teléfono 24733942. Si usted tiene dudas sobre cualquier aspecto de derechos humanos de los participantes en este estudio, por favor contacte al Dr. Fernando Beltranena (Director del Comité de Derechos Humanos) al teléfono 23310928. La dirección de nuestra oficina donde también puede contactarnos está en el membrete de este documento.

Participación voluntaria: Los investigadores estamos en libertad de dar por terminada la participación de usted si el consentimiento no está firmado, si no cumple con su cita, si es imposible tomar muestras de sangre adecuadas o si se consume bebidas alcohólicas antes de cualquier día de evaluación.

Consentimiento:

Yo _____ he conocido los objetivos de este estudio, entiendo que es un estudio de investigación y entiendo sus riesgos y beneficios así como la confidencialidad que me ofrecen. Sé que el estudio es gratuito y que no debo pagar un solo centavo por participar. Sé que no estoy expuesto/a a recibir ningún tratamiento diferente al del sulfato de hierro. Entiendo que no hay seguro que cubra ninguna eventualidad médica no relacionada con el tratamiento que se me dará. Voluntariamente quiero participar en el estudio y entiendo que en cualquier momento que yo quiera me puedo retirar del estudio sin represalias de ningún tipo.

Nombre del Participante _____
 Número de Cédula _____ Fecha _____
 Dirección _____
 Investigador _____

Firma _____ Cedula _____

Consentimiento informado hombres fase tamizaje

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD E
IMPEDIMENTOS Y ALTERACIONES METABOLICAS -CESSIAM**
17 Av. 16-89 (interior) zona 11
Teléfono /Fax 24733942
CeSSIAM@guate.net.net

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
TITULO DE LA INVESTIGACIÓN**

**Respuesta Comparativa del NTBI al Tratamiento con Sulfato Ferroso en Hombres con
Reservas Bajas y Elevadas de Hierro**

FASE TAMIZAJE

INTRODUCCIÓN

En estudios que hemos llevado a cabo en los últimos años en Guatemala, hemos encontrado que al tratar a hombres y mujeres con las mismas dosis de hierro, similares a las que se usan para tratar la anemia, no obtenemos los mismos resultados. Esto puede deberse a que los hombres no tienen anemia y por no tener menstruación tienen buenas reservas de hierro, en cambio las mujeres, debido a la menstruación frecuentemente tienen anemia y su reserva de hierro es pobre.

Para tener una mejor idea de cómo responde el cuerpo al tratamiento de hierro, queremos comparar los resultados de las pruebas de laboratorio que nos indican como están los depósitos de hierro en el cuerpo y cuanto hierro se libera a la sangre después de tomar tratamiento con hierro, pero esta vez en dos grupos de hombres, uno con reservas de hierro bajas y otro grupo de hombres con reservas buenas. Esto lo mediremos por medio de una prueba de laboratorio que se llama NTBI o sea hierro no ligado a transferrina; esta es una sustancia que se ocupa de transportar el hierro a todos los lugares donde su cuerpo pueda necesitar hierro, pero algunas veces hay tanto hierro que no hay suficiente transferrina para llevarla y a ese hierro si su transporte es a lo que se llama NTBI.

Propósitos del estudio.

1. Determinar si el FeSO₄ en dosis de 100 mg en dosis única produce una respuesta de NTBI por arriba del basal en un grupo de hombres con niveles de ferritina bajos y normales.
2. Comparar las áreas bajo la curva obtenidas para NTBI en un intervalo de 270 minutos después de la ingesta de hierro entre el grupo de hombres con ferritina baja y normal.
3. Comparar el patrón de respuestas del hierro sérico del grupo de hombres con estado marginal y normal de hierro.

Procedimientos a seguir:

El estudio en su totalidad durará 2 días no consecutivos. En el primer día, durante la fase de tamizaje, se le pedirá que nos permita sacarle una muestra de sangre de 5 ml, o sea una

cantidad igual a una cucharada, para poder determinar su nivel de ferritina. La ferritina es una prueba de laboratorio que nos dice como esta su reserva de hierro. Si sus niveles de ferritina caen dentro de los límites de reservas de hierro en los extremos inferior y superior de todo el grupo que está siendo tamizado, entonces usted podrá participar voluntariamente en el resto del estudio, si no le agradeceremos su intención de ayudarnos y le daremos su resultado de hemoglobina que le dice si tiene anemia o no.

Es posible que también llevemos a cabo otros dos análisis en su muestra de sangre inicial: el análisis de Receptores de Transferrina y/o Saturación de Transferrina. Después de la extracción de sangre usted recibirá un pequeño desayuno.

Molestias y riesgos: Un riesgo menor es el de la extracción de sangre, ya que si sus venas son frágiles puede quedar un morete. Las molestias serán que se comprometerá a estar disponible el día asignado para la toma de la muestra, lo cual puede afectar su horario y que además deberá estar en ayunas hasta después de la toma de la muestra.

Alternativas terapéuticas: Ya que usted es una persona aparentemente sana, no hay una alternativa terapéutica que ofrecerle. Pero si los resultados de las pruebas demuestran que usted está anémico, pero no deficiente de hierro, es decir su ferritina no está baja nosotros le ofreceremos un tratamiento terapéutico similar al que se dará en el estudio.

Exclusiones: Usted no podrá participar en el estudio si tiene alguno de los siguientes inconvenientes: alguna enfermedad crónica diagnosticada (diabetes, problemas circulatorios, etc.); si no puede comprometerse a participar durante los días del estudio; si después de recibir el sulfato de hierro manifiesta que no tolera el jarabe o si ha tenido malas experiencias previas con el sulfato de hierro; si sus venas presentan demasiada fragilidad a la extracción de sangre, si está tomando otros tratamientos con hierro y otros oxidantes y si no firma el consentimiento informado. Tampoco podrá participar si no garantiza poder presentarse a la extracción de sangre sin haber consumido bebidas alcohólicas **24 horas** antes del estudio.

Beneficios: Usted está ayudando a que se entiendan mejor los efectos que los tratamientos con hierro tienen sobre nuestra población. Los resultados de este estudio podrían en el futuro ayudar entender el efecto que tienen las reservas de hierro de una persona en la forma de manejar el hierro suplementado.

Remuneración: Por su participación en el tamizaje para determinar ferritina y hematología, no recibirá compensación económica, únicamente los resultados de sus pruebas de laboratorio. Sin embargo si usted es invitada a participar en el estudio de cuatro semanas, por las molestias causadas usted recibirá una remuneración de aproximadamente 75.0 USA \$ el último día del estudio.

Indemnizaciones: Si usted necesita algún medicamento para contrarrestar los efectos secundarios del tratamiento, el estudio cubrirá el costo de los mismos. Si usted necesita un tratamiento para efectos no asociados con el tratamiento suministrado no nos hacemos responsables por los mismos.

Compensación por lesiones: Desafortunadamente en Guatemala no existen seguros con cobertura para extracciones de sangre, por lo que no le podemos ofrecer compensaciones por esta causa. No se espera que un tratamiento con sulfato de hierro incurra en lesiones secundarias que requieran tratamiento médico, por lo que no se ofrece cobertura médica.

Gastos: Usted no tiene que incurrir en ningún gasto por concepto de pruebas de laboratorio en sangre, ni pagar el jarabe o el tratamiento de hierro que se le pueda ofrecer en caso de estar anémico. Los alimentos que recibirán también son cortesía del proyecto.

Confidencialidad: La información obtenida en el estudio será codificada numéricamente, su nombre solo será conocido por los investigadores en contacto con usted. Los resultados serán publicados eventualmente pero codificados, nunca aparecerán los nombres. Tampoco se le harán otras pruebas de laboratorio que usted no nos autorice en este documento.

Contactos: Si usted tiene alguna pregunta sobre los procedimientos o cambios de citas realizadas con nosotros puede contactar a Licda. María Eugenia Romero Abal al teléfono 24733942. Si usted tiene dudas sobre cualquier aspecto de derechos humanos de los participantes en este estudio, por favor contacte al Dr. Fernando Beltranena (Director del Comité de Derechos Humanos) al teléfono 23310928. La dirección de nuestra oficina donde también puede contactarnos está en el membrete de este documento.

Participación voluntaria: Los investigadores estamos en libertad de dar por terminada la participación de usted si el consentimiento no está firmado, si no cumple con su cita, si es imposible tomar muestras de sangre adecuadas o si se consume bebidas alcohólicas antes de cualquier día de evaluación.

Consentimiento:

Yo _____ he conocido los objetivos de este estudio, entiendo que es un estudio de investigación y entiendo sus riesgos y beneficios así como la confidencialidad que me ofrecen. Sé que el estudio es gratuito y que no debo pagar un solo centavo por participar pero recibiré los resultados de la prueba de hematología y consejo médico en caso padezca de alguna anormalidad hematológica. Entiendo que no hay seguro que cubra ninguna eventualidad médica no relacionada con el tratamiento que se me dará. Voluntariamente quiero participar en el estudio y entiendo que en cualquier momento que yo quiera me puedo retirar del estudio sin represalias de ningún tipo.

Nombre del Participante _____

Número de Cédula _____ Fecha _____

Dirección _____

Investigador _____

Firma _____

Cedula _____

Consentimiento informado hombres fase experimental

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD E
IMPEDIMENTOS Y ALTERACIONES METABOLICAS -CESSIAM**
17 Av. 16-89 (interior) zona 11
Teléfono /Fax 24733942
CeSSIAM@guate.net.net

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
TITULO DE LA INVESTIGACIÓN**

**Respuesta Comparativa del NTBI al Tratamiento con Sulfato Ferroso en Hombres con
Reservas Bajas y Elevadas de Hierro**

FASE EXPERIMENTAL

INTRODUCCIÓN

En estudios que hemos llevado a cabo en los últimos años en Guatemala, hemos encontrado que al tratar a hombres y mujeres con las mismas dosis de hierro, similares a las que se usan para tratar la anemia, no obtenemos los mismos resultados. Esto puede deberse a que los hombres no tienen anemia y por no tener menstruación tienen buenas reservas de hierro, en cambio las mujeres, debido a la menstruación frecuentemente tienen anemia y su reserva de hierro es pobre.

Para tener una mejor idea de cómo responde el cuerpo al tratamiento de hierro, queremos comparar los resultados de las pruebas de laboratorio que nos indican como están los depósitos de hierro en el cuerpo y cuanto hierro se libera a la sangre después de tomar tratamiento con hierro, pero esta vez en dos grupos de hombres, uno con reservas de hierro bajas y otro grupo de hombres con reservas buenas. Esto lo mediremos por medio de una prueba de laboratorio que se llama NTBI o sea hierro no ligado a transferrina; esta es una sustancia que se ocupa de transportar el hierro a todos los lugares donde su cuerpo pueda necesitar hierro, pero algunas veces hay tanto hierro que no hay suficiente transferrina para llevarla y a ese hierro si su transporte es a lo que se llama NTBI.

Propósitos del estudio.

1. Determinar si el FeSO₄ en dosis de 100 mg en dosis única produce una respuesta de NTBI por arriba del basal en un grupo de hombres con niveles de ferritina bajos y normales.
2. Comparar las áreas bajo la curva obtenidas para NTBI en un intervalo de 270 minutos después de la ingesta de hierro entre el grupo de hombres con ferritina baja y normal.
3. Comparar el patrón de respuestas del hierro sérico del grupo de hombres con estado marginal y normal de hierro.

Procedimientos a seguir:

El estudio durará 1 día durante el cual se le pedirá que tome una dosis de 100 mg de hierro en forma de FeSO₄ o sea el tratamiento que dan en los puestos de salud para tratar la anemia.

Colección de muestras de sangre Los estudios se llevarán a cabo cualquier día de la semana en el que sea de su conveniencia; ese día usted deberá presentarse en ayunas al laboratorio de CESSIAM, el ayuno deberá ser de al menos 12 horas. Se le extraerá sangre únicamente un día y luego se extraerán 4 muestras cada 90 minutos después de haber ingerido el suplemento, es decir en tiempos 0, 90, 180 y 270 minutos.

Durante los primeros 180 minutos solo podrá tomar agua, después de este periodo se le ofrecerá un desayuno y al colectar la siguiente muestra de sangre se le ofrecerá un almuerzo.

En la sangre se harán las siguientes pruebas: hierro no ligado a transferrina (NTBI) y hematología completa incluyendo ferritina. El análisis de NTBI se llevará a cabo fuera del país, por lo que no le ofrecemos los resultados inmediatamente en el caso de que usted los quiera conocer, sin embargo no son pruebas comunes de laboratorio, por lo que carecen de valor para usted o su médico como diagnósticas. Excepto en el caso de la hematología completa y ferritina, ya que estas sí le ayudan al médico a hacer diagnóstico de su estado de hierro.

Experiencia anterior con el tratamiento: Los suplementos de hierro que usted tomará una vez por semana son un tratamiento común usado en Guatemala para tratar la anemia de niños y mujeres embarazadas principalmente, por lo que no representan un riesgo para su salud ya que es un tratamiento común y conocido en Guatemala y el mundo.

Molestias y riesgos: La dosis de hierro puede provocar en algunas personas problemas gástricos, como náusea, vómitos en el peor de los casos. El color de las heces se pondrá oscuro pero esto es normal y no representa señal de peligro. Otro riesgo menor es el de la extracción de sangre, ya que si sus venas son frágiles puede quedar un morete. Las molestias serán que se comprometerá a estar disponible para la toma de muestras y del jarabe, lo cual puede afectar su horario y que además deberá estar en ayunas hasta después de la toma de muestras. Además deberá permanecer en las instalaciones de CESSIAM asignadas para el proyecto para asegurar el correcto intervalo de extracción de sangres, durante las cuatro horas y medio que dura el día de trabajo.

Alternativas terapéuticas: Ya que usted es una persona aparentemente sana, no hay una alternativa terapéutica que ofrecerle. Pero si los resultados de las pruebas demuestran que usted está anémico, pero no deficiente de hierro, es decir su ferritina no está baja, nosotros le ofreceremos un tratamiento terapéutico similar al que se dará en el estudio.

Exclusiones: Usted no podrá participar en el estudio si tiene alguno de los siguientes inconvenientes: alguna enfermedad crónica diagnosticada (diabetes, problemas circulatorios, etc); si no puede comprometerse a participar durante los días del estudio; si después de recibir el sulfato de hierro manifiesta que no tolera el jarabe o si ha tenido malas experiencias previas con el sulfato de hierro; si sus venas presentan demasiada fragilidad a la extracción de sangre, si está tomando otros tratamientos con hierro y otros oxidantes y si no firma el consentimiento informado. Tampoco podrá participar si no garantiza poder presentarse a la extracción de sangre sin haber consumido bebidas alcohólicas **24 horas** antes del estudio.

Beneficios: Usted está ayudando a que se entiendan mejor los efectos que los tratamientos con hierro tienen sobre nuestra población. Los resultados de este estudio podrían en el futuro ayudar entender el efecto que tienen las reservas de hierro de una persona en la forma de manejar el hierro suplementado.

Remuneración: Por su participación y por las molestias causadas usted recibirá una remuneración de aproximadamente 75.0 USA \$ el último día del estudio.

Indemnizaciones: Si usted necesita algún medicamento para contrarrestar los efectos secundarios del tratamiento, el estudio cubrirá el costo de los mismos. Si usted necesita un tratamiento para efectos no asociados con el tratamiento suministrado no nos hacemos responsables por los mismos.

Compensación por lesiones: Desafortunadamente en Guatemala no existen seguros con cobertura para extracciones de sangre, por lo que no le podemos ofrecer compensaciones por esta causa. No se espera que un tratamiento con sulfato de hierro incurra en lesiones secundarias que requieran tratamiento médico, por lo que no se ofrece cobertura médica.

Gastos: Usted no tiene que incurrir en ningún gasto por concepto de pruebas de laboratorio en sangre. Los alimentos que recibirán también son cortesía del proyecto.

Confidencialidad: La información obtenida en el estudio será codificada numéricamente, su nombre solo será conocido por los investigadores en contacto con usted. Los resultados serán publicados eventualmente pero codificados, nunca aparecerán los nombres. Tampoco se le harán otras pruebas de laboratorio que usted no nos autorice en este documento.

Contactos: Si usted tiene alguna pregunta sobre los procedimientos o cambios de citas realizadas con nosotros puede contactar a Licda. María Eugenia Romero Abal al teléfono 24733942. Si usted tiene dudas sobre cualquier aspecto de derechos humanos de los participantes en este estudio, por favor contacte al Dr. Fernando Beltranena (Director del Comité de Derechos Humanos) al teléfono 23310928. La dirección de nuestra oficina donde también puede contactarnos está en el membrete de este documento.

Participación voluntaria: Los investigadores estamos en libertad de dar por terminada la participación de usted si el consentimiento no está firmado, si no cumple con su cita, si es imposible tomar muestras de sangre adecuadas o si se consume bebidas alcohólicas antes de cualquier día de evaluación.

Consentimiento:

Yo _____ he conocido los objetivos de este estudio, entiendo que es un estudio de investigación y entiendo sus riesgos y beneficios así como la confidencialidad que me ofrecen. Sé que el estudio es gratuito y que no debo pagar un solo centavo por participar. Sé que no estoy expuesto/a a recibir ningún tratamiento diferente al del sulfato de hierro. Entiendo que no hay seguro que cubra ninguna eventualidad médica no relacionada con el tratamiento que se me dará. Voluntariamente quiero participar en el estudio y entiendo que en cualquier momento que yo quiera me puedo retirar del estudio sin represalias de ningún tipo.

Nombre del Participante _____
 Número de Cédula _____ Fecha _____
 Dirección _____
 Investigador _____

Firma _____ Cedula _____

Características de los sujetos de estudio

Cuadro No. 14. Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de hombres con reservas de hierro superiores. Se presentan las características relevantes de los sujetos de estudio, todas estas formaron parte de los criterios de inclusión.

	Edad (años)	Hemoglobina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración de ferritina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Proteína C reactiva ($\mu\text{g/dL}$)
HO-11-001	36	1.50×10^7	14	<500
HO-11-002	25	1.51×10^7	9.2	<500
HO-11-005	26	1.64×10^7	6.9	<500
HO-11-009	34	1.46×10^7	8.3	745
HO-11-010	32	1.48×10^7	13.7	<500
HO-11-011	31	1.53×10^7	16	<500
HO-11-012	23	1.59×10^7	17.3	<500
HO-11-013	22	1.58×10^7	29.5	<500
HO-11-014	23	1.68×10^7	20.3	<500
HO-11-015	50	1.61×10^7	13	<500
Media	30.2	1.56×10^7	14.82	--
Desviación estándar	8.56	0.73	6.63	--

Cuadro No. 15. Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de hombres con reservas de hierro inferiores. Se presentan las características relevantes de los sujetos de estudio, todas estas formaron parte de los criterios de inclusión.

	Edad (años)	Hemoglobina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración de ferritina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Proteína C reactiva ($\mu\text{g/dL}$)
HO-11-016	21	7.4×10^6	0.2	<500
HO-11-017	21	1.43×10^7	2.5	<500
HO-11-018	48	7.4×10^6	0.21	<500
HO-11-019	35	1.46×10^7	2.9	<500
HO-11-020	28	5.9×10^6	0.04	<500
HO-11-021	37	1.42×10^7	2.9	<500
HO-11-022	27	1.46×10^7	2.7	<500
HO-11-023	49	1.42×10^7	3.1	<500
HO-11-024	25	1.56×10^7	7.0	<500
HO-11-025	22	1.43×10^7	1.2	<500
Media	30.2	1.23×10^7	22.75	--
Desviación estándar	10.57	0.37	2.07	--

Cuadro No. 16. Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de mujeres con reservas de hierro superiores. Se presentan las características relevantes de los sujetos de estudio, todas estas formaron parte de los criterios de inclusión.

	Edad (años)	Hemoglobina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración de ferritina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Proteína C reactiva ($\mu\text{g/dL}$)
MU-11-011	44	1.4×10^7	8.7	721
MU-11-012	40	1.31×10^7	16.2	<500
MU-11-013	40	1.39×10^7	10	<500
MU-11-014	55	1.43×10^7	8.6	<500
MU-11-015	47	1.40×10^7	9.8	<500
MU-11-016	57	1.37×10^7	12.1	718
MU-11-017	--	1.21×10^7	16	<500
MU-11-018	40	1.54×10^7	10	<500
MU-11-019	--	1.36×10^7	9.8	<500
MU-11-020	--	1.37×10^7	10.9	<500
Media	46.1*	1.38×10^7	11.21	--
Desviación estándar	7.2	0.84	2.76	--

* La media y desviación estándar presentadas en edad toma en cuenta únicamente los siete valores que se conocían para dicho grupo, razón por la cual los valores pueden presentar discrepancias con lo esperado.

Cuadro No. 17. Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de mujeres con reservas de hierro inferiores. Se presentan las características relevantes de los sujetos de estudio, todas estas formaron parte de los criterios de inclusión.

	Edad (años)	Hemoglobina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración de ferritina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Proteína C reactiva ($\mu\text{g/dL}$)
MU-11-001	56	1.31×10^7	2	<500
MU-11-002	46	1.35×10^7	2	<500
MU-11-003	40	1.29×10^7	1.4	<500
MU-11-004	42	1.29×10^7	0.3	<500
MU-11-005	43	1.16×10^7	1.7	814
MU-11-006	40	1.38×10^7	1.2	<500
MU-11-007	36	1.38×10^7	1.7	927
MU-11-008	35	1.39×10^7	2.3	<500
MU-11-009	30	1.27×10^7	2.5	1000
MU-11-010	51	1.41×10^7	2	<500
Media	41.9	1.32×10^7	1.71	--
Desviación estándar	7.68	0.75	0.63	--

Cuadro No. 18. Resumen de las características de los sujetos de estudio de la presente investigación. Se presentan para cada grupo la media, desviación estándar, mediana y rango.

	Hombres con reservas de hierro superiores	Hombres con reservas de hierro inferiores	Mujeres con reservas de hierro superiores*	Mujeres con reservas de hierro inferiores
Edad (años)	30.2±8.56 28.5 22-50	31.3 ±10.57 27.5 21-49	46.1±7.2 44 40-57	41.9±7.68 41 30-56
Hemoglobina (µg/dL)	1.56 x 10 ⁷ ±0.07 1.56 x 10 ⁷ 1.46 x 10 ⁷ -1.68 x 10 ⁷	1.23 x 10 ⁷ ±0.37 1.43x 10 ⁷ 5.9 x 10 ⁶ -1.56 x 10 ⁷	1.38 x 10 ⁷ ±0.084 1.38 x 10 ⁷ 1.21 x 10 ⁷ -1.54 x 10 ⁷	1.32 x 10 ⁷ ±0.075 1.33 x 10 ⁷ 1.16 x 10 ⁷ -1.41 x 10 ⁷
[Ferritina] inicial (µg/dL)	14.8±6.63 13.85 6.9-29.5	2.28±2.08 2.6 0.04-7	11.2±2.76 10 8.6-16.2	1.71±0.63 1.85 0.3-2.5
Proteína C reactiva (µg/dL)	9 de 10 <500	10 de 10 <500	8 de 10 <500	7 de 10 <500

* La media y desviación estándar presentadas en la casilla de edad para el grupo de mujeres con reservas de hierro superiores toma en cuenta únicamente los siete valores que se conocían para dicho grupo, razón por la cual los valores pueden presentar discrepancias con lo esperado.

Cuadro No. 19. Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de hombres con reservas de hierro superiores de un estudio previo realizado por CeSIAM en Utrecht. Se presentan las características relevantes de los sujetos de estudio de dicho grupo.

	Edad (años)	Hemoglobina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración de ferritina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Proteína C reactiva ($\mu\text{g/dL}$)
A	23	1.73×10^7	6.2	<500
B	18	1.67×10^7	14.7	<500
C	36	1.61×10^7	9.2	<500
D	26	1.57×10^7	5.1	<500
E	31	1.75×10^7	13	<500
F	55	1.51×10^7	8	500
G	25	1.85×10^7	11.6	<500
H	23	1.63×10^7	24.1	<500
I	21	1.69×10^7	164	<500
J	32	1.81×10^7	8.9	500
Media	29	1.68×10^7	26.48	--
Desviación estándar	10.6	0.11	48.62	--

Cuadro No. 20. Características de los sujetos de estudio perteneciente al grupo de mujeres con reservas de hierro inferiores de un estudio previo realizado por CeSIAM en Utrecht. Se presentan las características relevantes de los sujetos de estudio de dicho grupo.

	Edad (años)	Hemoglobina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Concentración de ferritina inicial ($\mu\text{g/dL}$)	Proteína C reactiva ($\mu\text{g/dL}$)
A	49	1.31×10^7	2.86	<500
B	30	1.37×10^7	0.88	<500
C	26	1.35×10^7	1.03	<500
D	22	1.30×10^7	1.13	<500
E	27	1.31×10^7	1.4	<500
F	32	1.30×10^7	1.92	500
G	23	1.26×10^7	2	<500
H	35	1.35×10^7	2.4	<500
I	30	1.43×10^7	2.7	<500
J	28	1.25×10^7	2.86	<500
Media	30.2	1.32×10^7	1.92	--
Desviación estándar	7.68	0.05	0.77	--

Cuadro No. 21. Resumen de las características de los sujetos de estudio pertenecientes a estudios previos realizados por CeSSIAM en Utrecht. Se presentan para cada grupo la media, desviación estándar, mediana y rango.

	Hombres con reservas de hierro superiores.	Mujeres con reservas de hierro inferiores
Edad (años)	29±10.65 25.5 18-55	30.2±7.68 29 22-49
Hemoglobina (µg/dL)	$1.68 \times 10^7 \pm 0.10$ 1.68×10^7 1.51×10^7 - 1.85×10^7	$1.32 \times 10^7 \pm 0.05$ 1.31×10^7 1.25×10^7 - 1.43×10^7
[Ferritina] inicial (µg/dL)	26.48±48.62 10.4 5.1-164	1.92±0.77 1.96 0.88-2.86
Proteína C reactiva (µg/dL)	8 de 10 <500	9 de 10 <500

Gráficas de comparación con estudio anterior de CeSSIAM en Utrecht

Hierro sérico

Figura No. 26. Cambio de concentración hierro sérico en el tiempo de hombres con reservas de hierro superiores de dos diferentes estudios. Se presentan las curvas de cambios de concentración de hierro sérico en un intervalo de 270 minutos de hombres con reservas de hierro superiores. Se incluyen dos curvas la del estudio actual y la de un estudio anterior realizado en Utrecht, esto con el fin de poder comparar los resultados obtenidos.

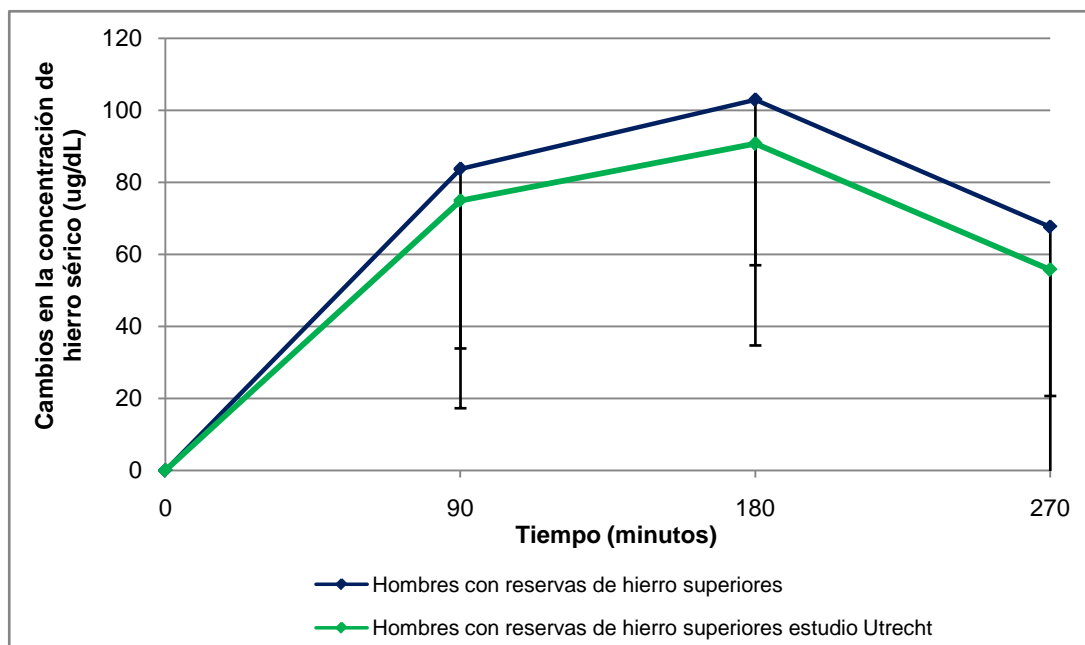
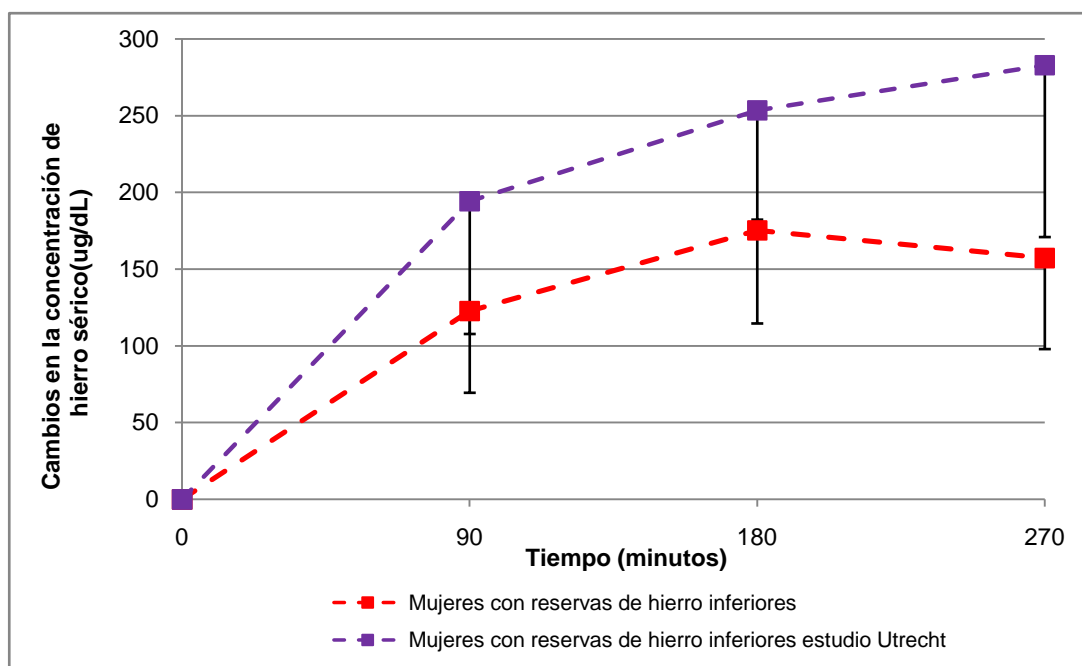


Figura No. 27. Cambio de concentración hierro sérico en el tiempo de mujeres con reservas de hierro inferiores de dos diferentes estudios. Se presentan las curvas de cambios de concentración de hierro sérico en un intervalo de 270 minutos de mujeres con reservas de hierro inferiores. Se incluyen dos curvas la del estudio actual y la de un estudio anterior realizado en Utrecht, para comparar los resultados obtenidos.



NTBI

Figura No. 28. Cambio de concentración NTBI en el tiempo de hombres con reservas de hierro superiores de dos diferentes estudios. Se presentan las curvas de cambios de concentración de NTBI en un intervalo de 270 minutos de hombres con reservas de hierro superiores. Se incluyen dos curvas la del estudio actual y la de un estudio anterior realizado en Utrecht, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos.

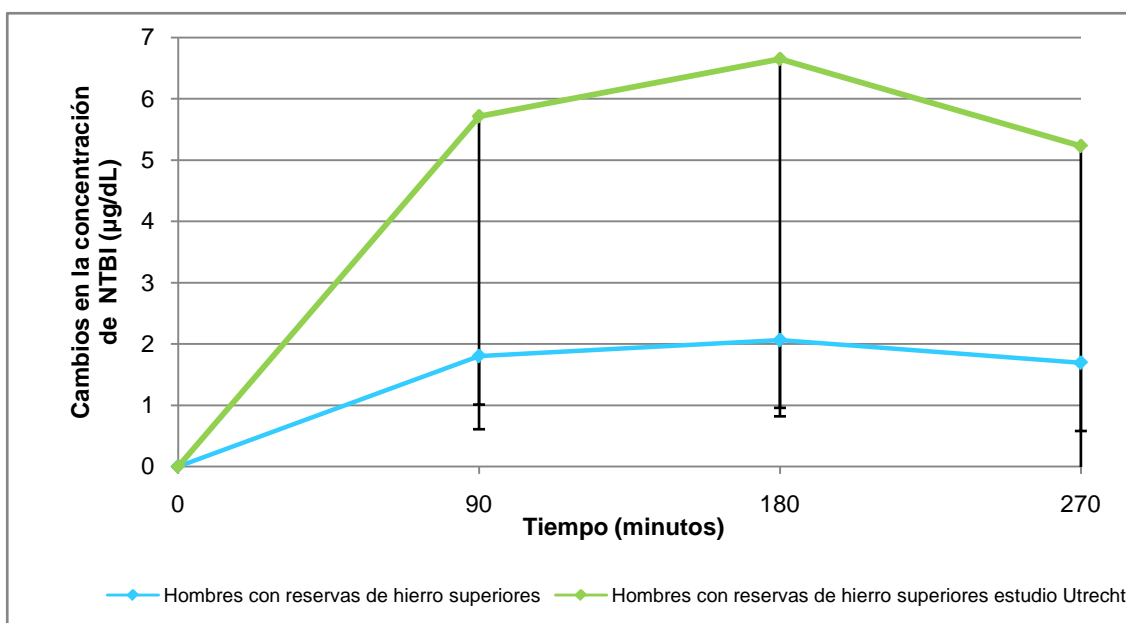
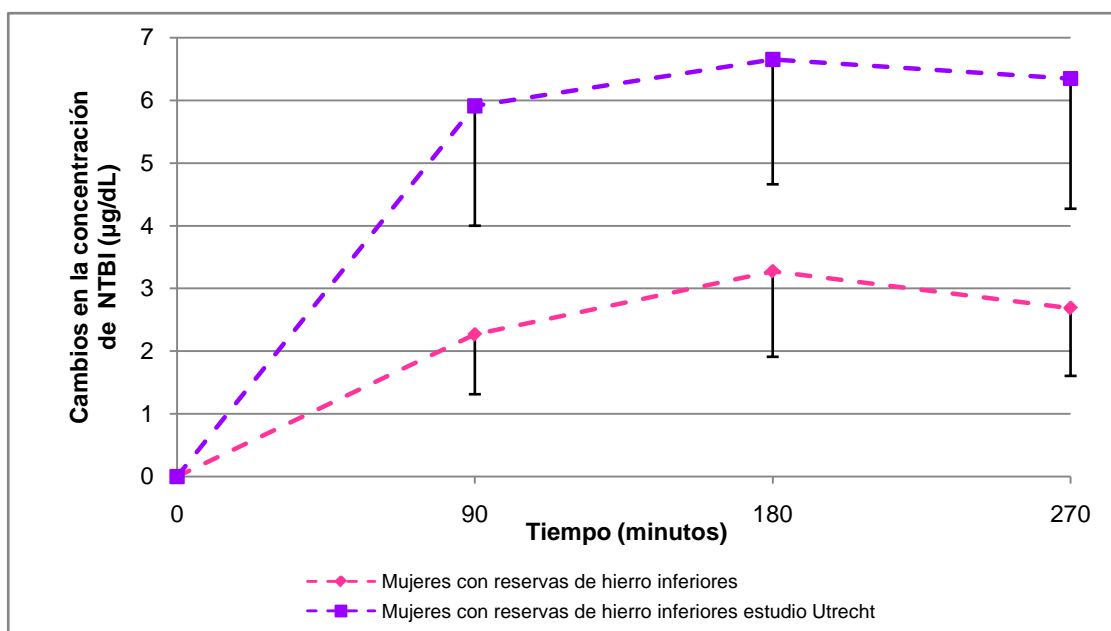


Figura No. 29. Cambio de concentración NTBI en el tiempo de mujeres con reservas de hierro inferiores de dos diferentes estudios. Se presentan las curvas de cambios de concentración de NTBI en un intervalo de 270 minutos de mujeres con reservas de hierro inferiores. Se incluyen dos curvas la del estudio actual y la de un estudio anterior realizado en Utrecht, para comparar los resultados obtenidos.



Análisis estadístico

Cuadro No. 22. Comprobación de supuestos de normalidad de distribución de los datos y homocedasticidad de las varianzas para poder realizar una prueba paramétrica para los resultados de hierro sérico.

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

	Estadístico	df	Significancia
Reservas de hierro superiores	0.921	20	0.102
Reservas de hierro inferiores	0.910	20	0.064
Sexo femenino	0.959	20	0.521
Sexo masculino	0.970	20	0.756

Prueba de homocedasticidad de varianzas de Levene

F	df1	df2	Significancia
0.452	3	36	0.718

Cuadro No. 23 ANOVA de cambio máximo para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de hierro. Se realiza dicho análisis para comprobar las hipótesis planteadas en metodología.

Fuente	Suma de cuadrados (tipo III)	df	Media de cuadrados	F	Significancia
Modelo corregido	70254.63	3	23418.211	4.608	0.008
Intercepto	1291537.688	1	1291537.688	254.118	0.000
Reservas de hierro	13053.986	1	13053.986	2.568	0.118
Sexo	14249.795	1	14249.795	2.804	0.103
Reservas de hierro * sexo	42950.853	1	42950.853	8.451	0.006
Error	182967.443	36	5082.429		
Total	1544759.764	40			
Total corregido	253222.076	39			

Cuadro No. 24 ANOVA de áreas bajo la curva para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de hierro. Se realiza dicho análisis para comprobar las hipótesis planteadas en metodología.

Fuente	Suma de cuadrados (tipo III)	df	Media de cuadrados	F	Significancia
Modelo corregido	390377.743	3	130125.914	4.039	0.014
Intercepto	7130239.416	1	7130239.416	221.321	0.000
Reservas de hierro	142425.726	1	142425.726	4.421	0.043
Sexo	66620.611	1	66620.611	2.068	0.159
Reservas de hierro * sexo	181331.405	1	181331.405	5.628	0.023
Error	1159801.484	36	32216.708		
Total	8680418.643	40			
Total corregido	1550179.227	39			

Cuadro No. 25 Análisis POST- HOC de cambio máximo de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) para determinar si existe diferencia entre la media de los 4 grupos.

Clasificación (I)	Clasificación (J)	Diferencia media(I-J)	Error estándar	Significancia	Intervalo de confianza al 95%	
					Inferior	Superior
Masculino reservas superiores	Femenino reservas superiores	-101.6672	31.88237	0.003	-166.3277	-37.0067
	Masculino reservas inferiores	-103.2858	31.88237	0.003	-167.9463	-38.6253
	Femenino reservas inferiores	-73.8792	31.88237	0.026	-138.5397	-9.2187
Femenino reservas superiores	Masculino reservas superiores	101.6672	31.88237	0.003	37.0067	166.3277
	Masculino reservas inferiores	-1.6186	31.88237	0.960	-66.2791	63.0419
	Femenino reservas inferiores	27.7880	31.88237	0.389	-36.8725	92.4485
Masculino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	103.2858	31.88237	0.003	36.6253	167.9463
	Femenino reservas superiores	1.6186	31.88237	0.960	-63.0419	66.2791
	Femenino reservas inferiores	29.4066	31.88237	0.362	-35.2539	94.0671
Femenino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	73.8792	31.88237	0.026	9.2187	138.5397
	Femenino reservas superiores	-27.7880	31.88237	0.389	-92.4485	36.8725
	Masculino reservas inferiores	-29.4066	31.88237	0.362	-94.0671	35.2539

Cuadro No. 26 Análisis POST- HOC de área bajo la curva de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) para determinar si existe diferencia entre la media de los 4 grupos.

Clasificación (I)	Clasificación (J)	Diferencia media (I-J)	Error estándar	Significancia	Intervalo de confianza al 95%	
					Inferior	Superior
Masculino reservas superiores	Femenino reservas superiores	-216.2808	80.27043	0.011	-379.0768	-53.4848
	Masculino reservas inferiores	-254.0016	80.27043	0.003	-416.7976	-91.2056
	Femenino reservas inferiores	-200.9637	80.27043	0.017	-363.7597	-38.1677
Femenino reservas superiores	Masculino reservas superiores	216.2808	80.27043	0.011	53.4848	379.0768
	Masculino reservas inferiores	-37.7208	80.27043	0.641	-200.5168	125.0752
	Femenino reservas inferiores	15.3171	80.27043	0.850	-147.4789	178.1131
Masculino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	254.0016	80.27043	0.003	91.2056	416.7976
	Femenino reservas superiores	37.7208	80.27043	0.641	-125.0752	200.5168
	Femenino reservas inferiores	53.0379	80.27043	0.513	-109.7581	215.8339
Femenino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	200.9637	80.27043	0.017	38.1677	363.7597
	Femenino reservas superiores	-15.3171	80.27043	0.850	-178.1131	147.4789
	Masculino reservas inferiores	-53.0379	80.27043	0.513	-215.8339	109.7581

Cuadro No. 27. Comprobación de supuestos de normalidad de distribución de los datos y homocedasticidad de las varianzas para poder realizar una prueba paramétrica a los resultados de NTBI

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

	Estadístico	df	Significancia
Reservas de hierro superiores	0.976	20	0.864
Reservas de hierro inferiores	0.955	20	0.451
Sexo femenino	0.964	20	0.633
Sexo masculino	0.973	20	0.826

Prueba de homocedasticidad de varianzas de Levene

F	df1	df2	Significancia
0.484	3	36	0.695

Cuadro No. 28 ANOVA de cambios máximos para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de NTBI. Se realiza dicho análisis para comprobar las hipótesis planteadas en metodología.

Fuente	Suma de cuadrados (tipo III)	df	Media de cuadrados	F	Significancia
Modelo corregido	5.318	3	1.773	0.918	0.442
Intercepto	333.130	1	333.130	172.468	0.000
Reservas de hierro	3.907	1	3.907	2.023	0.164
Sexo	0.469	1	0.469	0.243	0.625
Reservas de hierro * sexo	0.942	1	0.942	0.488	0.489
Error	69.536	36	1.932		
Total	407.984	40			
Total corregido	74.854	39			

Cuadro No. 29 ANOVA del área bajo la curva para ver efecto de las reservas de hierro, sexo e interacción reservas de hierro*sexo sobre la concentración de NTBI. Se realiza dicho análisis para comprobar las hipótesis planteadas en metodología.

Fuente	Suma de cuadrados (tipo III)	df	Media de cuadrados	F	Significancia
Modelo corregido	53.355	3	17.785	1.356	0.272
Intercepto	1994.503	1	1994.503	152.037	0.000
Reservas de hierro	50.353	1	50.353	3.838	0.058
Sexo	1.790	1	1.790	0.136	0.714
Reservas de hierro * sexo	1.211	1	1.211	0.092	0.763
Error	472.266	36	13.119		
Total	2520.124	40			
Total corregido	525.621	39			

Cuadro No. 30 Análisis POST- HOC de cambio máximo de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) para determinar si existe diferencia entre la media de los 4 grupos.

Clasificación (I)	Clasificación (J)	Diferencia media(I-J)	Error estándar	Significancia	Intervalo de confianza al 95%	
					Inferior	Superior
Masculino reservas superiores	Femenino reservas superiores	-0.5233	0.62154	0.405	-1.7839	0.7372
	Masculino reservas inferiores	-0.9320	0.62154	0.142	-2.1925	0.3286
	Femenino reservas inferiores	-0.8415	0.62154	0.184	-2.1021	0.4190
Femenino reservas superiores	Masculino reservas superiores	0.5233	0.62154	0.408	-0.7372	1.7839
	Masculino reservas inferiores	-0.4086	0.62154	0.515	-1.6692	0.8519
	Femenino reservas inferiores	-0.3182	0.62154	0.612	-1.5787	0.9423
Masculino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	0.9320	0.62154	0.142	-0.3286	2.1925
	Femenino reservas superiores	0.4086	0.62154	0.515	-0.8519	1.6692
	Femenino reservas inferiores	0.0904	0.62154	0.885	-1.1701	1.3510
Femenino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	0.8415	0.62154	0.184	-0.4190	2.1021
	Femenino reservas superiores	0.3182	0.62154	0.612	-0.9423	1.5787
	Masculino reservas inferiores	-0.0904	0.62154	0.885	-1.3510	1.1701

Cuadro No. 31 Análisis POST- HOC del área bajo la curva de comparación múltiple de diferencia mínima significativa (LSD) para determinar si existe diferencia entre la media de los 4 grupos.

Clasificación (I)	Clasificación (J)	Diferencia media(I-J)	Error estándar	Significancia	Intervalo de confianza al 95%	
					Inferior	Superior
Masculino reservas superiores	Femenino reservas superiores	-0.7711	1.61978	0.637	-4.0562	2.5139
	Masculino reservas inferiores	-2.5920	1.61978	0.118	-5.8771	0.6931
	Femenino reservas inferiores	-2.6671	1.61978	0.108	-5.9521	0.6180
Femenino reservas superiores	Masculino reservas superiores	0.7711	1.61978	0.637	-2.5139	4.0562
	Masculino reservas inferiores	-1.8208	1.61978	0.268	-5.1059	1.4642
	Femenino reservas inferiores	-1.8959	1.61978	0.249	-5.1810	1.3891
Masculino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	2.5920	1.61978	0.118	-0.6931	5.8771
	Femenino reservas superiores	1.8208	1.61978	0.268	-1.4642	5.1059
	Femenino reservas inferiores	-0.0751	1.61978	0.963	-3.3602	3.2100
Femenino reservas inferiores	Masculino reservas superiores	2.6671	1.61978	0.108	-0.6180	5.9521
	Femenino reservas superiores	1.8959	1.61978	0.249	-1.3891	5.1810
	Masculino reservas inferiores	0.0751	1.61978	0.963	-3.2100	3.3602