

Laboratorio de Reconstituyentes. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana.

DESARROLLO DE UN BIOMODELO DE RATAS ANÉMICAS MEDIANTE DOS TIPOS DE DIETA DE CASEINA

Yenela García Hernández,^{1¶} Raúl González Hernández,^{2¶} René Cárdenas Vázquez,^{3§} Agustín Carmona Castro.^{1§}

RESUMEN

La deficiencia de hierro (Fe) constituye un problema mundial de salud pública. El método de depleción de la hemoglobina es ampliamente utilizado en la obtención de biomodelos animales para la evaluación de la biodisponibilidad del Fe, con vistas al desarrollo de nuevos antianémicos. En este trabajo se presentan los resultados del desarrollo de un biomodelo de ratas anémicas mediante la administración de caseína en 2 tipos diferentes de formulaciones de dieta a 40 ratas machos Wistar recién destetadas. La mitad de los animales se trató con una dieta que contenía 8% de proteínas durante 4 semanas (Grupo 1), mientras que la otra mitad recibió una formulación con un 5% de contenido proteico durante 2 semanas (Grupo 2). A cada animal se le midió la concentración de Hemoglobina (Hb) y el peso corporal a intervalos regulares: Grupo I: Cada 2 semanas; Grupo 2: A partir de la segunda semana, en días alternos. Se observó un incremento del peso corporal del animal tratado mediante cualquiera de las 2 formulaciones, junto con una reducción de la Hb. El número de animales que desarrollaron anemia fue bajo en ambos grupos. Las formulaciones de dieta de caseína evaluadas en este ensayo pueden ser utilizadas en la obtención de un biomodelo de ratas anémicas, pero se recomienda continuar el desarrollo del modelo para mejorar la factibilidad económica. **García Hernández Y, González Hernández R, Cárdenas Vázquez R, Carmona Castro A. Desarrollo de un biomodelo de ratas anémicas mediante dos tipos de dieta de caseína. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2010;20(1):26-34. RNP: 221. ISSN: 1561-2929.**

Descriptor DeCS: Caseína / Hierro / Hemoglobina / Ratas Wistar.

¹ Máster en Ciencias de la Salud. ² Doctor en Ciencias Veterinarias. ³ Doctor en Ciencias Biológicas.

¶ Laboratorio de Reconstituyentes. BIOCEN Centro Nacional de Biopreparados. Bejucal. Cuba.

§ Laboratorio de Biología Animal Experimental. Facultad de Ciencias. UNAM Universidad Autónoma de México. Ciudad México. Distrito Federal. México.

Recibido: 10 de Enero del 2010. Aceptado: 15 de Enero del 2010.

Yenela García Hernández. Laboratorio de Reconstituyentes. BIOCEN Centro Nacional de Biopreparados. Carretera Beltrán Kilómetro 1½. Bejucal. Cuba.

Correo electrónico: yenela@biocen.cu

INTRODUCCIÓN

La anemia por deficiencia de Fe afecta aproximadamente a la tercera parte de la población mundial.¹ Aunque la intensidad de la anemia en Cuba puede considerarse entre ligera y moderada, la elevada frecuencia de presentación en el país la ha convertido en un importante problema de salud pública, que puede influir negativamente en la calidad de vida de los que la padecen, en particular los grupos de riesgo como los niños pequeños y la mujer en edad fértil.²

Para responder a los trastornos causados por la carencia del mineral de hierro en Cuba, desde hace más de 15 años el BIOCEN Centro Nacional de Biopreparados (La Habana, Cuba) ha desarrollado una línea de anti-anémicos empleando la sangre bovina como fuente de Fe hemínico, lo que ha resultado en la obtención del producto Trofin® en la forma farmacéutica de suspensión oral, junto con NeoTrofin® y NeoTrofinC®, éstos disponibles en tabletas. Tales productos han sido altamente eficaces en los diferentes grupos poblacionales evaluados.³

Para la evaluación de la eficacia antianémica del producto, así como de la biodisponibilidad del Fe durante el desarrollo de nuevos productos de ésta línea, se hace necesario contar con un biomodelo animal anémico. La rata ha sido el modelo animal más empleado en estudios relacionados con el Fe, aún a pesar de las diferencias que la separan del hombre.⁴ Se ha reportado previamente el desarrollo de un modelo de anemia en ratas adultas Wistar mediante la combinación de una dieta semipurificada y la flebotomía.⁵ Sin embargo, no se tienen referencias en Cuba de la inducción de anemia en ratas recién destetadas, que es el biomodelo más empleado en tales estudios.⁶⁻¹¹

El método de “depleción-repleción de la hemoglobina” consiste en disminuir los

niveles de Hemoglobina (Hb) por debajo de las cantidades fisiológicas propias de la especie, mediante una alimentación basada en una dieta deficiente en Fe y proteínas. Para que el biomodelo sea efectivo se acepta que la disminución sea del 30-50% de los valores iniciales de Hb.⁹ Esta primera etapa se le denomina “fase de depleción”. La segunda parte del método, la “fase de repleción”, consiste en elevar nuevamente los niveles de Hb hasta valores fisiológicos mediante el suministro de diferentes fuentes de Fe, ya sea en forma de preparados farmacéuticos o como suplemento de la dieta de caseína. El método de “depleción-repleción de la hemoglobina” ha sido validado para la realización de estudios de biodisponibilidad del Fe en un modelo animal que emplea la rata recién destetada.¹² Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de diferentes formulaciones de dietas purificadas, a partir de caseína como única fuente de proteína, junto con diferentes metodologías de mantenimiento de los animales, en el desarrollo de un biomodelo de ratas anémicas, para seleccionar la más efectiva de ellas.

MATERIAL Y MÉTODO

Reactivos y soluciones: Acetato de amonio, Citrato de sodio, Óxido de selenio, Molibdato de amonio, Sulfato de manganeso (Merck®, Alemania); Cloruro de sodio, Acido clorhídrico 37%, Hidróxido de sodio, Fosfato de calcio dihidratado, Sulfato de magnesio heptahidratado, Fosfato de potasio monobásico, Yoduro de potasio, Glucosa anhidra, Cloruro de zinc (Applichem®, Alemania); Solución patrón de Cianometahemoglobina: 57.2 mg/100 mL (BDH®, Inglaterra); Solución HEMOTEST (HELFA Diagnostics®, Cuba); mezcla de vitaminas, Caseína de alto contenido de nitrógeno, Almidón de maíz y Alphacel (MP

Biomedicals®, EEUU), FORANE® (Laboratorios PISA, México).

Elaboración y caracterización de las dietas: Se prepararon manualmente dos formulaciones diferentes de dietas de caseína, observando adecuadas condiciones higiénico-sanitarias: *Formulación #1*: 8.0% de caseína; y *Formulación #2*: 5.0%; respectivamente. La Tabla 1 muestra la composición nutrimental de las formulaciones desarrolladas. Las formulaciones preparadas se almacenaron en contenedores plásticos con tapa a una temperatura de $8.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$. A cada formulación se le determinó el contenido total de Fe mediante espectroscopia de absorción atómica (Analytik Jena®, Modelo AAS Vario 6, Alemania).

Universidad Autónoma de México (México DF). El protocolo experimental ejecutado fue aprobado por el Comité de Ética del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se realizó el marcaje individual de las ratas mediante la perforación de las orejas. Se midió el peso corporal de cada animal, y se les extrajo sangre del plexo retro-orbital para la determinación de la concentración de Hb por el método de la Cianometahemoglobina.¹³ Los animales se alojaron en las condiciones propias del bioterio, con ciclos alternantes de luz-oscuridad de 12 horas. Durante el desarrollo del procedimiento experimental se les suministró a los animales agua desionizada y alimentos *ad libitum*.

Tabla 1 Composición de las formulaciones de dietas de caseína.

Ingredientes	Formulación #1 g.Kg ⁻¹	Formulación #2 g.Kg ⁻¹
Caseína de alto contenido de nitrógeno (95% de proteína)	84	53
Almidón de maíz	700	400
Glucosa anhidra	-	300
Aceite de soya	84	82
Mezcla de minerales ¹	48	48
Mezcla de vitaminas ²	20	20
Alphacel	22	22
Agua desionizada	42	75

¹ Carbonato de calcio: 292.9; Fosfato de calcio dihidratado: 4.3; Sulfato de cobre pentahidratado: 2.44; Sulfato de magnesio heptahidratado: 99.8; Fosfato de potasio monobásico: 343.1; Cloruro de sodio: 250.6; Cloruro de zinc: 0.2; Óxido de selênio: 0.006; Yoduro de potasio: 0.005; Molibdato de amônio: 0.025; Sulfato de manganeso: 1.21; Sacarosa: 5.414. Todas las cantidades en g.Kg⁻¹.

² Acido p-aminobenzoico: 5.0; Acido ascórbico encapsulado al 97.5%: 45; Biotina 0.02; Cianocobalamina: 1.35; Pantotenato de calcio: 3.0; Cloruro de colina: 75; Acido fólico: 0.09; Inositol: 5.0; Menadiona: 2.25; Niacina: 4.25; Hidrocloruro de piridoxina: 1.0; Riboflavina: 1.0; Tiamina HCl: 2.0; Vitamina A acetato (500,000 μg^{-1}): 1.8; Vitamina D (850,000 μg^{-1}): 0.125; Vitamina E acetato (250 μg^{-1}): 22; Dextrosa: 821.12. Todas las cantidades en g.Kg⁻¹.

Animales y condiciones experimentales: Se utilizaron 40 ratas machos Wistar recién destetadas, con 21-25 días de nacidas, provenientes de la colonia del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM

Procedimiento experimental: A la mitad de las ratas se les administró la formulación #1 (Grupo 1), mientras que la otra mitad recibió la formulación #2 (Grupo 2). Todos los animales se alojaron en grupos de 3 en

cajas de acero inoxidable con piso de rejilla. Las ratas incluidas en el Grupo 1 se trataron durante 4 semanas, mientras que en las del Grupo 2 el protocolo experimental se condujo durante 2 semanas solamente. En los animales tratados con la formulación #2 se realizó la flebotomía del plexo orbital para obtener muestras de sangre equivalentes al 10% del volumen sanguíneo del animal, en días alternos, durante la segunda semana de administración de la dieta de caseína. Por el contrario, en las ratas del Grupo 1 la medición del peso corporal y la determinación de Hb se realizaron cada 2 semanas de tratamiento.¹³ Para la extracción de sangre, los animales se anestesiaron en atmósfera de FORANE®.

utilizó el programa StatGraphics Centurion versión 15.0 (StatGraphics, Pennsylvania, Estados Unidos) para el análisis estadístico. Se empleó un nivel del 5% para denotar las diferencias observadas como significativas.

RESULTADOS

El contenido total de Fe en las formulaciones desarrolladas fue como sigue: *Formulación #1*: 12.05 ± 0.2 mg.Kg⁻¹; y *Formulación #2*: 9.54 ± 1.00 mg.Kg⁻¹; respectivamente.

La Tabla 1 muestra el comportamiento del peso del animal en respuesta a las formulaciones dietéticas ensayadas. Se comprobó aumento significativo del peso en

Tabla 1. Comportamiento del peso de las ratas machos Wistar recién destetadas tratadas con 2 formulaciones diferentes de una dieta de caseína durante 4 semanas (Formulación #1), o 2 semanas (Formulación #2), en los tiempos experimentales, 0, 14 y 28 días.

Dieta ensayada	Peso, g		
	t = 0	t = 14 días	t = 28 días
Formulación #1: Caseína: 8.0%	33.67 ± 2.66	43.17 ± 4.92 $\Delta +9.50^*$	58.33 ± 8.33 $\Delta +24.66^*$
Formulación #2: Caseína: 5.0%	37.56 ± 9.01	42.20 ± 7.21 $\Delta +4.64^*$	NR

* Diferencias significativas respecto de t = 0, para p < 0.05.

Leyenda: NR: No realizado (en virtud del diseño experimental).

Se tomó como criterio de obtención de un animal con anemia aquel cuya concentración de Hb fuera < 90 g.L⁻¹. Se tomó como criterio de eficiencia de las formulaciones evaluadas aquella que permitiera inducir anemia en el 90-100% de los animales en el menor tiempo posible.

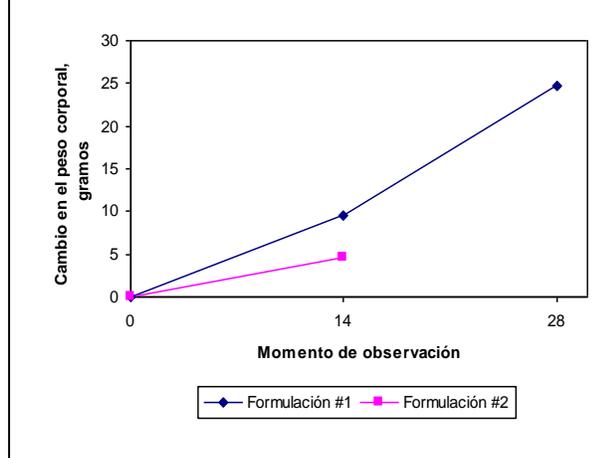
Procesamiento de datos y análisis estadístico-matemático de los resultados: El significado de los cambios ocurridos en los niveles de Hb y el peso corporal del animal en cada muestreo realizado respecto de los valores basales se evaluó mediante un test "t" de Student para muestras pareadas. Se

el animal tratado con una u otra formulación. Las diferencias observadas entre los grupos respecto del peso basal fueron juzgadas como propias del proceso de asignación del animal a uno u otro grupo experimental, y se declararon como no significativas (t = -1.22; p > 0.05).

La Figura 1 muestra la curva de ganancia de peso del animal tratado con una u otra de las formulaciones desarrolladas. La formulación #1 resultó en una mayor ganancia de peso del animal en t = 14. Sin embargo, la ganancia de peso obtenida con la formulación #2 se juzgó como

satisfactoria para los objetivos de la presente investigación.

Figura 1. Comportamiento del peso corporal de ratas Wistar machos recién destetadas tratadas con dos formulaciones diferentes de dietas de caseína. (■) Formulación #1. (◆) Formulación #2.



La Tabla 3 muestra el cambio en las concentraciones de Hb observado en cada grupo de tratamiento de acuerdo con la formulación de la dieta de caseína administrada. Se observó una disminución significativa de la Hb en cada grupo, más pronunciada para tiempos mayores de muestreo.

Finalmente, la Tabla 4 muestra la eficiencia de las formulaciones de la dieta de caseína empleadas en este ensayo. En el caso de la formulación #1, el 55.0% de los animales desarrollaron anemia (definida como $Hb < 90 \text{ g.L}^{-1}$), mientras que la frecuencia de anemia entre los tratados con la formulación #2 fue del 64.0%.

DISCUSIÓN

El desarrollo farmacéutico actual exige la utilización de modelos animales cuyo comportamiento sea lo más semejante posible al del ser humano, y que, además, sea de utilización factible, de fácil manejo, y

costo-eficiente. La utilización de los modelos animales también tiene como objetivo reducir al mínimo la utilización de seres humanos en ensayos terapéuticos, que encarece el costo de los experimentos, y presupone limitaciones desde el punto de vista ético.¹⁴ En consecuencia, la rata es el modelo más utilizado en la actualidad en estudios nutricionales.⁴

El contenido de proteínas y Fe en las dos formulaciones de dietas de caseína evaluadas en este estudio era inferior al fijado por los requerimientos propios de la especie, cuando el aporte de proteínas debería ser del 15.0%, mientras que el suministro de Fe debería alcanzar los 35 mg del mineral por cada Kg de alimento.¹⁵ Para la preparación de la formulación #1 se utilizaron las pautas publicadas previamente, en las que las proteínas en forma de caseína se incluyeron en la dieta del animal en una proporción de 8.0-9.0%, junto con un 70% de almidón de maíz como fuente de energía.⁹⁻¹⁰ Por su parte, la composición nutricional de la formulación #2 fue modificada, a fin de disminuir el porcentaje de caseína hasta un 5%, y sustituir un 30.0% de la energía aportada como almidón de maíz por la glucosa anhidra. La combinación de glucosa y almidón de maíz como fuentes de energía fue posible después de cambios en la composición de la dieta AIN 76A: una dieta purificada para ratas que contiene 500 g de sacarosa, y 150 g de almidón de maíz por Kg del producto, respectivamente. Estos nutrientes representan el 65.0% del aporte energético en esta formulación.¹⁵ Las modificaciones hechas en la composición energética de la formulación #2 tuvieron como objetivo disminuir el aporte en Fe debido al almidón, y contribuir a la palatabilidad de la dieta.

Las dietas de caseína reportadas en ensayos previos tenían un contenido de Fe de entre 14-16 mg del mineral por Kg del alimento.⁹⁻¹⁰ En comparación, el contenido

de Fe de las formulaciones evaluadas en este trabajo fue menor. Sin embargo, el que la Hb no cayera en el animal tratado por debajo de los 90 g.L⁻¹ hasta pasadas las 4 semanas entra en contradicción con los resultados obtenidos por Hernández *et al.*,⁹⁻¹⁰ quienes observaron anemia después de 10 días de tratamiento. La literatura reporta que las dietas de caseína con menos de 8 mg de Fe por Kg de alimento permitieron obtener anemia en ratas Wistar en 5 semanas.⁸ En este trabajo se utilizaron ratas Wistar, al igual que en el estudio de Srigiridhar y Nair,⁸ mientras que en los trabajos de Hernández *et al.* se utilizaron ratas Sprague-Dawley.⁹⁻¹⁰ Las diferencias en el tiempo de depleción de la Hb podría estar relacionada entonces con la línea de ratas utilizada en el estudio. Los resultados obtenidos permiten suponer que la línea Wistar posee una mayor capacidad de adaptación a la deficiencia de Fe y proteínas. Así, se necesita un tiempo más prolongado para la aparición de la anemia en una rata Wistar. Asimismo, pocos animales de esta línea desarrollarán anemia en el tiempo previsto.

La extensión del tiempo de depleción de Fe para la aparición de la anemia no es recomendable en la desarrollo de un modelo experimental de anemia, puesto que la deficiencia de Fe y proteínas ocasiona otros daños en el animal, además de los asociados a la deficiencia de Fe, todo lo cual introduciría otras variables en el diseño experimental con efectos no deseados. Los resultados obtenidos con la formulación #1 condujeron al desarrollo de la formulación #2, así como la modificación del diseño experimental, al reducir el tiempo de tratamiento de 4 semanas a solo 2, e incorporar la flebotomía. Estas modificaciones tuvieron como objetivo obtener la anemia en un período de tiempo más corto, así como evaluar si la variable tiempo de tratamiento para obtener la anemia ejercía influencia en cuanto a la

cantidad de animales anémicos. La inclusión de la flebotomía en el diseño experimental se realizó teniendo en cuenta los reportes de Whittaker y Vanderveen,⁶ y Whittaker y Ologunde,⁷ quienes combinaron la administración de dietas deficientes en Fe y proteínas con la flebotomía en ratas recién destetadas, en un tiempo total de 7 días.

Tabla 3. Comportamiento de la Hb en ratas machos Wistar recién destetadas tratadas con 2 formulaciones diferentes de una dieta de caseína durante 4 semanas (Formulación #1), o 2 semanas (Formulación #2), en los tiempos experimentales, 0, 14 y 28 días. Se presentan la media y (entre parentésis) la desviación estándar de las determinaciones, y la diferencia respecto del valor basal.

Formulación ensayada	Hb, g.L ⁻¹		
	t = 0	t = 14 días	t = 28 días
#1: Caseína: 8.0%	111.5 (9.9)	99.5 (9.0) Δ -12.0*	85.9 (14.5) Δ -25.7*
#2: Caseína: 5.0%	99.4 (8.4)	82.5 (21.1) Δ -16.8*	NR

* Diferencias significativas respecto de t = 0, para p < 0.05.

Leyenda: NR: No realizado (en virtud del diseño experimental).

En el presente estudio, la flebotomía se incluyó en la segunda semana, puesto que se consideró que durante la primera semana de tratamiento con la dieta los animales se adaptarían a las condiciones experimentales (como el alojamiento y la alimentación), y pasado ese tiempo, la afectación por el estrés que provocaría la extracción repetida de sangre podría ser menor. Además, este proceder se realizó en animales anestesiados con FORANE®, uno de los anestésicos más utilizados en la actualidad, puesto que solo el 0.2% del gas administrado se metaboliza.¹⁶

Tabla 4. Eficiencia de las formulaciones de caseína a partir del número de animales con anemia (definida ésta como $Hb < 90 \text{ g.L}^{-1}$).

Dieta ensayada	Hb, g.L^{-1}	% Anémicos ($Hb < 90 \text{ g.L}^{-1}$)
Formulación #1	7.60 ± 0.70	55.0
Formulación #2	7.17 ± 1.65	64.0

Las modificaciones incluidas en el diseño experimental mediante el cual se evaluó la formulación #2 permitieron alcanzar el objetivo de obtener la anemia en un menor tiempo. Sin embargo, no se logró aumentar el número de animales anémicos, al menos en la cantidad pre-establecida, que era igual/mayor del 90.0%. Estos resultados corroboraron, no obstante, que la variable tiempo de tratamiento, utilizada como indicador de eficiencia del modelo, no influyó en la cantidad de animales anémicos. Estos resultados sugieren darle mayor importancia a otras variables, como la línea de ratas.

Al analizar integralmente los resultados obtenidos con ambas formulaciones y ambos diseños experimentales, teniendo en cuenta el estrés implicado en el procedimiento de flebotomía aun en condiciones de anestesia, el comportamiento del peso corporal y el bajo porcentaje de animales anémicos consideramos desechar la formulación #2 y su respectivo diseño experimental, así como continuar trabajando en la optimización de la formulación #1.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que las formulaciones de dietas de caseína empleadas en este ensayo, con sus respectivos diseños experimentales, pueden ser utilizadas en la obtención de un biomodelo de animales con anemia. Sin embargo, las formulaciones usadas se distinguieron por una baja eficiencia, en cuanto al número de animales que desarrollaron anemia, lo que constituye una

desventaja desde el punto de vista de la factibilidad económica del biomodelo. Así, en la continuación del desarrollo de un modelo experimental de anemia, se sugiere evaluar nuevas formulaciones de dietas de caseína en relación al porcentaje de proteínas y las fuentes de carbohidratos en la línea de ratas Sprague-Dawley.

SUMMARY

*Iron deficiency is a world public health problem. Hemoglobin depletion method is widely used to obtain animal biomodels for the assessment of Iron bioavailability, as part of the development of new anti-anemics. Results of the development of a biomodel of anemic rats by means of administration of casein in two different types of diet formulations to 40 weaned male Wistar rats are presented in this work. Half of the animals was treated with a diet containing 8% of proteins for 4 weeks (Group 1), while the other half received a formulation with 5% of protein content during 2 weeks (Group 2). Body weight and Hemoglobin (Hb) was measured in every animal at regular intervals: Group 1: Every 2 weeks; Group 2: After the second week of treatment, every other day. An increase in body weight was observed in animals treated with either of the two formulations, along with a reduction in Hb values. Number of animals developing anemia was low in both groups. Casein diet formulations assessed in this trial can be used for obtaining a biomodel of anemic rats, but it is recommended to continue the development of the model to improve its economical feasibility. **García Hernández Y, González Hernández R, Cárdenas Vázquez R, Carmona Castro A.** Assessment of two casein-based diets in the creation of a biomodel of anemic rats. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2010;20(1):26-34. RNP: 221. ISSN: 1561-2929.*

Subject headings: Casein / Iron / Hemoglobin / Wistar rats.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kraemer K, Zimmermann MB. Nutricional anemia. Sight and Life Press. Geneva: 2007. pp 10-12.
- Estado de la anemia en Cuba. Disponible en: <http://cuba.nutrinet.org/areas-tematicas/vitaminas-y-minerales/introduccion/117?task=view>. Fecha de última visita: 23 de Julio del 2010.
- González R, Aznar E, González M, Hernández JC, Varela A, Silva P, García Y. Nueva línea de productos para prevenir y tratar la anemia partiendo del hierro hemínico. INFORMACEUTICO 2008;15:43-8.
- Patterson JK, XG Lei and DD Millar. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. Exp Biol Med 2008;233: 651-64.
- Tillán JC, Chanfrau JR, Gómez JM, Pardo Z, Agüero S. Actividad antianémica de *Cassia grandis L.* Rev Cubana Farm 2004;38(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000300009. Fecha de última visita: 21 de Julio del 2008.
- Wittaker P, Vanderveen JE. Effect of EDTA on the bioavailability to rats fortification iron used in Egyptian balady bread. Brit J Nutr 1990;63: 587-95.
- Wittaker P, Ologunde M. Study of iron bioavailability in a native Nigerian grain amaranth cereal for young children using a rat model. Cereal Chem 1990;67: 505-8.
- Srigiridhar K, Nair KM. Iron deficient intestine is more susceptible to peroxidation damage during iron supplementation in rats. Free Radic Biol Med 1998;25:660-5.
- Hernández M, Sousa V, Moreno A, Villalpando S, López Alarcón M. Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different source of iron. J Nutr 2003;133:154-9.
- Hernández M, Sousa V, Villalpando S, Moreno A, Montalvo I, López Alarcón M. Cooking and Fe fortification have different effects on iron bioavailability of bread and tortillas. J. Nutr. 2006, 25(1): 1-6.
- García Y, Menéndez R. Iron deficiency and lipid peroxidation. Pharmacologyonline 2007; 1:173-179. Disponible en: http://www.unisa.it/download/1966_103_05_1751305689_11_GarciaNewsletterOK.pdf. Fecha de última visita: 23 de Julio del 2009.
- Forbes AL, Adam CE, Arnaud RF, Chichester CO, Cook JD, Harrison BN, Hurrell RF, Khan SG, Morris ER, Tanner JT, Whittaker P. Comparison of in vitro animal and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group-Task Force report on iron bioavailability. Am J Clin Nutr 1989;49:225-38.
- Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies: a technique for the analysis of undiluted blood and concentrated hemoglobin solutions. J Biol Chem 1935;112:105-15.
- Quintero GA, González RG, Sánchez MJ. Bioavailability of heme iron of biscuit filling using piglets as an animal model for human. Int J Biol Sci 2008; 4:58-62.

15. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition Nutrient Requirements of laboratory rat. En: Nutrient requirements of laboratory animals. Academy Press. Washington: 1995. pp 11-79.
16. González I, Aragón A, Álvarez J, Cortés J, Gándara L, Novo H y cols. Agentes anestésicos inhalatorios. Protocolos de Vigilancia Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Salud. Madrid: 2001.