

Laboratorio de Reconstituyentes. BIOCEN Centro Nacional de Biopreparados.

## **EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UNA FORMULACIÓN DESHIDRATADA DE HIERRO HEMÍNICO + HIERRO IÓNICO EN RATAS.**

*Yenela García Hernández,<sup>1</sup> Raúl González Hernández,<sup>2</sup> Roberto Menéndez Soto del Valle,<sup>2</sup> Maritza González Pérez,<sup>1</sup> Virgilio Bourg Llamo.<sup>3</sup>*

### **RESUMEN**

La deficiencia de hierro es el déficit micronutricional más generalizado en el mundo. La suplementación con sales de hierro se usa ampliamente en el tratamiento de esta deficiencia, pero puede ocasionar reacciones adversas en el 25% de los pacientes tratados. El TROFIN® deshidratado es una formulación antianémica constituida por hierro hemínico que ha sido propuesta para el tratamiento de los estados de deficiencia de hierro. La utilidad y seguridad del TROFIN® deshidratado han sido evaluadas en diferentes grupos poblacionales. Se ha logrado una elevada efectividad, sin que hasta la fecha se hayan reportado reacciones adversas. Con el presente trabajo se evaluó el efecto de la suplementación conjunta de TROFIN® deshidratado + Fumarato ferroso durante 14 días en 28 ratas machos Sprague-Dawley distribuidas en 4 grupos experimentales: Grupo I: Control: Carboximetilcelulosa al 1%; II: TROFIN®; III: Fumarato ferroso; y IV: TROFIN® + Fumarato ferroso. La respuesta al tratamiento se midió mediante los cambios en el peso corporal y variables hematológicas y bioquímicas especificadas. Se observó un incremento significativo de la concentración de hemoglobina en todos los grupos. En el Grupo IV suplementado con TROFIN® + Fumarato ferroso se registraron los mayores incrementos de Hemoglobina. Los niveles séricos de hierro fueron significativamente mayores en los grupos II – IV. Sin embargo, no se observaron diferencias entre-grupos respecto de las capacidades de saturación de hierro y la concentración de este mineral en muestras de tejido hepático. Este trabajo ha demostrado el efecto favorable en ratas de la suplementación con formulaciones que combinan diferentes presentaciones de hierro, lo que abre la posibilidad del uso en seres humanos. *García Hernández Y, González Hernández R, Menéndez Soto del Valle R, González Pérez M, Bourg Llamo V. Efecto de la suplementación con una formulación deshidratada de hierro hemínico + hierro iónico en ratas. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2008;18(2):204-12. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.*

*Descriptores DeCS:* HIERRO / TROFIN® / FUMARATO FERROSO / RATAS / ANEMIA FERRIPRIVA / DEFICIENCIA DE HIERRO.

---

<sup>1</sup> Licenciada en Biología.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias Biológicas.

<sup>3</sup> Doctor en Medicina Veterinaria.

Recibido: 7 de Abril del 2008. Aprobado: 17 de Noviembre del 2008.

*Yenela García Hernández.* Laboratorio de Reconstituyentes. Centro Nacional de Biopreparados. Carretera Beltrán Kilómetro 1 ½ . Bejucal. La Habana. Cuba.

Correo electrónico: [yenela@biocen.cu](mailto:yenela@biocen.cu)

## INTRODUCCION

Entre las deficiencias de micronutrientes, la de hierro constituye el trastorno nutricional de mayor alcance a nivel mundial. La deficiencia de hierro afecta a más de 2,000 millones de personas en el mundo entero, mientras que el 50% de ellas son anémicas.<sup>1</sup> En virtud de la insuficiente ingestión de este mineral con los alimentos, unido al incremento de las necesidades del mismo en los grupos poblacionales de riesgo, tales como los niños, las embarazadas y los ancianos, la suplementación con hierro se debería emplear tanto en la prevención de los estados de deficiencia, como en el tratamiento de la anemia.

El hierro se encuentra en la naturaleza en dos formas químicas diferentes: no hemínica (iónica) y hemínica. A los fines de profilaxis/tratamiento de la deficiencia de hierro, las sales de hierro obtenidas por vía sintética se utilizan ampliamente como fuente de hierro no hemínico. Sin embargo, estos productos tienen una baja biodisponibilidad, y pueden ocasionar reacciones adversas en el 25% de los pacientes.<sup>2-3</sup>

Se ha reportado la utilización satisfactoria de sangre bovina como fuente de hierro hemínico en algunos programas de fortificación de alimentos y suplementación nutricional para la prevención de la deficiencia de hierro.<sup>4-6</sup> En tal sentido, en el Centro Nacional de Preparados (BIOCEN) se han acumulado 15 años de experiencias en el desarrollo de una línea de antianémicos a partir de sangre bovina como fuente de hierro hemínico, lo que ha resultado en la obtención de TROFIN®, un producto que se comercializa dentro y fuera del país desde hace más de 10 años. El TROFIN® ha sido clasificado como un hidrolizado de hierro + proteína que se prepara a partir de materias primas

naturales como la sangre bovina y la miel de abejas, y al que se le incorpora enzimas propietarias y propóleos.<sup>7</sup> Los resultados de los ensayos clínicos con el TROFIN® como antianémico y reconstituyente en niños, ancianos y embarazadas han sido satisfactorios.<sup>8-11</sup>

Se ha confirmado la existencia en la mucosa intestinal de dos diferentes receptores para cada forma química de hierro.<sup>12-13</sup> Para que el hierro iónico pueda ser internalizado por el enterocito mediante la proteína transportadora específica DMT1 presente en la membrana celular, se hace necesario que el hierro iónico se mantenga en estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ). No obstante, se han descrito varios factores que pueden influir en el estado de oxidación del hierro iónico al actuar en la porción del intestino delgado donde se produce la absorción del mineral.<sup>14</sup>

Las 2 formas descritas de hierro pueden exhibir tasas diferentes de absorción. La cantidad de hierro absorbido fue mayor en pacientes a los que se le administró Hemoglobina deshidratada + Sulfato ferroso, en comparación con aquellos que recibieron indistintamente uno u otro tipo de hierro por separado.<sup>15</sup> Por otra parte, la ingestión de pequeñas cantidades de carne de cerdo junto con fitatos: potentes inhibidores de la absorción del hierro no hemínico, incrementó significativamente la absorción del hierro no hemínico en humanos.<sup>16</sup> Luego, si se pudiera contar con una formulación que contenga ambos tipos de hierro se podría lograr una mayor absorción del mineral respecto de otras que ofrecen uno u otro tipo de hierro por separado.

En consecuencia, se emprendió este trabajo para evaluar el efecto sobre variables hematológicas especificadas en ratas de laboratorio de una suplementación que incluía ambos tipos de hierro, con TROFIN® deshidratado como fuente de hierro hemínico, y

Fumarato ferroso para el aporte de hierro no hemínico, comparada con formulaciones que contenían solo TROFIN® deshidratado o Fumarato ferroso.

## MATERIAL Y METODO

**Reactivos y soluciones:** Solución patrón de Cianometahemoglobina (57.2 mg/100 mL) de BDH Diagnostics (Inglaterra); solución estándar de Hierro (1,000 mg Fe/L) de Merck Diagnostics (Alemania); juego de reactivos FERRIMAT para la determinación de hierro de BIOMERIEUX (Francia); juego de reactivos TIBC para la determinación de las capacidades de saturación de BIOMERIEUX (Francia); solución HEMOTEST de HELFA Diagnostics® (Cuba); solución GIEMSA de QUIMEFA Industria Químico farmacéutica (Cuba); Fumarato Ferroso, Fenantrolina e Hidroquinona, todos de SIGMA Diagnostics (Estados Unidos); CMC Carboximetilcelulosa y Acido tricloroacético, de BDH Diagnostics (Inglaterra); Acetato de amonio, Citrato de sodio, de Merck Diagnostics (Alemania); Acido clorhídrico al 37%, de Applichem (Alemania); TROFIN® deshidratado, número de lote 5P-30030, del BIOECN (La Habana Cuba); EMO 1002 AlyCo®, del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio CENPALAB (La Habana, Cuba).

**Animales:** Se utilizaron 28 ratas machos Sprague Dawley de 5 semanas de edad, suministradas por el CENPALAB. Las ratas se adaptaron en el BIOECN durante 3 días antes de la conducción del protocolo experimental.

Durante el completamiento del protocolo experimental las ratas se alojaron en cajas de polietileno con encamado de bagazo de caña desmeollado. A los animales se les garantizó libre acceso al agua y la

comida. Las condiciones ambientales durante el desarrollo del protocolo experimental se mantuvieron constantes a temperatura de  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , humedad de entre el 60 – 70%; y ciclos alternantes de luz/oscuridad de 12 horas.

El estudio con los animales de experimentación se llevó a cabo con la probación del Comité institucional de Cuidados y Usos de Animales de Laboratorio.

**Diseño experimental:** Terminado el período de adaptación, se determinó el peso de la rata mediante una balanza analítica SARTORIUS (Alemania). Se retiraron muestras de sangre por punción del plexo retroorbital. Las muestras de sangre se ensayaron para el contenido de Hemoglobina (Hb) por el método de la Cianometahemoglobina;<sup>17</sup> el tamaño del microhematocrito (HTC) de la altura de la columna de una muestra de sangre colocada en un tubo capilar y empaquetada después de centrifugación; y el Conteo Total de Leucocitos (CTL), después de extensión de una gota de sangre sobre una lámina portaobjetos, tinción con solución de GIEMSA, y recuento bajo un microscopio óptico (Carl Zeiss-Jena, Alemania).

Los animales fueron distribuidos en 4 grupos de 7 animales cada uno, de manera que no existieran diferencias entre-grupos respecto de la concentración promedio de Hb.

Las sustancias de ensayo fueron preparadas como una suspensión en CMC al 1%, y se administraron una vez al día mediante intubación intragástrica.

Se creó un grupo control que recibió CMC al 1%. Los siguientes 21 animales recibieron el tratamiento experimental de acuerdo al protocolo siguiente: Grupo II: TROFIN® deshidratado a la dosis de 0.03 mg Fe/día (preparado a partir de 25 mg del hidrolizado de hierro+proteínas; III: Fumarato ferroso a la dosis de 0.8 mg Fe/día; y IV: TROFIN® deshidratado + Fumarato

ferroso al 50% para una dosis total de 0.42 mg Fe/día.

El protocolo experimental se extendió por 14 días. A la conclusión del estudio, las ratas se pesaron nuevamente, y se les extrajo muestras de sangre por punción del plexo retro-orbital para la determinación de la Hb, el HTC, y el CTL.

**Análisis estadístico de los resultados:** Se docimó la significación estadística de las variaciones ocurridas en las variables del estudio terminado el período experimental mediante el test de diferencias para medias apareadas basado en la distribución "t" de Student.

Tabla 1. Evolución del peso corporal y las variables hematológicas y bioquímicas. Se muestran la media  $\pm$  desviación estándar de las variables de respuesta del estudio. También se muestran las magnitudes de los cambios observados en las variables al final del período de observación.

Indicador	Día	Grupos experimentales			
		I	II	III	IV
		CMC 1%	TROFIN	Fumarato ferroso	TROFIN + FF 50%
Tamaño		7	7	7	7
Peso, g	0	153.21 $\pm$ 23.25	147.49 $\pm$ 18.87	156.35 $\pm$ 22.07	154.50 $\pm$ 18.72
	14	248.00 $\pm$ 31.34	244.29 $\pm$ 23.77	253.10 $\pm$ 29.05	247.65 $\pm$ 19.71
		$\Delta$ 94.79 *	$\Delta$ 96.8 *	$\Delta$ 96.75 *	$\Delta$ 93.15 *
Hb, g.dL <sup>-1</sup>	0	11.45 $\pm$ 0.52	11.87 $\pm$ 0.15	11.77 $\pm$ 0.11	11.67 $\pm$ 0.39
	14	12.68 $\pm$ 0.50	13.09 $\pm$ 0.12	13.09 $\pm$ 0.20	13.11 $\pm$ 0.07
		$\Delta$ 1.23 *	$\Delta$ 1.22 *	$\Delta$ 1.32 *	$\Delta$ 1.44 <sup>f</sup>
HTC, %	0	36.83 $\pm$ 0.75	38.43 $\pm$ 0.98	38.00 $\pm$ 0.58	37.71 $\pm$ 1.11
	14	41.83 $\pm$ 0.98	43.00 $\pm$ 0.82	42.43 $\pm$ 1.13	43.14 $\pm$ 0.69
		$\Delta$ 5.0 *	$\Delta$ 4.57 *	$\Delta$ 4.43 *	$\Delta$ 5.43 *
CTL, x 10 <sup>9</sup> L	0	4.58 $\pm$ 0.32	4.37 $\pm$ 0.56	4.23 $\pm$ 0.29	4.15 $\pm$ 0.79
	14	4.92 $\pm$ 0.34	4.54 $\pm$ 0.31	4.73 $\pm$ 0.30	4.70 $\pm$ 0.39
		$\Delta$ 0.34	$\Delta$ 0.17	$\Delta$ 0.50	$\Delta$ 0.55

Leyenda: CMC: Carboximetilcelulosa. FF: Fumarato ferroso.

\* Diferencias significativas entre-momentos de observación.

<sup>f</sup> Diferencias significativas con respecto al grupo control, en cada uno de los muestreos.

Obtenidas las muestras de sangre del plexo retroorbital, las ratas fueron anestesiadas en atmósfera de éter, la vena femoral fue puncionada para obtener alícuotas de suero para la determinación de la concentración de hierro sérico y de las capacidades de saturación, según las instrucciones de los fabricantes de los estuches de reactivos.

Completado este paso, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y el hígado se extrajo rápidamente, y se congeló a -20°C hasta el momento de la determinación de la concentración tisular de hierro.<sup>18</sup>

Las diferencias entre los grupos experimentales respecto de los cambios en los valores de las variables del estudio se examinaron mediante un análisis de varianza de una sola vía. Se empleó el test de Tukey para identificar la(s) fuente(s) de las variaciones. En cualquier caso, se fijó un nivel del 5% para denotar las diferencias como estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GrandPad 4.0 (Estados Unidos).

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la evolución inter-observación del peso del animal, junto con los resultados de las variables hematológicas del estudio. Los grupos experimentales solo difirieron entre sí respecto del tamaño basal del HTC, aunque estas diferencias no tuvieron significación biológica, toda vez que los valores basales de HTC superaron el punto de corte de la normalidad biológica. Además, el HTC no constituyó un criterio para la conformación de los grupos experimentales.

En los grupos experimentales se produjo un incremento significativo del peso corporal, independientemente del protocolo experimental aplicado. También se constataron incrementos de la concentración de Hb y del tamaño del HTC. El CTL fue invariante del tratamiento administrado. Se debe destacar que el Grupo IV, que recibió conjuntamente TROFIN + Fumarato ferroso, fue el que mostró las mayores ganancias de la Hb y el HTC.

hierro sérico superiores al observado en los animales tratados con CMC al 1.0%.

## DISCUSIÓN

El ensayo descrito en este manuscrito muestra los resultados observados en ratas de laboratorio después de la suplementación con una preparación deshidratada que combina 2 formas de hierro: una hemínica y otra iónica. El incremento en los valores basales de Hb y HTC en el grupo experimental que recibió esta preparación de hierro, que fue del 17.0% cuando se le comparó con el observado en el Grupo Control, se destacó como el hallazgo más significativo al término del período de observación.

La concentración de Hb ha constituido el indicador más usado en la evaluación del efecto de la suplementación con sales de hierro en la profilaxis de la anemia ferropénica, puesto que el 65.0% del hierro corporal forma parte de la Hb circulante en la sangre.<sup>19</sup>

Tabla 2. Estado de la homeostasis del hierro. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de la variable determinada al final del período de observación.

Grupo experimental	Hierro sérico ( $\mu\text{moles.L}^{-1}$ )	TIBC ( $\mu\text{moles.L}^{-1}$ )	Hierro tisular ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$ )
CMC 1%	30.08 $\pm$ 12.11	96.81 $\pm$ 7.66	100.28 $\pm$ 17.06
TROFIN	46.20 $\pm$ 14.22 *	89.35 $\pm$ 10.67	103.47 $\pm$ 42.60
Fumarato ferroso	42.74 $\pm$ 11.06 *	82.64 $\pm$ 3.39	120.92 $\pm$ 25.26
T 50% + FF 50%	41.38 $\pm$ 6.03 *	89.20 $\pm$ 10.52	129.00 $\pm$ 36.95

\* Diferencias significativas respecto del Grupo Control.

Leyenda: CMC: Carboximetilcelulosa. TIBC: Capacidades totales de saturación de Hierro.

T: Trofin. FF: Fumarato ferroso.

La Tabla 2 muestra las determinaciones de hierro sérico, capacidades de saturación y hierro tisular conducidas al final del estudio. Los grupos experimentales solo difirieron entre sí respecto de las cifras de hierro sérico. Con cualquiera de los tratamientos se lograron valores de

La constatación de que el mayor incremento en la concentración de Hb se observó en las ratas suplementadas con la formulación que combinaba los 2 tipos de hierro sugiere que en estos animales se logró una mayor absorción del mineral aportado, y con ello, un

aumento en la síntesis de la molécula de Hb.

El efecto de la preparación combinada de hierro sobre la concentración sanguínea de Hb podría ser dual. El aporte de las 2 formas de hierro podría estimular en el animal, al mismo tiempo, las 2 vías conocidas de absorción del mineral.

También pueden haber influido beneficiosamente en la concentración de Hb observados en los animales que recibieron la formulación combinada (hierro hemínico + hierro iónico) los diferentes componentes que contiene la formulación de hierro hemínico empleada en este estudio, tales como proteínas, péptidos, aminoácidos y azúcares. Estos componentes pudieran potenciar la absorción duodenal del hierro iónico aportado en forma de Fumarato ferroso. Se debe recordar que es en el duodeno donde se produce fundamentalmente la absorción del hierro. Sin embargo, el pH menos ácido propio del duodeno (pH = 6.0) respecto del propio del estómago (pH = 2.0), podría dificultar que el hierro iónico se mantenga en estado ferroso, paso necesario para la absorción de este mineral. No obstante, se ha reportado que ciertos aminoácidos, azúcares, aminas y amidas pueden quelar el hierro que se aporte como especie iónica, contribuyendo de esta manera a que el  $Fe^{+2}$  se mantenga en ese estado de oxidación, imprescindible para ser absorbido al interior del enterocito.<sup>14</sup>

Los cambios observados en las cifras séricas de Hb y HTC, las concentraciones sanguíneas de hierro, las capacidades de saturación, y el hierro contenido en el hígado al final de la ventana de observación, fueron similares entre los grupos en comparación, independientemente de la fuente de hierro aportada. La ausencia de influencia de las preparaciones de hierro empleadas en este estudio sobre los indicadores del metabolismo del

mineral podría explicarse en base a la composición íntima de cada formulación. La dosis de hierro incluida en cada suplemento se ajustó según la biodisponibilidad del mineral, fenómeno dependiente de la forma química del mismo. La biodisponibilidad del hierro hemínico suele ser de entre el 15.0-35.0%, pero la del no hemínico es menor, y se estima entre un 2.0-20.0%.<sup>20</sup>

Teniendo en cuenta estos elementos, la preparación TROFIN® deshidratada contenía una cantidad de hierro 25 veces menor que la incluida en la sal de Fumarato ferroso, pues se supuso una mayor biodisponibilidad del hierro hemínico aportado, y un efecto potenciador de sustancias favorecedoras de la absorción del hierro iónico, como péptidos, aminoácidos, azúcares, entre otros, integrantes de la preparación deshidratada.

Los resultados observados en los indicadores del metabolismo de hierro con varias preparaciones del mineral sugieren la conducción de ensayos específicos orientados a la evaluación del comportamiento de formulaciones combinadas de hierro que contengan dosis de la especie no hemínica (iónica) menores a las empleadas en este estudio. El estudio de la influencia sobre el metabolismo de este mineral de las preparaciones así diseñadas, y la relación de la composición química del suplemento con la biodisponibilidad del hierro en ellas contenido, podrían aportar nuevos conocimientos del efecto del TROFIN® deshidratado sobre la absorción del hierro iónico.

Se debe destacar que los resultados anotados anteriormente se observaron en animales de los que se aseguró la preservación de los estados de salud y nutricional durante la conducción del ensayo. En los grupos experimentales se observó un incremento significativo del peso corporal al final del ensayo, independientemente de los suplementos

empleados y las dosis aportadas de hierro. También se constataron conteos preservados del número total de leucocitos circulantes en sangre: expresión de la constancia del sistema inmunológico de los animales empleados en el ensayo.

## CONCLUSIONES

Se han presentado evidencias favorables del uso de una combinación farmacológica que incluye 2 tipos de hierro en un modelo experimental construido con ratas machos Sprague-Dawley. Los resultados beneficiosos constatados en la Hb y el HTC abre nuevas perspectivas para el empleo de formulaciones combinadas de hierro (hemínico + iónico) en seres humanos, en los que las terapias disponibles actualmente de suplementación con preparados de hierro iónico pueden ocasionar reacciones adversas en el 25.0% de los pacientes.<sup>2,3</sup> En contraposición con la alta tasa de reacciones adversas reportada después del consumo de sales de Fumarato ferroso, las formulaciones que incluyen hierro hemínico, como el TROFIN®, se destacan por la buena tolerancia, y la ausencia de efectos secundarios no deseados.<sup>9-11,21-22</sup>

No debe pasarse por alto que la producción de las formulaciones de hierro hemínico está actualmente limitada, por cuestiones tecnológicas y de costos de obtención, de cara a una demanda incrementada. Luego, los resultados expuestos en este artículo pueden constituirse en importantes elementos científicos que apoyen un mejor aprovechamiento de las fuentes existentes de hierro a los fines del combate de los estados de deficiencia de hierro.

## SUMMARY

*Iron deficiency is the major nutritional disorder around the world. Supplementation with iron salts has been widely used for treating this disorder, notwithstanding the 25% adverse reactions rate seen in medicated patients. Dehydrated TROFIN® is an antianemic formulation made up with heminic iron that has been proposed for treatment of iron deficiency states. Usefulness and safety of dehydrated TROFIN® have been assessed in different populations, and a high effectiveness has been achieved along with a low rate of adverse reactions. The effect of dehydrated TROFIN® + Ferrous fumarate joint administration for 14 days in 28 male Sprague-Dawley distributed between 4 experimental groups: Group I: Control: 1% Carboxy-methylcellulose sodium salt; II: TROFIN®; III: Ferrous fumarate; and IV: TROFIN® + Ferrous fumarate. Response to treatment was measured by means of changes in body weight and specified hematological and biochemical variables. A significant increase in Hemoglobin concentration was observed in the experimental groups. Animals included in Group IV who were jointly supplemented with TROFIN® + Ferrous fumarate exhibited the highest increase in Hemoglobin. Serum iron levels were significantly higher among Groups II – IV. However, no between-groups differences were observed regarding iron binding capacities and liver amounts of this mineral. This work has demonstrated the favorable effect on rats of supplementation with formulations combining different presentations of iron, thus opening the possibility for their use in human beings. **García Hernández Y, González Hernández R, Menéndez Soto del Valle R, González Pérez M, Bourg Llamo V.** Effect of supplementation with a*

*dehydrated formulation combining hemic iron + ionic iron in rats. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2008; 18(2):204-12. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.*

*Subject headings: IRON / TROFIN® / FERROUS FUMARATE / RATS / FERROPENIC ANEMIA / IRON DEFICIENCY.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Viteri FE. Suplementación con hierro para el control de la deficiencia de hierro en poblaciones de riesgo. En: Deficiencia de Hierro: Desnutrición oculta en América Latina (Editores: O'Donnell MA, Viteri FE, Carmuega E). CESNI Centro de Estudios sobre Nutrición Infantil. Centro Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador. San Salvador: 1997. pp 297-312.
- Anónimo. Utilización de las sales de hierro. ¿Quién las necesita? Boletín Terapéutico Andaluz 2001; 17(1):1-3.
- Retamal González A. Anemias: Tratamiento farmacológico. Boletín Fármaco-terapéutico de Castilla, La Mancha. 2000;182:1-8.
- Hurrell RF. Fortification: Overcoming technical and practical barriers. Am J Clin Nutr 2002;132: 806-12.
- Olivares M, Hertrampf E, Pizarro F, Walter T, Cayazzo M, Llaguno S; *et al.* Hemoglobin-fortified biscuits: Bioavailability and its effects on iron nutrition in school children. ALAN Arch Latinoamer Nutr 1990;40:209-20.
- Castro DE. Preparados anti-anémicos obtenidos por la tecnología de métodos combinados. Alimentaria 1995;268:107-10.
- González R, Aznar E, González M. Composición físico-química del reconstituyente y antianémico Trofin®. Rev Mex Ciencias Farm 2004;36:2-5.
- Aznar E, González R, Carrasco M, Leyva B, Muñoz B. Aplicación del Trofin® en Geriátrica. Rev Mex Ciencias Farm 1997;28:20-3.
- Aznar E, González R, Morono M, González M, García O, Govín AT; *et al.* Ensayo multicéntrico (Fase III) del TROFIN en Pediatría. Avances de Biotecnología médica. Aplicaciones médicas de la Biotecnología. 1997;4:T35.
- Aznar E, González R, Morono M, González M. Tratamiento anti-anémico hierro-proteína (Trofin) para uso pediátrico. Rev Mex Ciencias Farm 1998;29:18-21.
- Aznar E. Prevención de la deficiencia de hierro en embarazadas suplementadas con productos de origen natural, NEOTROFIN (tabletas) y TROFINVITAL (Líquido oral). Rev Cub Farmacia 2001;35(Supl):269-73.
- Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. Blood Cells Mol Dis 2002;29:336-55.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Cahill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N; *et al.* Identification of an intestinal heme transporter. Cell 2005 ;122:789-801.
- Conrad ME, Schade SG. Ascorbic acid chelates in iron absorption. A role for hydrochloride acid and bile. Gastroenterology 1968;55:35-45.
- Pizarro F, Olivares M, Hertrampf E, Mazariegos DI, Arredondo M, Letelier A, Gidi V. Iron bis-glycine chelate competes for the nonheme-iron absorption pathway. Am J Clin Nutr 2002;76:577-81.



16. Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Jensen M, Sørensen SS, Kristensen L; *et al.* Non-heme iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am J Clin Nutr* 2003;77:173-9.
17. Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem* 1935; 112:51.
18. Barry M, Sherlock S. Measurement of liver-iron concentration in needle biopsy specimens. *Lancet* 1971;i: 100-3.
19. Rhoades RA, Tanner GA. Digestión y absorción. En: *Fisiología médica*. Editorial Masson-Little Brown. Barcelona: 1997. pp 655-6.
20. Hambraeus L. Animal and plant-food-based diets and iron status: benefits and costs. *Proc Nutr Soc* 1999;58:235-42.
21. Aznar E, Pérez A, González R, Pintueles Y. Sistema de Farmacovigilancia y su aplicación en el seguimiento del producto hierro-proteína Trofín®. *Rev Mex Ciencias Farm* 2003;34:154-63.
22. García Y, González R, Bourg V, González Y, González B, Mancebo A; *et al.* Toxicological evaluation of a new antianemic formulation from natural product dry Trofín. *Pharmacologyonline* 2006;3:520-6. Resúmenes del FAPRONATURA' 2006. Simposio Internacional sobre Farmacología de los Productos Naturales. Varadero (Matanzas, Cuba): Noviembre 20-24, 2006. Disponible en: [http://www.unisa.it/Centri\\_e\\_Vari/p\\_harmacologyonline/archivies.php](http://www.unisa.it/Centri_e_Vari/p_harmacologyonline/archivies.php). Fecha de última visita: 5 de Enero del 2009.