



**Universidad Nacional de La Plata**

**Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

**Departamento de Postgrado**

**Trabajo de Tesis Doctoral**

**DAÑO GENÓMICO ASOCIADO A LA ADMINISTRACIÓN DE DOS  
FORMAS DE TRATAMIENTO PREVENTIVO DE LA ANEMIA  
FERROPÉNICA: UNA APROXIMACIÓN *IN VITRO***

**Tesista**

***LIC. ROCÍO CELESTE GAMBARO***

**Directoras**

***Dra. Analía Seoane***

***Dra. Gisel Padula***

**2020**

**“Es mejor construir niños sanos que reparar adultos rotos”.**

**Frederick Douglass**



El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP), fue realizado en el Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (IGEVET), de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP-CONICET), con el financiamiento de la Universidad Nacional de La Plata y el CONICET bajo la dirección de las Dras. Analía Seoane y Gisel Padula.



*La culminación de la tesis se vio afectada por la pandemia a causa del COVID-19 y el consecuente aislamiento social y obligatorio implementado por el gobierno nacional.*

## AGRADECIMIENTOS

**Quisiera agradecer profundamente:**

En primera medida a la **Universidad Nacional de La Plata** por hacer posible la realización de este Doctorado.

A la **Dra. Pilar Peral García**, al **Dr. Guillermo Giovambattista** y a la **Dra. Cecilia Furnus**, por haberme permitido crecer profesionalmente en el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), y a la toda la gente del instituto que aportó su granito para que esta tesis fuera posible.

A la **Dra. Gisel Padula** y la **Dra. Analía Seoane**, por acompañarme en este arduo camino y ayudarme a sortear los obstáculos. Por darme las herramientas, libertades e incondicional apoyo en cuestiones laborales y personales que fuimos atravesando juntas a lo largo de todos estos años compartidos.

A mis **compañeros de laboratorio, Meli, César, Julio y Carlos**, con quienes he compartido innumerables momentos y me ayudaron día a día. Quienes desde un mate, un café o resolviendo una duda también son responsables de que ésto sea posible.

A la gente del **Instituto de Desarrollo e Investigaciones Pediátricas "Prof. Dr. Fernando E. Viteri"** por su colaboración con el desarrollo de esta tesis.

A **Virginia Cassain** por su ayuda para adentrarnos juntas en el mundo del estrés oxidativo.

A **Moni** mi **tía/madrina** y su equipo de trabajo sumamente dispuestos a colaborar en el cierre de la tesis en este contexto tan particular.

A los **amigos/as** que fui construyendo a lo largo de la vida, quienes desde un mensaje, un llamado o una visita me alientan siempre en los momentos lindos y no tan lindos.

A **Sabri**, quien me acompaña no sólo personalmente (hermana y amiga) sino también académicamente siempre dispuesta a ayudarme y explicarme desinteresadamente.

A mi familia, **Viejo, Nana, Sabri, Gabi, Ame y Vic** quienes me acompañan incondicionalmente y comparten mi historia. Gracias por su confianza, apoyo y libertad.

A **Ger**, por su inagotable paciencia y compañía en este arduo desafío que asumimos de crecer juntos. Por ayudarme a compatibilizar mi crecimiento profesional con la maternidad desde el primer momento. Sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

A nuestros hijos, **Sofi y Feli** quienes sin duda son la luz de mi vida, gracias por siempre regalarme una sonrisa, por ser el motor de mis días y recordarme cuales son mis prioridades. Gracias por aguantar mis días de “Mamá Dragón” y entender que al final su mamá, la mamá de siempre, siempre vuelve...

# ÍNDICE GENERAL

Índice de abreviaturas y acrónimos.....	11
Resumen.....	13
Abstract.....	16
<b>Capítulo I. Introducción</b>	
1. Malnutrición y crecimiento infantil .....	19
2. Deficiencia de micronutrientes.....	22
3. Anemia por deficiencia de hierro – Suplementación preventiva.....	27
4. Hierro y estrés oxidativo .....	29
4.1. Peroxidación lipídica.....	33
4.2. Antioxidantes.....	35
4.2.1. Antioxidantes enzimáticos .....	37
4.2.2. Antioxidantes no enzimáticos .....	37
5. Daño genético.....	38
<b>Capítulo II. Antecedentes</b>	
6. Suplementación con hierro: diario vs semanal.....	41
7. Hierro, estrés oxidativo y daño en biomoléculas.....	44
8. Hierro y vitamina E.....	48
9. Significado de la investigación.....	50
<b>Capítulo III. Objetivos</b>	
10. Objetivos generales.....	52
11. Objetivos específicos.....	52
<b>Capítulo IV. Hipótesis.....</b>	<b>54</b>

## Capítulo V. Métodos y Técnicas

12. Breve historia del cultivo celular.....	55
13. Puesta a punto del diseño experimental.....	56
14. Cultivos de sangre entera.....	59
15. Diseño experimental.....	60
15.1. Hierro.....	60
15.2. Hierro y vitamina E.....	61
16. Técnicas desarrolladas.....	61
16.1. Cinética de proliferación celular.....	61
16.1.1. Índice mitótico.....	61
16.2. Viabilidad.....	62
16.2.1. MTT.....	62
16.2.2. Rojo neutro (RN).....	63
16.2.3. Hemotoxicidad.....	64
16.3. Mediciones de hierro.....	65
16.3.1. Espectroscopia de absorción atómica por llama.....	65
16.3.2. Contenido de hierro total en células.....	65
16.3.3. Contenido de hierro en medio de cultivo.....	66
16.4. Estrés Oxidativo.....	66
16.4.1. T-BARS.....	66
16.4.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	67
16.4.3. Lactato deshidrogenasa (LDH).....	68
16.4.4. Enzimas Antioxidantes.....	69
16.4.4.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	69
16.4.4.2. Catalasa.....	71
16.5. Daño Genético.....	72
16.5.1. Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).....	72
16.5.2. Electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa).....	75

16.6. Resumen técnicas.....	79
17. Análisis estadístico.....	80

## Capítulo VI. Resultados y Análisis: Hierro

18. Resultados de la puesta a punto diseño experimental.....	81
18.1. Índice mitótico (IM) e índice de división nuclear (IDN).....	81
19. Resultados hierro.....	82
19.1. Cinética de proliferación celular.....	82
19.1.1. Índice mitótico (IM).....	82
19.2. Viabilidad celular.....	83
19.2.1. MTT.....	83
19.2.2. Rojo neutro (RN).....	84
19.2.3. Índice de división nuclear (IDN).....	86
19.2.4. Resumen de las técnicas de viabilidad celular.....	87
19.3. Mediciones de hierro.....	88
19.4. Estrés oxidativo.....	89
19.4.1. T-BARS.....	89
19.4.2. Enzimas antioxidantes.....	90
19.4.2.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	91
19.4.2.2. Catalasa.....	92
19.5. Daño Genético.....	93
19.5.1. Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).....	93
19.5.2. Electroforesis en gel de células aisladas (Ensayo cometa).....	97
19.5.3. Resumen de las técnicas de estrés oxidativo y daño genético.....	98
20. Discusión hierro.....	100
21. Consideraciones parciales.....	105

## Capítulo VII. Resultados y Análisis: Hierro y vitamina E

22. Resultados hierro y vitamina E.....	106
22.1. Viabilidad celular.....	106
22.1.1. MTT.....	106
22.1.2. Rojo neutro (RN).....	108
22.1.3. Índice de división nuclear (IDN).....	109
22.1.4. Hemotoxicidad.....	111
22.1.5. Resumen de las técnicas de viabilidad celular.....	112
22.2. Mediciones de hierro.....	113
22.3. Estrés oxidativo.....	116
22.3.1. T-BARS.....	116
22.3.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	118
22.3.3. Lactato deshidrogenasa (LDH).....	119
22.3.4. Enzimas antioxidantes.....	121
22.3.4.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	121
22.3.4.2. Catalasa.....	122
22.4. Daño genético.....	124
22.4.1. Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).....	124
22.4.2. Electroforesis en gel de células aisladas (Ensayo cometa).....	127
22.5. Cuadro comparativo resumen técnicas de estrés oxidativo y Daño genético.....	129
23. Discusión hierro y vitamina E.....	130
24. Consideraciones parciales.....	136

## Capítulo VIII. Propuesta Adicional: Nanopartículas de vitamina E

25. Introducción.....	137
26. Materiales y métodos.....	138
26.1. Materiales.....	138
26.2. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL).....	139

26.3. Detección analítica de vitamina E por espectroscopía UV-Vis.....	139
26.4. Medición de la eficiencia de carga.....	140
26.5. Tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersión.....	141
26.6. Estabilidad física.....	141
26.7. Observación de NSL por microscopía electrónica de transmisión...	142
26.8. Hemotoxicidad.....	142
26.9. Viabilidad celular.....	143
27. Resultados.....	144
28. Discusión.....	154
29. Consideraciones parciales.....	155
<b>Capítulo IX. Consideraciones finales</b>	
30. Conclusiones.....	156
31. Perspectivas futuras.....	158
<b>Bibliografía.....</b>	<b>159</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>186</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>192</b>

## Índice de abreviaturas y acrónimos

---

*AAS: espectroscopia de absorción atómica*

*ABPF: agarosa de bajo punto de fusión*

*ACK: buffer de lisis de glóbulos rojos*

*ACUMAR: autoridad de Cuenca la Matanza Riachuelo*

*ADH: anemia por deficiencia de hierro*

*AO: enzimas antioxidantes*

*APFN: agarosa de punto de fusión normal*

*BN: células binucleadas*

*C 16,6: control 16,6 vitamina E*

*C 8,3: control 8,3 vitamina E*

*Cat: catalasa*

*CBMN: micronúcleos por bloqueo de la citocinesis*

*CN: control negativo*

*CP: control positivo*

*DCFH-DA: diclorofluoresceína diacetato*

*EC: ensayo cometa*

*ENNyS: encuesta nacional de nutrición y salud*

*GSH: glutatión*

*HD: hierro diario*

*HD 16,6: hierro diario + 16,6 vitamina E  $\mu\text{g/ml}$*

*HD 8,3: hierro diario + 8,3 vitamina E  $\mu\text{g/ml}$*

*HD NSL-E 16,6: hierro diario + nanopartícula vitamina E 16,6  $\mu\text{g/ml}$*

*HD NSL-E 8,3: hierro diario + nanopartícula vitamina E 8,3  $\mu\text{g/ml}$*

*Hem: hemólisis*

*HS: hierro semanal*

*HS 16,6: hierro semanal + 16,6 vitamina E  $\mu\text{g/ml}$*

*HS 8,3: hierro semanal + 8,3 vitamina E  $\mu\text{g/ml}$*

*HS NSL-E 16,6: hierro semanal + nanopartícula vitamina E 16,6  $\mu\text{g/ml}$*

*HS NSL-E 8,3: Hierro semanal + nanopartícula vitamina E 8,3  $\mu\text{g/ml}$*

*ID: índice de daño genético*

*IDN: índice de división nuclear*  
*IM: índice mitótico*  
*L•: radical lipídico*  
*LDH: lactato deshidrogenasa*  
*LH: ácido graso insaturado*  
*LOO•: radical peróxido lipídico*  
*LOOH: hidroperóxido lipídico*  
*LPO: peroxidación lipídica*  
*MDA: malonaldeído*  
*MNi: micronúcleos*  
*MTT: ensayo MTT*  
*NAC: N-acetil cisteína*  
*NBUDs: brote nuclear*  
*NPBs: puentes nucleoplásmicos*  
*NSL: nanopartículas sólidas lipídicas*  
*NSL 16,6: control de nanopartículas 16,6 µg/ml*  
*NSL 33,2: control de nanopartículas: 33,2 µg/ml*  
*NSL-E: nanopartículas sólidas lipídicas con vitamina E*  
*NSL-E 8,3: control de nanopartículas vitamina E<sub>1</sub> 8,3 µg/ml*  
*NSL-E 16,6: control de nanopartículas vitamina E<sub>2</sub> 16,6 µg/ml*  
*RN: rojo neutro*  
*ROS: especies reactivas del oxígeno*  
*SNC: sistema nervioso central*  
*SOD: superóxido dismutasa*  
*TBA: ácido tiobarbitúrico*  
*T-BARS: técnica de evaluación del MDA a partir del TBA*  
*TCA: ácido tricloroacético*  
*TLN: transportadores lipídicos nanoestructurados*  
*Vit E: vitamina E*  
*XOD: Xantina oxidasa*

## Resumen

---

En la actualidad, las enfermedades no transmisibles representan una de las mayores amenazas para la salud humana en todo el mundo. Con respecto a la causa de dichas enfermedades, la alimentación inadecuada es uno de los principales factores de riesgo. En este contexto la desnutrición oculta ha sido definida por Organización Mundial de la Salud (OMS) y Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) como un conjunto de carencias específicas de micronutrientes que se caracterizan por ser altamente prevalentes y que requieren de cierta instrumentación para su diagnóstico. Surge como consecuencia de una alimentación inadecuada, no diversificada y marginal con relación a algún nutriente.

Dentro de las deficiencias de micronutrientes más importantes en la niñez, se destaca la de hierro, la cual representa la primera causa de anemia (ADH) a nivel mundial y afecta tanto a los países desarrollados como a aquellos en desarrollo. En el caso de Argentina, numerosos estudios demuestran que tanto la deficiencia de hierro como la prevalencia de anemia son muy elevadas. En los niños de 0 a 5 años, las causas de ADH son multifactoriales, esta enfermedad depende del balance y la interacción con otros nutrientes que componen la dieta, la biodisponibilidad, las pérdidas y los requerimientos por crecimiento. Se asocia con una disminución del rendimiento cognitivo y un retraso en el desarrollo motor alterando los aspectos físicos, mentales y sociales de la salud del niño.

La ADH puede prevenirse mediante el consumo de una dieta adecuada, la fortificación de los alimentos y la suplementación farmacológica cuando la prevalencia de la misma es mayor a 40%. En consecuencia, la recomendación de la Sociedad Argentina de Pediatría, es la suplementación preventiva diaria con sulfato ferroso a partir de los 2 meses de vida para los nacidos a término alimentados con leche de vaca no fortificada y aquellos con lactancia materna que reciben alimentación complementaria no adecuada. A pesar de esta recomendación, en el ámbito local, la prevalencia continúa siendo muy alta en los niños menores de 2 años. Probablemente, esto se deba al incumplimiento de la suplementación a causa de los efectos adversos asociados al hierro, tales como dolor de

estómago, vómitos, estreñimiento, entre otros. Como alternativa, la suplementación semanal ha demostrado ser eficaz en la prevención de la ADH en otros grupos etarios, aunque la evidencia en lactantes es escasa.

Frente a un exceso de hierro activo sin blindaje dentro de las células y tejidos, puede ocurrir un cuadro de sobrecarga tisular de dicho mineral. Un alto porcentaje de especies reactivas de oxígeno (ROS), puede interrumpir la homeostasis de óxido-reducción y desencadenar estrés oxidativo. Esto puede derivar en un daño permanente a componentes celulares, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Muchos autores consideran dicho daño como uno de los principales mecanismos subyacentes de ciertas enfermedades crónicas, daños por intoxicación y lesiones tisulares. Las células han desarrollado diversos mecanismos para evitar el daño por un exceso de hierro. Esto ocurre por medio de la regulación del transporte de dicho mineral a través de las membranas, la producción de enzimas antioxidantes (AO) y el aprovechamiento de los antioxidantes no enzimáticos introducidos por la ingesta.

En este sentido, la vitamina E es el antioxidante dietético no enzimático liposoluble más importante y esencial en la defensa celular. Tiene una destacada afinidad por los electrones no apareados, por eso resulta fundamental para intervenir en la peroxidación lipídica de las membranas celulares.

En base a lo anteriormente planteado, el objetivo de la presente tesis doctoral es comparar los efectos sobre el genoma de la administración diaria vs. la administración semanal de la suplementación preventiva de la anemia ferropénica en cultivos de sangre periférica *in vitro*. A su vez, se evalúan las consecuencias de la suplementación de ambas formas de administración del sulfato ferroso (semanal y diario) conjuntamente con la vitamina E (antioxidante no enzimático liposoluble). Para poder cumplimentar dichos objetivos, se analizan diversos marcadores de viabilidad celular (MTT y RN), de estrés oxidativo (T-BARS, SOD, catalasa, ROS, LDH) y de daño genotóxico (CBMN y ensayo cometa). Complementariamente, se ha desarrollado un novedoso sistema de liberación controlada de nanopartículas sólidas lipídicas con vitamina E.

La administración *in vitro* de suplementos de sulfato de hierro en dosis diarias, se puede observar cierta sobrecarga de este mineral, la cual conllevaría a un leve aumento del estrés oxidativo, desencadenando de este modo un incremento en el daño genómico. Si bien se evidencia un aumento en la respuesta antioxidante, se acompaña por un leve incremento de los valores de peroxidación lipídica y del daño genético. Esto implicaría un desequilibrio del sistema de óxido-reducción, en favor del estrés oxidativo en comparación con la suplementación semanal.

Por su parte, en la suplementación semanal, los mecanismos de absorción, regulación, transporte y almacenaje del hierro estarían optimizados. Así el hierro se encontraría neutralizado (no reactivo), y no provocaría una respuesta antioxidante enzimática elevada ni tampoco un aumento en la peroxidación lipídica. Esto puede asociarse con el menor daño genético observado a través de las técnicas de genotoxicidad analizadas.

En cuanto a la vitamina E, por sus características antioxidantes, ayudaría a complementar la respuesta de los antioxidante enzimáticos y a disminuir el estrés oxidativo y el consecuente daño genómico ocasionado por el sulfato ferroso. Al aumentar al doble la dosis de ingesta diaria recomendada para lactantes, dicho efecto protector parece ser mayor, sobre todo al ser combinado con la suplementación semanal.

En función de los análisis de estrés oxidativo y de daño genético realizados *in vitro* en sangre periférica, la administración semanal para la prevención de la anemia ferropénica se posiciona como una mejor alternativa que la administración diaria. Asimismo, la suplementación conjunta del sulfato ferroso en dosis semanales con vitamina E, se presenta como una estrategia plausible para disminuir algunos de los efectos adversos que este tratamiento ocasiona. Esta propuesta, puede contribuir a lograr un mayor y mejor cumplimiento de la suplementación preventiva y disminuir de este modo la prevalencia de anemia en niños menores de 24 meses.

Una inadecuada nutrición en la infancia tiene importantes repercusiones sobre el crecimiento y desarrollo de los niños, y sobre la vida adulta. De este modo, la atención que se les brinde y las acciones que se emprendan en la primera infancia, permitirán lograr la plena capacidad de las personas para integrarse y desarrollarse en sociedad.

## Abstract

---

Poor nutrition is among the leading causes for non-communicable diseases, which represent one of the biggest human health threats in the world. “Hidden malnutrition” has been defined by the World Health Organization (WHO) and the United Nations Children's Fund (UNICEF) as a group of specific and highly prevalent micronutrient deficiencies which require the implementation of certain detection methods for their diagnosis. It is the consequence of a poor, non-diversified and marginal diet in relation to some nutrient.

During childhood, iron deficiency is one of the most prevalent micronutrient deficiencies, representing the first cause of anemia worldwide and affecting both, developed and developing countries. In Argentina, numerous studies have shown very high prevalence rates of anemia and iron deficiency. In children aged 0 to 5 years, the causes of iron-deficiency anemia (IDA) development are multifactorial; they depend on iron balance and interaction with other nutrient components, iron bioavailability and loss, and growth requirements. This disease is associated with a decrease in cognitive performance and a delay in motor development, affecting physical, mental and social aspects of the child's health.

Iron-deficiency anemia can be prevented with an adequate diet consumption, food fortification and pharmacological supplementation, when its prevalence is greater than 40%. In this sense, the Argentine Society of Pediatrics recommends from 2 months of age daily ferrous sulfate supplementation for term infants fed with non-fortified cow milk and breastfed infants receiving inadequate complementary feeding. Despite this recommendation, IDA prevalence in children under 2 years of age in our country remains very high. This is probably due to lack of treatment compliance as a result of iron adverse effects, namely, stomach pain, vomiting and constipation. Weekly ferrous sulfate supplementation has been tested to be an effective alternative for IDA prevention, although the evidence in infants is scarce.

Excess active iron accumulation in cells and tissues can cause iron overload and a high percentage of reactive oxygen species, which disrupt redox homeostasis and trigger

oxidative stress. This can lead to the permanent damage of cell components such as proteins, lipids and nucleic acids and is accepted as one of the main underlying mechanisms of certain chronic diseases. Cells have developed various mechanisms to avoid excess iron damage, such as the regulation of iron transport through cell membranes, the production of antioxidant enzymes and the use of non-enzymatic antioxidants from the diet.

Vitamin E is the main dietary fat-soluble non-enzymatic antioxidant, which is essential for cell defense to prevent lipid peroxidation of cell membranes.

The objective of this doctoral thesis was to compare the effects on the genome in daily vs. weekly supplementation with ferrous sulfate for the prevention of IDA in *in vitro* cultures of peripheral blood lymphocytes. At the same time, the joint effect of both weekly and daily administration of ferrous sulfate and vitamin E was evaluated. For this purpose, markers of cell viability with MTT and Neutral red assays, oxidative stress using thiobarbituric acid reactive substances (T-BARS), superoxide dismutase (SOD) and catalase, and genotoxic damage through the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN) and Comet assays were analyzed. Additionally, a novel controlled release system for solid lipid nanoparticles with vitamin E was developed.

Our results showed that daily doses of ferrous sulfate caused an iron overload that would lead to a slight increase in oxidative stress, triggering an increase in genomic damage. The increase in the antioxidant response was accompanied by an increase in lipid peroxidation values and genetic damage, suggesting an imbalance of the redox system, in favor of oxidative stress.

In the case of weekly ferrous sulfate supplementation, the absorption, regulation, transport and storage mechanisms of iron seem to be optimized. Thus, iron would be neutralized (not reactive), without leading to a high enzymatic antioxidant response or an increase in lipid peroxidation. In turn, this may be associated with the lower genetic damage observed in the genotoxicity results.

In the case of vitamin E, its antioxidant characteristics would complement the response of enzymatic antioxidants and help to reduce oxidative stress and the

consequent genomic damage caused by ferrous sulfate. By doubling the daily dose recommended for infants, this protective effect seems to be stronger.

Based on the oxidative stress and genetic damage analyses performed *in vitro* in peripheral blood lymphocytes, weekly ferrous sulfate supplementation would be a better option than daily supplementation as a preventive treatment for IDA. The combined administration of ferrous sulfate with vitamin E could be a useful strategy to reduce some of the adverse effects of this treatment. It would therefore be possible to improve treatment compliance and thereby reduce the prevalence of IDA in children under 24 months of age.

Inadequate nutrition during childhood has major repercussions on children's growth and development and on adult life. In this way, the care provided and the actions undertaken in early childhood will allow the full capacity of people to integrate and develop in society.

# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

## 1. Malnutrición y crecimiento infantil

En la actualidad, las enfermedades no transmisibles representan una de las mayores amenazas para la salud humana en todo el mundo, especialmente en aquellos países en vías de desarrollo, por sus consecuencias sanitarias, económicas y sociales. La alimentación inadecuada es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de las mismas, ya que puede conllevar a la malnutrición (ENNYS, 2019). Surge como consecuencia de carencias, excesos o desequilibrios en la ingesta energética y/o de nutrientes de las personas (OMS, 2016).

Una nutrición adecuada constituye la base para el bienestar y el desarrollo físico e intelectual de las poblaciones humanas. Se trata de un proceso complejo, en el cual intervienen no sólo factores económicos sino también culturales, los cuales inciden tanto en los hábitos alimentarios como en los factores sanitarios, entre otros. El acceso a una alimentación “aceptable, suficiente y adecuada”, que depende de los ingresos y del costo de los alimentos, resulta restringido para amplios sectores de la población. En el caso de Argentina, no se encuentra garantizada la equidad alimentaria, es decir, “que todas las personas en especial los más pobres, tengan acceso a una alimentación culturalmente aceptada, nutricionalmente adecuada, variada y suficiente para desarrollar su vida” (Aguirre, 2005). Dicha inequidad compromete la salud de amplios sectores, especialmente aquellos de recursos más bajos (Bergel Sanchís y col., 2017). Para quebrar los ciclos de pobreza, violencia, enfermedad y discriminación, es preciso intervenir en etapas tempranas de la vida, ya que de no hacerlo se perpetúan de generación en generación. La inseguridad alimentaria, que en sí misma representa una necesidad insatisfecha, dificulta y compromete el sostenimiento de la vida y el ejercicio de otros derechos que hacen al desarrollo humano (Tuñón, 2016).

En el caso particular de los niños, casi 6 millones mueren todos los años de malnutrición y/o enfermedades conexas. El 90% de esas muertes se deben a la falta de

acceso a una alimentación adecuada en forma crónica y a largo plazo y sólo el 10% restante son debidas a catástrofes naturales, condiciones climáticas excepcionales o hambruna como resultado de conflictos armados (Leal y col., 2017).

Las necesidades nutricionales de los niños en los primeros años son más elevadas que las del resto de la vida, por lo tanto, las consecuencias de las carencias alimentarias en el crecimiento y desarrollo también son mayores. El hombre adulto requiere de una cantidad de energía y de nutrientes que son necesarios para reemplazar las pérdidas cotidianas y para reponer la energía imprescindible para su metabolismo basal. Por su parte, los niños necesitan, una cantidad adicional para satisfacer las demandas del crecimiento (Padula, 2008). Como consecuencia de la elevada velocidad del mismo en los primeros años de vida, la selección de alimentos con escaso valor o calidad nutricional puede afectar la ingesta de nutrientes críticos y constituir uno de los factores involucrados en el retraso del crecimiento (Inverso, 2019).

La nutrición en los primeros 1000 días de la vida humana es la clave esencial para mantener un correcto crecimiento y desarrollo. Es el periodo de mayor crecimiento en la vida. El peso al nacer se triplica al año, y la talla aumenta en un 50%. Se triplica el tamaño del cerebro y se incrementa, además, la madurez del sistema inmune. Para que esto se produzca, es fundamental una adecuada nutrición durante el embarazo y la primera infancia. Estas etapas de mayor velocidad de crecimiento tienen mayores requerimientos, y generan períodos que necesitan una atención especial. Los daños producidos durante su transcurso tendrán consecuencias irreversibles para el individuo en desarrollo (Inverso, 2019).

Entre el nacimiento y los 6 meses de vida, los niños reciben la mayor parte de los beneficios de la leche materna, por lo que el crecimiento es generalmente satisfactorio y alcanza los niveles esperados. Durante el destete, entre los 6 y los 12 meses de edad, se identifica una disminución de la velocidad de crecimiento. Esto se puede explicar por factores relacionados a la nutrición del niño, como puede ser el suministro de una cantidad insuficiente de alimentos, o por otros factores como por ejemplo las enfermedades de la infancia: sarampión, infecciones respiratorias y gastroenteritis.

Durante los primeros años de vida la selección de los alimentos que consume el niño la realizan sus padres o cuidadores. Estas decisiones están condicionadas no sólo por factores económicos y de disponibilidad regional o estacional, sino por hábitos y creencias que se transmiten de generación en generación. La “nutrición” es un asunto fisiológico y de la salud, mientras que el “comer” es un fenómeno social y cultural. Es obvio, sin embargo, que existen asociaciones importantes entre ambos (Padula, 2008).

A partir de los 12 meses y hasta la edad de 4 a 5 años, se presenta una recuperación espontánea del crecimiento. En los niveles socioeconómicos más bajos los niños no pueden alcanzar grados de recuperación satisfactorios, principalmente debido a que no reciben los alimentos en suficiente cantidad y/o calidad, y por los contaminantes que los predisponen a infecciones repetidas. Los niños cuya recuperación después de la fase de declinación de la velocidad de crecimiento (entre los 6 y 12 meses) no es satisfactoria, probablemente permanezcan con un retardo permanente del crecimiento. Desde el punto de vista nutricional, los 2 primeros años de vida constituyen la etapa más vulnerable. El efecto a largo plazo no sólo depende del momento, sino también de la duración e intensidad de la agresión, por lo que en condiciones críticas la recuperación nutricional es sólo capaz de mejorar parcialmente. Este estado nutricional deficitario se traduce en la disminución de diferentes capacidades del individuo tales como: alteraciones en la curva normal de crecimiento; descenso en la actividad física y mental; modificaciones en la conducta y en la capacidad de defensa inmunológica y celular (Padula, 2008).

Los niños que han sufrido malnutrición temprana presentan alteraciones en la capacidad de atención, motivación, excitación y actividad física, que a su vez limitan las oportunidades de aprendizaje. Pareciera que es mediante mecanismos funcionales, y no mediante alteraciones estructurales del sistema nervioso central, que la malnutrición contribuye al retraso intelectual en niños expuestos a la privación ambiental múltiple que conlleva la pobreza (OMS, 2016).

Asimismo, en niños con malnutrición severa se ven reducidos los niveles de antioxidantes, tales como la vitamina E y el glutatión. Aunque este hecho puede deberse, en cierta medida, a una ingesta inadecuada de los mismos; también podría estar

relacionado con una síntesis reducida, la cual podría incrementar el desarrollo de estrés oxidativo (Leal y col., 2017).

Desde un enfoque biológico-cultural, los procesos de nutrición-alimentación y de salud-enfermedad, se enmarcan en la perspectiva antropológica que apunta a un conocimiento más profundo, interpretando los cambios somáticos como resultado de la interacción de codeterminantes bio-socio-culturales. Se reconoce así a la alimentación como un indicador elocuente del crecimiento y el estado nutricional infantil, referentes empíricos de las condiciones de vida de las familias (Bergel Sanchís y col., 2017). La malnutrición primaria, se relaciona directamente con factores socioeconómicos adversos que desencadenan el deterioro de la familia y el niño. Resulta de una compleja interacción de múltiples factores, principalmente, el cuidado y la crianza que reciben los niños, de los que la alimentación y la higiene forman parte, y son fundamentales para su salud y crecimiento. La pobreza no es un determinante absoluto de la malnutrición, pero sí un factor que no puede ser ignorado. Hay familias generadoras de salud y buena nutrición aún en los ambientes más adversos y otras que en los ambientes más favorables generan desnutrición y enfermedad (Padula, 2008).

Cabe remarcar que una inadecuada nutrición en la infancia tiene no sólo importantes repercusiones sobre el crecimiento y desarrollo de los niños, sino también sobre la vida adulta. De este modo, la atención que se les brinde y las acciones que se emprendan en la primera infancia, permitirán la plena capacidad de las personas para integrarse y desarrollarse en sociedad (Padula, 2008).

## **2. Deficiencia de micronutrientes**

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), hay más de 1.000 millones de personas desnutridas y más de 2.000 millones de personas que padecen desnutrición oculta, es decir, que carecen de vitaminas y minerales esenciales en sus alimentos (Leal y col., 2017).

La desnutrición oculta ha sido definida por OMS y UNICEF como un conjunto de carencias específicas de micronutrientes que se caracterizan por ser altamente

prevalentes y que requieren de cierta instrumentación para su diagnóstico. Surge como consecuencia de una alimentación inadecuada, no diversificada, marginal con relación a algún nutriente, lo cual determina que las reservas corporales resulten insuficientes para afrontar los esfuerzos del crecimiento, del embarazo, de la lactancia o de una infección (Varea y col., 2006). El yodo, la vitamina A y el hierro son los micronutrientes más importantes en lo que se refiere a la salud pública a nivel mundial; sus carencias suponen una importante amenaza para la salud y el desarrollo de las poblaciones en todo el mundo (ENNyS, 2019).

En el caso de los niños, las principales deficiencias de micronutrientes que se observan en Argentina son las de zinc, folato, hierro, vitamina A, vitamina B12, vitamina C y vitamina D.

En lo que respecta al zinc, la deficiencia severa no es común en la infancia, pero la moderada es relativamente frecuente. Para la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS, 2007) la proporción de niños con ingesta de zinc por debajo del valor alimentario recomendado fue 11,6%. En la encuesta realizada por la Autoridad de Cuenca la Matanza Riachuelo (ACUMAR, 2012) para la provincia de Buenos Aires, se observó que el 34,8% de los niños y el 29,4% de las niñas menores de un año no cubren con el requerimiento de zinc recomendado (Leal y col., 2017). Esta deficiencia afecta principalmente al sistema inmunológico, perturbando la división y multiplicación celular, y suprimiendo parcialmente la función del timo, disminuyendo la proliferación y función de los linfocitos T y B. A su vez, afecta principalmente al crecimiento infantil en altura y puede ocasionar alteraciones en el desarrollo del cerebro causando deterioros cognitivos (Padula y col., 2017).

La proporción de niños con una ingesta de folato menor a la recomendada según ENNyS (2007) fue 13,5% (Leal y col., 2017). El folato, que es la forma natural del ácido fólico, se considera un nutriente esencial y su deficiencia se asocia frecuentemente con la ocurrencia de anemia y de neuropatías (McLean y col., 2008). Sin embargo, también resulta fundamental para la replicación del ADN y está involucrado como sustrato para una serie de reacciones enzimáticas, en la síntesis de aminoácidos y el metabolismo de las

vitaminas. La mayor parte de la bibliografía publicada, se focaliza en adultos y ancianos, en mujeres embarazadas o en período de lactancia, mientras que hay pocos estudios disponibles sobre la deficiencia de folato y su repercusión en la salud de los niños (Lohner y col., 2012).

En el caso del hierro, según los datos que arrojó la ENNyS (2007), el porcentaje de niños con ingesta de hierro menor al requerido fue de 19,8%. A su vez, en el estudio realizado por ACUMAR (2012), en la provincia de Buenos Aires, se observó que en los niños de 1 a 4 años el 7,5% de los niños y el 11,9% de las niñas relevados, no llegaban a cubrir el requerimiento de hierro en la ingesta del día anterior (Leal y col., 2017). El hierro, es esencial para una variedad de funciones biológicas, desde el transporte de oxígeno y la oxidación mitocondrial hasta la síntesis de dopamina, también es necesario para el desarrollo de conexiones neuronales y la función de los neurotransmisores (Gambaro y col., 2018a). La deficiencia de hierro es la principal causa de anemia. La cual es una condición patológica caracterizada por una insuficiencia de hierro para llevar a cabo la síntesis de proteínas y enzimas que contienen dicho mineral, tales como la hemoglobina, la mioglobina y las catalasas. A su vez, en los niños puede afectar el normal crecimiento y desarrollo (Gambaro y col., 2018a). La prevalencia estimada de anemia en niños argentinos de 6 a 72 meses de edad fue de 16,5% (Leal y col., 2017).

Sobre la deficiencia de vitamina A, la proporción de niños según la ENNyS (2007) con ingesta por debajo del valor recomendado fue de 23,8% y según la encuesta realizada por ACUMAR (2012) para la provincia de Buenos Aires, la proporción de niños que no cubren con el requerimiento en la ingesta del día anterior fue de 23,7% en los niños y del 30% en las niñas. En los mayores de 4 años, este valor asciende a 30,3% y 45,8%, respectivamente (Leal y col., 2017). Dentro de las principales consecuencias de la deficiencia de vitamina A se destacan la pérdida de peso, la queratinización de los tejidos epiteliales y de la córnea y la disminución tanto de la resistencia a las infecciones como de la adaptación a la luz de baja intensidad. Estas afecciones pueden ser reversibles pero si son sostenidas en el tiempo, producen lesiones en la córnea y la conjuntiva, que pueden conducir a la ceguera (Varea y col., 2006).

El porcentaje de niños menores de 5 años con deficiencia de vitamina B12, según la ENNyS (2007), fue de 4,7% para todo el país (Leal y col., 2017). La deficiencia de esta vitamina se manifiesta en la médula ósea afectando la eritropoyesis y en el sistema nervioso, comprometiendo la reparación de axones y la síntesis de mielina y neurotransmisores. Los síndromes asociados a deficiencia de vitamina B12 incluyen falla medular, anemia megaloblástica, mielopatía, neuropatía, alteraciones neuropsiquiátricas y atrofia óptica. En los niños con deficiencia congénita, el daño del sistema nervioso central (SNC) se caracteriza por la pérdida de sustancia blanca con mielinización retardada (Aguirre y col., 2019).

En el caso de la vitamina C, según la ENNyS (2007), el 57,1% de los niños de 6 a 23 meses presentaron ingestas por debajo de lo recomendado. Según ACUMAR (2012), para la provincia de Buenos Aires, la proporción de niños que no cubren con el requerimiento en la ingesta del día anterior fue de 21,35% en los niños y de 29,8% en las niñas. En los mayores de 4 años este valor asciende a 40,8% y 33,3%, respectivamente (Leal y col., 2017). La vitamina C juega un papel determinante para mantener el correcto funcionamiento de numerosos procesos biológicos. Funciona como una coenzima importante para la biosíntesis de colágeno, como una vitamina antioxidante plasmática e intracelular que previene la anemia al mejorar la absorción del hierro e interviene en el sistema retículo-endotelial para la eritropoyesis. A su vez los niños con deficiencia de vitamina C pueden experimentar retraso en el crecimiento, tendencia al sangrado y a desarrollar anemia (Hongsawong y col., 2020).

Por último, en el caso de la vitamina D, el promedio de deficiencia es de 43,3%, sin embargo estos datos no se encuentran discriminados por edad (Puche, 2015). Dentro de los efectos clásicamente reportados para esta deficiencia, se destaca la malabsorción intestinal de calcio, que podría derivar en hipocalcemia, raquitismo y osteoporosis. Además, se la ha asociado frecuentemente con la pérdida de tonicidad muscular, caídas y osteomalacia. Recientemente, su deficiencia también se ha vinculado con enfermedades tales como el cáncer, la hipertensión, las patologías cardiovasculares, la diabetes, las

enfermedades autoinmunes (Mansur, 2018), y hasta al agravamiento de los cuadros del COVID-19.

Desde hace varias décadas se reconoce que los niños de los estratos sociales más pobres sufren con más frecuencia desnutrición, deficiencias de micronutrientes y retrasos del desarrollo, y presentan más fracasos escolares que el resto de sus pares de mayor nivel socioeconómico y cultural. Esta situación, tiende a perpetuarse a través de las generaciones si no se revierten las condiciones de vida y se ponen en práctica estrategias diferenciales de atención de los niños que crecen en el seno de familias en riesgo (Leal y col., 2017).

Las soluciones posibles para la deficiencia de micronutrientes incluyen enfoques basados en los alimentos: la diversificación de la dieta, la fortificación de los alimentos comerciales y la biofortificación (en la que los cultivos alimentarios crecen con mayor contenido de micronutrientes) (Varea y col., 2006). Estas soluciones no son excluyentes, y es necesario analizar cuál es la mejor estrategia a seguir para cada micronutriente en particular.

Dado que estas deficiencias requieren de cierta instrumentación para su diagnóstico y que no es posible su detección a través de técnicas antropométricas, es importante el diseño de modelos experimentales que permitan investigar su efecto y aportar información que pueda favorecer el desarrollo de políticas de prevención adecuadas (Padula, 2008).

El Artículo 24 de la Convención de los Derechos del Niño (1989) reconoce el derecho del niño a disponer del más alto nivel posible de salud. Compromete a los Estados a adoptar las medidas necesarias para reducir la mortalidad infantil y combatir las enfermedades y la malnutrición en el marco de la atención primaria de la salud; mediante la aplicación de la tecnología disponible, el suministro de alimentos nutritivos adecuados, agua potable, y atención sanitaria pre y posnatal (Leal y col., 2017). En este contexto, es de suma importancia diseñar políticas públicas que garanticen la educación nutricional, avocada a la concientización del problema y a la generación de una vigilancia social que

traspase los marcos de los programas prediseñados y el clásico enfoque asistencialista que revela la desatención de la dimensión social del problema (Molina, 2009).

### **3. Anemia por deficiencia de hierro – Suplementación preventiva**

Como se mencionó anteriormente, dentro de las deficiencias de micronutrientes más importantes en la niñez, se destaca la de hierro, la cual representa la primera causa de anemia (ADH) a nivel mundial y afecta aproximadamente a un tercio de la población tanto de países desarrollados como de aquellos en desarrollo (Lopez y col., 2016). En el caso de Argentina, numerosos estudios demuestran que la prevalencia de anemia y de deficiencia de hierro son muy elevadas (González y col., 2006; Malpeli y col., 2006; González y col., 2007; Apezteguia y col., 2008; Svarch Guerchicoff, 2015; Falivene y Fatore, 2016; Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional y Comité Nacional de Nutrición., 2017; Sguassero y col., 2018).

En el caso de los niños de 0 a 5 años, las causas de ADH son multifactoriales y, frecuentemente, pueden coexistir varias de ellas (PHNIP, 2003). Depende del balance y la interacción con los otros nutrientes que componen la dieta, la biodisponibilidad, las pérdidas y los requerimientos por crecimiento (Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional y Comité Nacional de Nutrición., 2017). La ADH se asocia con una disminución del rendimiento cognitivo y un retraso en el desarrollo motor alterando los aspectos físicos, mentales y sociales de la salud del niño (Cappellini y col., 2019). Afecta tanto el desarrollo, a través de la disminución de la atención, dificultades del aprendizaje y disminución en el desempeño cognitivo; como el crecimiento, pudiendo ocasionar un retardo crónico o una disminución de la velocidad del mismo (Beard, 2001; Algarín y col., 2003; Rivera y col., 2003; González y col., 2007; Lozoff y col., 2007; Clark, 2008; Carter y col., 2010).

La ADH puede prevenirse mediante el consumo de una dieta adecuada, la fortificación de los alimentos y la suplementación. Si bien estas medidas no son excluyentes, en poblaciones vulnerables, donde la ingesta de una dieta adecuada no está asegurada, cobra relevancia la suplementación farmacológica. En este sentido, la OMS recomienda la

suplementación universal de lactantes y embarazadas, cuando la prevalencia en un grupo particular es mayor a 40% (WHO, 2001; Lynch y col., 2007). En consecuencia, la recomendación de la Sociedad Argentina de Pediatría (Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional y Comité Nacional de Nutrición 2017), es la suplementación preventiva diaria con sulfato ferroso a partir de los 2 meses de vida para los nacidos de término alimentados con leche de vaca no fortificada y aquellos con lactancia materna que reciben alimentación complementaria inadecuada con bajo contenido de hierro. A pesar de esta recomendación, según la ENNYS (2007), sólo un 17,9% de los encuestados reportó el consumo de suplementos de hierro dentro del grupo de 6 a 23 meses. En el subgrupo de los niños menores a 12 meses, independientemente del peso al nacer, la proporción de aquellos que recibieron suplementos de hierro, duplica a la proporción de los menores de dos años, con un valor de 35,7%. Si bien la diferencia es significativa, resulta llamativa la baja proporción de cumplimiento de la suplementación propuesta en la normativa mencionada. Probablemente esto se deba a los efectos adversos asociados al hierro, tales como dolor de estómago, náuseas, vómitos, sensación de mareo, estreñimiento y diarrea, entre otros. Por este motivo, la prevalencia de la ADH continúa siendo muy alta en los niños menores de 2 años (Linetzky y col., 2011).

Como alternativa, en niños y embarazadas la suplementación semanal ha demostrado ser eficaz en la prevención de la ADH (World Health Organization, 2001; Mozaffari Khosravi y col., 2010; De Regil y col., 2011; Peña-Rosas y col., 2015), aunque la evidencia en lactantes es escasa (Yurdakök y col., 2004; de Camargo Jr y col., 2008). La dosis diaria produciría una saturación de los mecanismos de transporte que se correlacionan con síntomas de intolerancia. La dosis semanal permitiría optimizar la absorción a través de los mecanismos de transporte y disminuir, así, dichos síntomas. La prevención semanal cuenta con otras ventajas, tales como mayor adherencia y cumplimiento, y menores efectos adversos (Gross y col., 1994; Cook y Reddy, 1995; Schultink y col., 1995; Viteri y col., 1999; Eickmann y col., 2008; Fernández Gaxiola y De Regil, 2019) (Tabla 1).

Hierro Diario	Hierro Semanal
Reservorio de Hierro saturados	Reservorio de Hierro optimizados
Saturación de los mecanismos de transporte → menor absorción	Instauración de los mecanismos de transporte → optimización de la absorción.
Mayores síntomas de intolerancia	Menores síntomas de intolerancia
Menor adherencia y cumplimiento al tratamiento	Mayor adherencia y cumplimiento al tratamiento

Tabla 1. Comparación entre suplementación diaria y semanal.

Una adecuada suplementación con hierro previene la anemia, pero existen varios obstáculos fisiológicos, económicos, sociales y logísticos para lograr su efectividad en la práctica.

Se debe considerar, además, que el mantenimiento de la función hematopoyética normal requiere también de niveles adecuados de muchos otros nutrientes que actúan de manera conjunta. De esta manera, las vitaminas A, B6 y B12, el ácido fólico, y la riboflavina, son necesarios para la normal producción de glóbulos rojos, mientras que las vitaminas C y E protegen a estas células de una destrucción prematura por oxidación de radicales libres (Fishman y col., 2000).

#### 4. Hierro y estrés oxidativo

El hierro es el elemento más abundante en la tierra (incluida la corteza y el núcleo interno), y el cuarto metal si consideramos sólo la corteza terrestre. Su configuración electrónica permite la formación de iones ferrosos ( $Fe^{+2}$ ) o férricos ( $Fe^{+3}$ ). El hierro forma fácilmente complejos con moléculas orgánicas, y esto tiene inmensas implicancias biológicas. El aumento de los niveles de oxígeno en la tierra condujo a una disminución de

la biodisponibilidad del hierro debido a que los iones ferrosos, que abundaban en los sistemas acuáticos, se oxidaron a complejos férricos insolubles y precipitaron. Esto fue ventajoso para las células vivas, ya que evitó las reacciones oxidativas catalizadas por hierro que podían ocurrir como consecuencia de la presencia de oxígeno. Sin embargo, algunos organismos tuvieron que desarrollar mecanismos para hacer frente a la toxicidad del oxígeno y, finalmente, utilizaron oxígeno para mantener su crecimiento y expansión (Galaris y col., 2019).

A nivel biológico, el hierro es un elemento crucial para varias funciones celulares y tisulares, incluidas la producción de la hemoglobina, la respiración, la función mitocondrial, la producción de energía (especialmente en músculos esqueléticos y cardíacos), así como la proliferación celular y la reparación del ADN (Cappellini y col., 2019). El cuerpo humano adulto contiene aproximadamente 3-5 g de hierro. La gran mayoría, aproximadamente el 70%, se utiliza en los glóbulos rojos y sus precursores, mientras que el exceso se almacena en el hígado.

El  $\text{Fe}^{+2}$  se oxida rápidamente a  $\text{Fe}^{+3}$  y es capturado inmediatamente por la transferrina para su transporte a los tejidos. La transferrina se une con alta afinidad hasta a dos iones  $\text{Fe}^{+3}$  y los mantiene en un estado inerte de óxido-reducción. En sujetos sanos, aproximadamente un tercio de la transferrina circulante está saturada de hierro, y el resto sirve como un moderador para evitar la acumulación de hierro activo y tóxico no unido a transferrina. Esta proteína suministra 25-30 mg/día de hierro del plasma a las células eritroides que se encuentran en desarrollo en la médula ósea para la biosíntesis hematológica. También facilita cantidades más bajas de hierro (hasta 5 mg/día) a otros tejidos, llegando a abastecerlos hasta 10 veces al día para satisfacer las necesidades fisiológicas. Esta fracción pequeña, pero altamente dinámica de hierro corporal, se renueva principalmente por el hierro proporcionado por los macrófagos de los tejidos después de la eliminación de los glóbulos rojos senescentes (Galaris y col., 2019).

Por otro lado, el exceso de hierro intracelular se almacena en la ferritina, una proteína citosólica. Las subunidades de ferritina se ensamblan en una estructura que permite el

almacenamiento de 4.500 iones de hierro. La oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  es crítica para el almacenamiento seguro de hierro (Galaris y col., 2019).

La capacidad del hierro para cambiar fácilmente su valencia y oscilar entre las formas  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ , asegura una posición privilegiada en la materia viva como mediadora de reacciones bioquímicas clave. Sin embargo, esta propiedad química también hace que el hierro sea el principal catalizador para la generación de radicales libres reactivos en organismos aeróbicos. Por esta razón, el hierro circulante está fuertemente unido al transportador de hierro, transferrina, que lo mantiene en un estado de óxido-reducción inerte. Por otra parte, la fracción principal de hierro celular está, o bien protegida en los sitios activos de las enzimas, o bien almacenada de forma segura en la molécula de ferritina. Cuando hay un exceso de hierro dentro de las células y tejidos, puede desencadenarse un cuadro de sobrecarga tisular y la presencia de hierro activo sin blindaje interrumpe la homeostasis de óxido-reducción y favorece la química de Fenton (Fig. 1); esto implica una reacción entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{+2}$ , produciendo un porcentaje de radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), extremadamente reactivos, y catalizando la propagación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Galarsis y col., 2019).

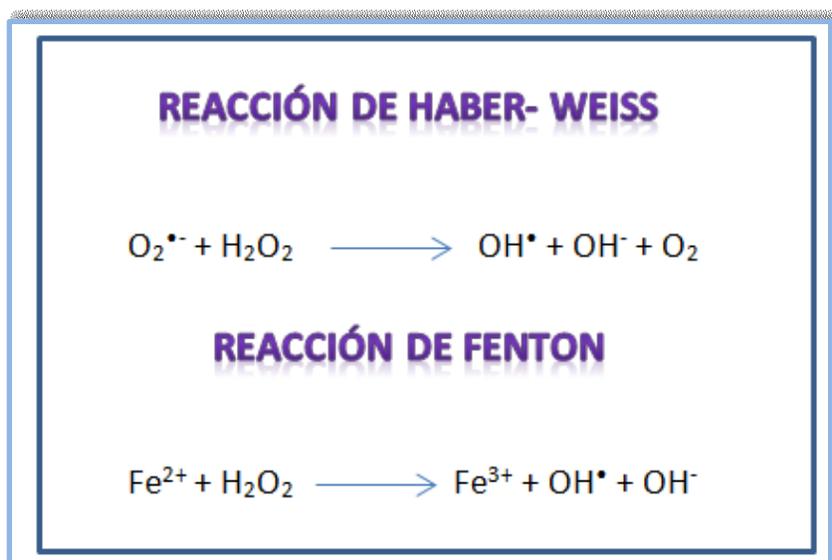


Figura 1. Reacción de Haber- Weiss y Fenton.

La principal toxicidad del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno deviene de su dependencia férrica para su conversión en el extremadamente reactivo  $\text{OH}^\bullet$  (reacción Haber-Weiss), el cual puede desencadenar estrés oxidativo (Fig. 2).



Figura 2. Estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son especies derivadas del  $\text{O}_2$  que son más reactivas que el  $\text{O}_2$  mismo (Fig. 3). Son compuestos químicos que incluyen radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) y aniones superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), así como especies no radicales como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) (Halliwell y Gutteridge, 2015; Kajarabille y Latunde-Dada, 2019).

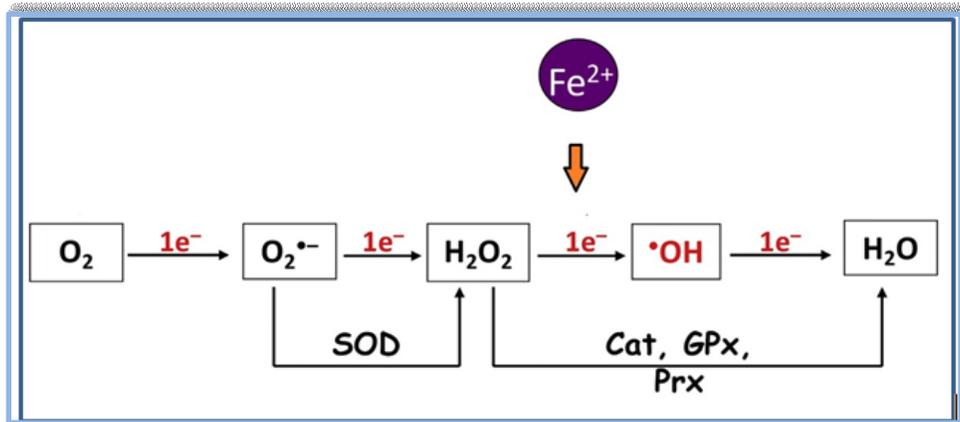


Figura 3. ROS: Especies reactivas del oxígeno Imagen modificada de Galaris et al (2019).

Por tanto, todos los radicales de oxígeno son ROS, pero no todos los ROS son radicales de oxígeno. El término "reactivos" es relativo; ya que por ejemplo  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  son selectivos en sus reacciones con moléculas biológicas, dejando a la mayoría de ellas ilesas, mientras que  $OH^\bullet$  daña todo a su alrededor (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Las ROS se producen como resultado del metabolismo intracelular normal en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico y los peroxisomas en la célula, así como a partir de diferentes sistemas de enzimas citosólicas como las NADPH oxidasas (NOX). La producción de ROS y el aumento del estrés oxidativo puede ocasionar daño a componentes celulares, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Jomova y Valko, 2011; Lin y col., 2011; Prá y col., 2012). Este daño puede ser permanente (Aksu y col., 2010) y es aceptado como uno de los principales mecanismos subyacentes de ciertas enfermedades crónicas, daños por intoxicación y lesiones tisulares (Fraga y Oteiza, 2002; Toxqui y col., 2010).

#### 4.1. Peroxidación lipídica

Dentro del concepto de estrés oxidativo, el proceso mediante el cual se produce el daño a lípidos se conoce como peroxidación lipídica y puede ser iniciado por una variedad de agentes oxidantes, incluyendo  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  y los radicales  $OH^\bullet$  altamente reactivos durante condiciones patológicas o exposición a xenobióticos y contaminantes ambientales. La peroxidación lipídica puede alterar la estructura y función de las proteínas

de las membranas vitales y, si no se controla, podría provocar disfunción celular y daño tisular generalizado, razón por la cual se relaciona con la etiología de numerosas enfermedades (Miyazawa y col., 2019).

Brevemente, la peroxidación lipídica (Fig. 4) consta de tres pasos: "Iniciación", es el proceso por el cual son generados los radicales lipídicos por las especies reactivas del oxígeno. Por ejemplo, el radical  $\text{OH}^\bullet$  actúa como pro-oxidante, sobre un ácido graso insaturado (LH) formando un radical lipídico ( $\text{L}^\bullet$ ). La velocidad de reacción depende de la presencia de un iniciador (In), pero es relativamente alta entre todas las reacciones. En el paso "Propagación",  $\text{L}^\bullet$  reacciona con oxígeno para producir un radical peroxilo lipídico ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Esta velocidad de reacción es rápida porque  $\text{L}^\bullet$  es muy reactivo. Luego,  $\text{LOO}^\bullet$  reacciona lentamente con LH para formar hidroperóxido lipídico (LOOH). En esta reacción,  $\text{L}^\bullet$  y LOOH se forman continuamente y se produce una reacción en cadena. Una vez que progresa la peroxidación lipídica, la reacción en cadena no se detiene hasta que se forma el producto final en el paso de "Terminación" (Miyazawa y col., 2019). En este caso puede darse la neutralización de los radicales entre sí o la neutralización por medio de antioxidantes.

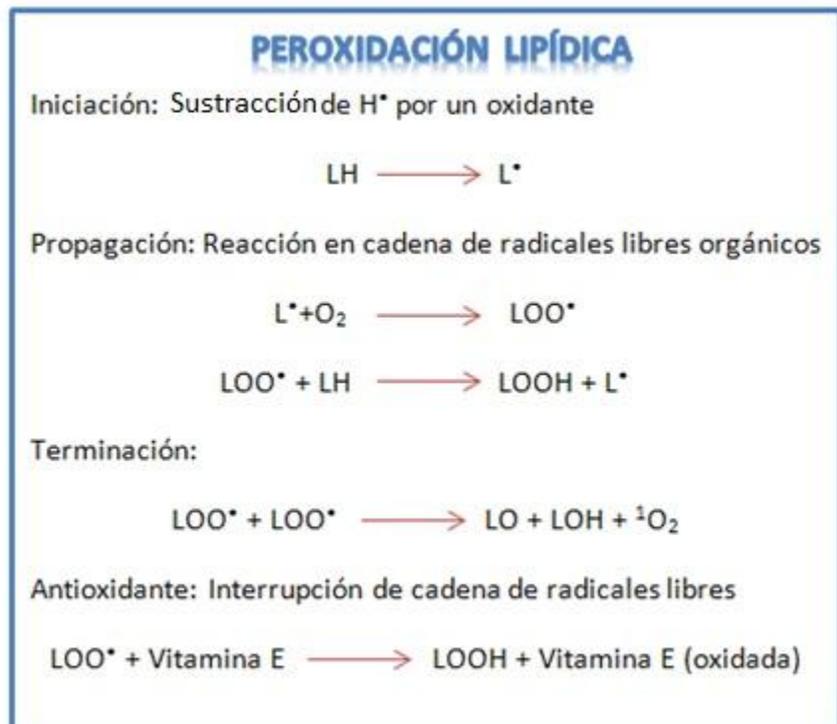


Figura 4. Peroxidación lipídica.

La ferroptosis es una muerte celular regulada, no apoptótica, desencadenada cuando el estado antioxidante endógeno de la célula se ve comprometido, lo que conduce a la acumulación tóxica de ROS que, a su vez, dañan la estructura de la membrana celular ocasionando peroxidación lipídica (Kajarabille y Latunde-Dada, 2019). La generación de esta especie de fosfolípido oxidado es clave para la ejecución de la ferroptosis, porque si se suprime, se evita la muerte celular (Angeli y col., 2017). Las células ferroptóticas generalmente muestran una membrana celular intacta y un tamaño nuclear normal, y manifiestan alteraciones mitocondriales predominantes, como la contracción, la desaparición de las crestas, la ruptura de la membrana mitocondrial externa y la aparición de una ultra-estructura densa en electrones.

#### 4.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo, su objetivo es proteger las bio-moléculas y pueden clasificarse en enzimáticos y

no-enzimáticos (Tabla 2). Son capaces de reducir o terminar las reacciones en cadena que son causadas por las especies reactivas del oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Como se comentó anteriormente, el hierro en exceso puede resultar tóxico por lo que las células han desarrollado diversos mecanismos para evitarlo. Esto ocurre por medio de la regulación del transporte a través de las membranas, la producción de enzimas antioxidantes (AO) y el aprovechamiento de los antioxidantes no enzimáticos introducidos por la ingesta (Fraga y Oteiza, 2002).

Un antioxidante que protege de la toxicidad del hierro es una sustancia que puede: (a) quelar el hierro ferroso y prevenir la reacción con oxígeno o peróxidos; (b) quelar el hierro y mantenerlo en un estado de óxido-reducción, lo que lo hace incapaz de reducir el oxígeno molecular; (c) atrapar radicales ya formados, independientemente de si se originan de reacciones dependientes del hierro o no (Fraga y Oteiza, 2002).

Las proteínas que participan en el metabolismo del hierro, pueden secuestrar este mineral previniendo su participación en reacciones de radicales libres. La ferritina, la transferrina y varias enzimas que contienen hierro como la catalasa, mantienen el hierro a un nivel férrico o mayor estado reducido, haciéndolo menos reactivo a iniciar y/o propagar reacciones de radicales libres (Fraga y Oteiza, 2002).

<b>Antioxidantes No Enzimáticos</b>	<b>Antioxidantes Enzimáticos: Cofactores</b>
<b>Vitamina C</b>	<b>Superóxido dismutasa: Cobre, Manganeso, Zinc</b>
<b>Vitamina E</b>	
<b>Flavonoides</b>	<b>Glutación peroxidasa: Selenio</b>
<b>Betacaroteno</b>	
<b>Licopeno</b>	<b>Catalasa: Hierro</b>

*Tabla 2. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.*

#### **4.2.1. Antioxidantes enzimáticos**

Los antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), son la primera línea de defensa contra un exceso de ROS. Los compuestos tioles, especialmente el glutatión, proporcionan una significativa protección antioxidante. Esta protección está relacionada con la capacidad del glutatión para atrapar radicales, reducir peróxidos, y trabajar para mantener el estado de óxido-reducción de las células (Fraga y Oteiza, 2002). Se cree que cuando los sistemas de reparación de peróxidos lipídicos dependientes del glutatión (GSH) están comprometidos, se desencadenaría la ferroptosis (Kajarabille y Latunde-Dada, 2019). La enzima catalasa actúa principalmente en la descomposición de  $H_2O_2$  para dar  $H_2O$  y  $O_2$  (Aebi, 1974), mientras que la superóxido dismutasa, cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y en peróxido de hidrógeno (McCord y Fridovich, 1969). Estas enzimas son sumamente importantes en la defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.

#### **4.2.2. Antioxidantes no enzimáticos**

La interacción entre el exceso de hierro y los antioxidantes dietéticos ha sido muy estudiada, especialmente con respecto a las vitaminas C y E.

En el caso de la relación entre la vitamina C y el hierro, su efecto resulta controversial. Por un lado, el ascorbato puede reducir el hierro "libre" (férrico) a hierro ferroso, promoviendo el inicio y propagación de reacciones de radicales libres. Se cree que generalmente esto no ocurre porque los niveles de hierro libre son muy bajos debido a su secuestro por las diversas proteínas de unión a metales (ferritina y transferrina). Sin embargo, en personas con riesgo de sobrecarga de "hierro libre", un exceso de vitamina C se cree que podría tener efectos perjudiciales (Fraga y Oteiza, 2002).

Por su parte, La vitamina E, es el antioxidante no enzimático liposoluble más importante y esencial en la defensa celular. En comparación con otras vitaminas lipofílicas exógenas que existen, la vitamina E se encuentra en mayor concentración en la membrana de todas las células del cuerpo. Los tocoferoles tienen una destacada afinidad

para los electrones no apareados y, debido a eso, intervienen en la cascada de reacciones de la peroxidación lipídica de membranas (Miyazawa y col., 2019).

La vitamina E, presenta ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -Toch) junto al  $\gamma$ -tocoferol son los isómeros de mayor potencia antioxidante. La captura de  $O_2^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$  se desarrolla en las membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplasmático liso) y detiene la propagación de la peroxidación lipídica (LPO). En el proceso de formación de peróxidos lipídicos, la presencia de  $\alpha$ -Toch en la reacción libera iones de hidrógeno a  $LOO^{\bullet}$ , que a su vez se convierte en un  $\alpha$ -Toc $^{\bullet}$  para formar LOOH. Esta reacción también depende de las propiedades químicas del componente antioxidante, y es relativamente rápida. Además, el  $\alpha$ -Toc $^{\bullet}$  sufre acoplamiento radical-radical con otro  $LOO^{\bullet}$  para formar aductos no radicales poco reactivos. Por lo tanto, cada molécula de vitamina E puede capturar dos moléculas de radical peroxilo (Miyazawa y col., 2019). El tocoferoxilo retorna a su estado original a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y por las vitaminas C y A. En varios estudios, realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha observado que la vitamina E puede prevenir el daño ocasionado por el hierro y evitar la ferroptosis (Tang y col., 2016; Angeli y col., 2017; Agmon y Stockwell, 2017; Kajarabille y Latunde-Dada, 2019).

## 5. Daño Genético

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo celular normal es una fuente de ROS, y los procesos celulares (normalmente no patógenos) son los que explican los niveles basales del daño oxidativo del ADN detectado en el tejido normal (Cook y Reddy, 1995).

El radical  $OH^{\bullet}$  reacciona con los constituyentes del ADN causando daño a las bases nitrogenadas y al azúcar de la molécula de ácido nucleico por una variedad de mecanismos (Fig. 5). La adición de electrones ( $e^-$ ) e hidrógeno ( $H^{\bullet}$ ) a dobles enlaces de bases de ADN también puede causar daño. Estas reacciones, conducen a otras adicionales que producen roturas de cadena simple y doble, formación de desoxinucleósidos, lesiones en tándem, sitios agrupados y enlaces cruzados entre proteínas y ADN (Dizdaroglu y Jaruga, 2012). En los organismos vivos, el daño del ADN se repara mediante una variedad

de mecanismos, pero si el proceso de reparación no es correcto puede ocasionarse inestabilidad genómica. La inestabilidad genómica tiene amplias consecuencias en la salud humana, se ha relacionado con desórdenes degenerativos, envejecimiento, desórdenes del sistema inmune, infertilidad, síndromes metabólicos y numerosas enfermedades hereditarias (Bartkova y col., 2007; Herbig y col., 2006; Kulkarni y Wilson, 2008; Matzuk y Lamb, 2008; Schumacher y col., 2008; Stratton y col., 2009).

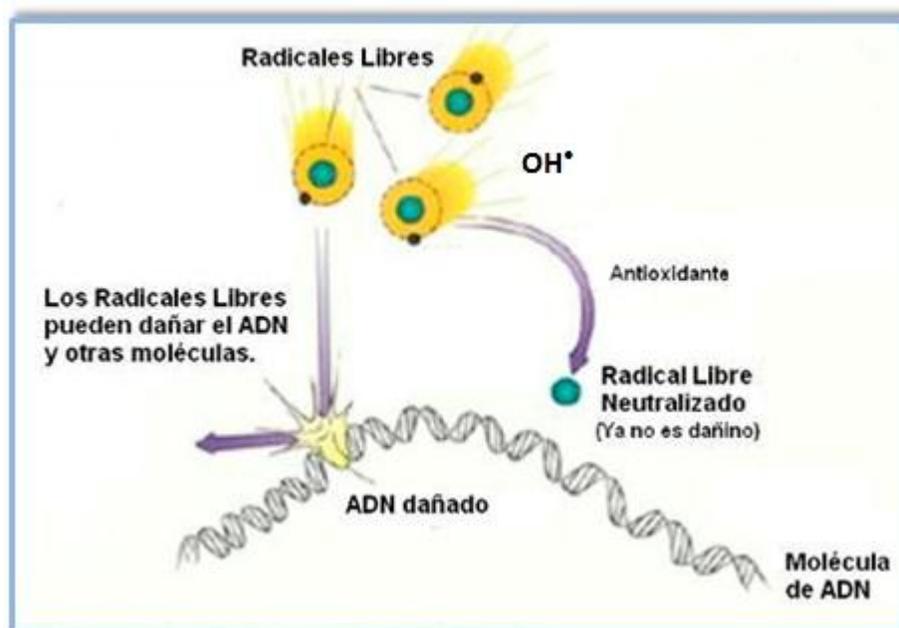


Figura 5. Daño al ADN por radicales libres.

Los micronutrientes son un factor clave en la estabilidad del ADN, dado que muchos de ellos actúan como sustrato y/o cofactores en las reacciones de mantenimiento del metabolismo. Por esta razón, la presencia de niveles inadecuados de micronutrientes podría imposibilitar la actividad de enzimas requeridas para la estabilidad genómica, provocando fracturas de doble o simple cadena sobre el ADN, lesiones oxidativas o ambas (Fenech, 2001; 2005). La deficiencia de micronutrientes puede causar daño genómico del mismo orden de magnitud que el causado por la exposición a dosis significativas de genotoxinas ambientales como carcinógenos químicos, radiación ultravioleta y radiación ionizante (Fenech, 2005).

Por lo antedicho, es que existe una fuerte conciencia internacional para definir los requisitos óptimos de minerales y vitaminas clave para prevenir el daño en ambos tipos de ADN (nuclear y mitocondrial) (Fenech, 2005).

## CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

### 6. Suplementación con hierro: diario vs. semanal

Como se ha mencionado anteriormente, la ADH es uno de los principales problemas nutricionales y de salud pública. Su prevalencia entre niños pequeños y mujeres embarazadas es particularmente alta y, si bien la suplementación oral diaria con hierro medicinal se considera una estrategia efectiva para reducir su incidencia, el incumplimiento de la misma es un problema sumamente importante vinculado a esta estrategia. En este contexto, la suplementación intermitente de hierro se debate como una posible estrategia alternativa que puede mejorar la efectividad de los programas operativos. Por lo tanto, a partir de la década del '90 se comenzó a considerar la posibilidad de reemplazar la administración diaria por una administración semanal y obtener así mejores resultados. Si bien se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar la efectividad de la suplementación semanal en mujeres (embarazadas y no embarazadas), la información acerca de dicha administración en niños es muy escasa y prácticamente nula en cuanto a su utilización como suplementación preventiva.

En este contexto, uno de los primeros investigadores en interesarse por esta temática, fue Fernando Vitteri quien desarrolló la mayoría de sus estudios en mujeres embarazadas (Viteri y col., 1999; Peña-Rosas y col., 2004; Peña-Rosas y col., 2015). La bibliografía en infantes suele ser más escasa. La mayoría de los trabajos publicados son *in vivo* y corresponden a ensayos clínicos controlados, estandarizados y aleatorizados en personas con ADH. Schultink y colaboradores, evaluaron el efecto del tratamiento con hierro (30 mg) dos veces por semana en niños en edad preescolar con bajo nivel de este mineral. Concluyeron que este tratamiento tiene un efecto bioquímico positivo sobre el estado de hierro similar al del tratamiento diario (Schultink y col., 1995). Tee y colaboradores, analizaron si el tratamiento semanal a largo plazo con sulfato de hierro ayudaría a mejorar las concentraciones de hemoglobina y ferritina en adolescentes en edad escolar con anemia leve a moderada; concluyeron que dicho tratamiento mejoró las concentraciones de hemoglobina y ferritina, por lo que sería una estrategia práctica y efectiva de profilaxis

(Tee y col., 1999). Ninh y colaboradores, evaluaron la efectividad tanto del tratamiento diario de hierro como del semanal en bebés de 5 a 12 meses. A partir de los resultados obtenidos, propusieron combinar la administración diaria de suplementos de hierro desde los 6 meses de edad y durante 3 meses, seguido de una administración semanal de suplementos de hierro hasta los 15 meses (Ninh y col., 2002). Desai y colaboradores, compararon la eficacia de la administración de hierro diario y dos veces por semana durante 6 semanas en el tratamiento de la anemia leve y moderada en niños de 2 a 59 meses de un área endémica de malaria del oeste de Kenia; concluyeron que 6 semanas de tratamiento diario con hierro dieron como resultado mejores respuestas hematológicas que con hierro dos veces por semana en el tratamiento de la anemia en niños en edad preescolar, independientemente de si se puede asegurar la adherencia (Desai y col., 2004). Zalles Cueto y colaboradores analizaron ambos tipos de tratamiento terapéutico con sulfato ferroso (diario vs semanal) en niños de edad escolar (6 a 10 años) con anemia ferropénica. Observaron que el tratamiento semanal con 6 mg/kg fue más eficiente que el diario, debido a la mayor aceptación y la disminución de los efectos colaterales (Zalles Cueto y col., 2005). En el trabajo de Mozaffari Khosravi y colaboradores, se estudiaron los efectos de la administración de una dosis baja realizada una vez por semana de suplementos de hierro en adolescentes (14-16 años). El tratamiento con 150 mg de sulfato ferroso una vez a la semana durante 16 semanas mejoró significativamente el estado de hierro. Según los autores, no habría necesidad de una dosis más alta, que pueda causar mayores efectos adversos y tener costos más altos de implementación del tratamiento (Mozaffari-Khosravi y col., 2010). Hawamdeh y colaboradores, analizaron la eficacia de la terapia de hierro oral diaria versus dos veces a la semana y una vez a la semana, para optimizar el protocolo para el tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro entre los niños jordanos (6 meses a 5 años). Concluyeron que el régimen de dos dosis por semana es el más efectivo para resolver la anemia con un menor costo y menos efectos secundarios (Hawamdeh y col., 2013). Nogueira Arcanjo y colaboradores, evaluaron el efecto del tratamiento terapéutico diario y semanal de hierro sobre los valores de hemoglobina y la prevalencia de anemia en los lactantes (12 a 24 meses). Sus

resultados indicaron que ambos tipos de tratamiento (diario y semanal) fueron efectivos para aumentar los niveles de hemoglobina y reducir la anemia en los bebés (Nogueira Arcanjo y col., 2013). Matos y colaboradores, compararon el efecto del tratamiento terapéutico con hierro una vez por semana versus dos veces por semana, sobre los niveles de hemoglobina (Hb) y la prevalencia de anemia en niños de entre 6 y 18 meses. Ambas modalidades de tratamiento aumentaron la concentración media de Hb; sin embargo, el tratamiento de dos veces por semana proporcionó resultados más beneficiosos (Matos y col., 2016).

Entre los trabajos donde se analizaron los efectos de la suplementación preventiva se encuentra el de Agarwal y colaboradores, quienes investigaron los beneficios de la profilaxis de la anemia en adolescentes escolares mediante la suplementación semanal o diaria con hierro y folato. En este sentido, corroboraron que la administración semanal es una estrategia práctica y efectiva para la profilaxis de la anemia en niñas adolescentes escolares (Agarwal y col., 2003). De Regil y colaboradores investigaron los efectos de la suplementación intermitente con hierro y lo compararon con la administración de un placebo, la suplementación diaria sola o en combinación con otras vitaminas y minerales y ninguna intervención. Analizaron los resultados nutricionales y de desarrollo en niños sanos desde el nacimiento hasta los 12 años de edad y propusieron que la suplementación con hierro intermitente sería eficaz para mejorar las concentraciones de hemoglobina y reducir el riesgo de anemia o de deficiencia de hierro en niños menores de 12 años en comparación con un placebo o la falta de intervención, pero sería menos eficaz que la suplementación diaria para prevenir o controlar la anemia. Sin embargo, sostienen que la suplementación intermitente podría ser una intervención viable de salud pública en entornos donde la suplementación diaria ha fallado o no se ha implementado (De-Regil y col., 2011). Por el contrario, en otras investigaciones no se observaron beneficios de la suplementación semanal. En este sentido, Yurdakök y colaboradores buscaron determinar la eficacia de la suplementación diaria y semanal de hierro durante 3 meses, para mejorar el estado del hierro en bebés sanos de 4 meses de edad con lactancia materna exclusiva. No encontraron que la suplementación con hierro semanal o diario disminuyera la

probabilidad de ADH, sin embargo, es de resaltar el limitado número de casos del ensayo (Yurdakök y col., 2004). Engstrom y colaboradores por su parte, evaluaron la efectividad de la suplementación profiláctica universal con sulfato de hierro en forma diaria o semanal para la prevención de la anemia en lactantes. Encontraron que sólo cuando se administró diariamente la suplementación universal con sulfato de hierro en lactantes de 6 a 12 meses de edad fue efectiva para aumentar la Hemoglobina sérica y disminuir el riesgo de anemia (Engstrom y col., 2008).

## **7. Hierro, estrés oxidativo y daño en biomoléculas**

Como se ha planteado anteriormente, el hierro es un metal de transición y un constituyente esencial de casi todas las células y organismos vivos. Como componente de varias metalo-proteínas participa en procesos bioquímicos críticos para cualquier ser vivo. Sin embargo, cuando está presente en exceso dentro de las células y los tejidos, el hierro puede interrumpir la homeostasis de óxido-reducción y catalizar la propagación de ROS, lo que conlleva al estrés oxidativo y al posible daño de lípidos, proteínas y ADN (Fraga y Oteiza, 2002).

Tal como se describió en el apartado anterior para ambas alternativas de suplementación (diaria y semanal) de la prevención de la anemia ferropénica, la bibliografía que vincula al hierro con el estrés oxidativo y el daño genotóxico en niños, también resulta contradictoria. Entre los pocos trabajos que evalúan la profilaxis en lactantes, se destaca el de Hacıhamdioglu y colaboradores, quienes investigaron los posibles efectos de la suplementación con hierro a los 4 meses de edad, sobre la peroxidación lipídica y las enzimas antioxidantes durante un período de 2 meses. Ellos encontraron que la suplementación preventiva de la anemia con sulfato ferroso en niños sanos no causó peroxidación lipídica ni aumentó la respuesta antioxidante cuando se utilizó una dosis de 10 mg/d (Hacıhamdioglu y col., 2013).

En la bibliografía consultada, se han encontrado otros estudios donde se analizaron los efectos del tratamiento terapéutico y tampoco se observa un efecto tóxico del hierro que pudiera incrementar el estrés oxidativo y el daño genotóxico. Por ejemplo, algunos

autores observaron que el tratamiento en pacientes anémicos con sulfato ferroso diario (6 mg/kg/día) disminuía la peroxidación lipídica después de 6 u 8 semanas de tratamiento (Kurtoglu y col., 2003; Zaka-Ur-Rab y col., 2016). Por su parte, Sundaram y colaboradores plantearon que después de un mes de tratamiento con hierro, los niveles de fructosamina y malondialdehído en pacientes anémicas, disminuyeron significativamente, por lo que el tratamiento con hierro no intensificaría los valores de peroxidación lipídica (Sundaram y col., 2007). Aycicek y colaboradores compararon el efecto oxidante y antioxidante total de diferentes fármacos de administración oral de hierro en niños con anemia por deficiencia de hierro. El estado oxidante total en suero aumentó significativamente producto de la anemia, y el  $\text{Fe}^{+2}$  fue sumamente efectivo para corregir dicho estado oxidativo elevado (Aycicek y col., 2014).

Entre los trabajos realizados en pacientes sanos, podemos mencionar el de Prá y colaboradores, quienes evaluaron la asociación entre el daño basal del ADN y cromosómico con la ingesta de hierro y los parámetros del estado del hierro en los glóbulos rojos de niños y adolescentes de una comunidad de bajo nivel socioeconómico. A partir de los resultados obtenidos, propusieron que una ingesta de hierro mayor o igual a 15 mg/día podía disminuir el daño del ADN en sujetos jóvenes sanos (Prá y col., 2011). Orozco y colaboradores, evaluaron la respuesta de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico urinario (T-BARS) y la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) como indicadores de oxidación sistémica en respuesta a la suplementación oral a corto plazo con hierro y antioxidantes. No observaron un efecto del hierro sobre los biomarcadores de la oxidación sistémica, aunque si una asociación significativa dentro del rango no patológico del estrés oxidativo en hombres adultos sanos (Orozco y col., 2012). Por su parte, Díaz-Castro y colaboradores evaluaron el efecto de varias dosis y fármacos con hierro sobre los parámetros hematológicos, el daño oxidativo de ADN, lípidos y proteínas, durante el curso de la recuperación de la ADH. Concluyeron que la suplementación con dosis bajas de hierro hem o formas combinadas de hierro no hem y hem, fueron eficaces para restaurar los parámetros hematológicos deteriorados y prevenir el estrés oxidativo evocado asociado con los suplementos de Fe (Díaz-Castro y col., 2013).

Por otro lado, se ha encontrado un gran número de trabajos donde sí se reportó cierto aumento en el estrés oxidativo o en el daño genético a causa de los tratamientos con hierro. En este sentido, Premkumar y Bowlus, evaluaron los efectos combinados del hierro y el ácido ascórbico en la dieta sobre la genotoxicidad, cuantificando la frecuencia de micronúcleos (MNI) en las células de la médula ósea de ratones C3H/He. Concluyeron que una dieta con alto contenido de sulfato ferroso incrementa la frecuencia de MNI en células de médula ósea de ratones tratados *in vivo* (Premkumar y Bowlus, 2003). Por su parte, Franke y colaboradores, observaron que la vitamina C aumenta el daño en el ADN causado por sulfato de hierro en ratones tratados *in vivo* con hierro (Franke y col., 2005). Mimić-Oka y colaboradores, buscaron esclarecer si la terapia repetitiva intravenosa de hierro podría ser una causa suplementaria de estrés oxidativo en pacientes con hemodiálisis. Concluyeron que, si bien mejora los parámetros hematológicos, un aumento en las reservas de hierro debido a la suplementación podría contribuir a una mayor producción de radicales libres (Mimić-Oka y col., 2005). Aslan y colaboradores, investigaron la asociación entre el daño en el ADN, la capacidad antioxidante total y el grado de anemia en mujeres con ADH quienes recibían tratamiento terapéutico con hierro. Registraron un incremento del estrés oxidativo y del daño en el ADN en aquellas mujeres con ADH comparadas con el grupo control (Aslan y col., 2006). Prá y colaboradores, informaron sobre el efecto de varios metales de transición en un tratamiento subcrónico con ratones, los mismos fueron alimentados durante seis días consecutivos con agua y con 33,2 mg/kg de hierro o 8,5 mg/kg de cobre. Aquellos ratones a los que se les suministró hierro mostraron un aumento de la frecuencia de MNI en médula ósea, evidenciando los efectos genotóxicos y mutagénicos de este metal (Prá y col., 2008). Aksu y colaboradores, investigaron el daño oxidativo basal del ADN y el rol de la administración de una dosis terapéutica de hierro en la oxidación del ADN en niños con anemia por deficiencia de hierro. Observaron un aumento significativo de fracturas del ADN y bases oxidadas en estos niños respecto de niños sanos (Aksu y col., 2010). Prá y colaboradores, en otro trabajo demostraron que el hierro es uno de los metales de transición que más inducen la formación de 8-oxo-7,8 dihidro-guanina (8-OHdG),

provocando roturas de doble cadena (Prá y col., 2012). Asimismo, Alcântara y colaboradores, visualizaron las respuestas citotóxicas y genotóxicas provocadas *in vitro* por el hierro en una línea celular astrocítica. Encontraron que una dosis de 640 µg/ml de sulfato de hierro aumentó la frecuencia de MNi y concluyeron que los efectos genotóxicos probablemente se deben a las propiedades pro-oxidantes del hierro (Alcântara y col., 2013). Akarsu y colaboradores, evaluaron la capacidad antioxidante total de una dosis terapéutica de hierro en pacientes con anemia por deficiencia de hierro. Sus resultados mostraron que la terapia oral con sulfato ferroso indujo un estrés oxidativo leve, mientras que las terapias intramuscular e intravenosa provocaron niveles más altos de estrés oxidativo, en orden creciente de intensidad (Akarsu y col., 2013). Abtahi y colaboradores evaluaron los efectos del consumo de pan fortificado con hierro durante 8 meses, sobre ciertos biomarcadores de estrés oxidativo en una población sana. Observaron que un período a corto plazo de ingesta adicional de hierro, no mostró efectos graves de oxidación en los lípidos, aunque los cambios significativos de hierro sérico y algunos índices de estrés oxidativo sugieren que el enriquecimiento de la harina con hierro entre los adultos no anémicos podría conllevar efectos adversos a largo plazo (Abtahi y col., 2014). Por otra parte, Altun y colaboradores, investigaron los efectos de la deficiencia de hierro y la anemia por deficiencia de hierro, sobre el estrés oxidativo y las funciones tubulares renales antes y después del tratamiento con hierro de los niños. Observaron que la administración diaria de  $Fe^{+2}$ , a una dosis terapéutica de 4 mg/kg/día para el tratamiento de la anemia durante un período de 8 a 12 semanas, aumentó el estrés oxidativo (Altun y col., 2014). Ferro y colaboradores, investigaron el efecto genotóxico de la sobrecarga de hierro y las complicaciones de la talasemia, incluidos sus tratamientos farmacológicos. Observaron un aumento de los indicadores genotóxicos obtenidos mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN) y el ensayo cometa, como consecuencia de la sobrecarga de hierro en pacientes con talasemia (Ferro y col., 2016). Por último, Mollet y colaboradores, evidenciaron que dosis bajas de hierro son suficientes para modificar el endotelio vascular e inducir daño en el ADN (Mollet y col., 2016).

## 8. Hierro y vitamina E

Las investigaciones respecto a los efectos de la mayoría de las vitaminas sobre el daño oxidativo también resultan controversiales. Si bien algunos estudios sugieren una función protectora de las mismas, otros no muestran este efecto. En el caso particular de la vitamina E, Fenech y colaboradores, evidenciaron durante un estudio de intervención, que el aumento de esta vitamina no tuvo un impacto significativo en la tasa de daño genético basal y tampoco correlación entre la frecuencia de daño genético basal y el estado de vitamina E evaluado en linfocitos humanos (Fenech y col., 1997). A su vez, Record y Jannes observaron que la suplementación con vitamina E tendría poco efecto contra el daño genómico oxidativo evaluado por la formación de micronúcleos en esplenocitos sometidos a estrés oxidativo *ex vivo* (Record y Jannes, 2000). Ozdemir y colaboradores, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y pacientes talasémicos suplementados con vitamina E a través del ensayo cometa (Ozdemir y col., 2014). Díaz y colaboradores analizaron el efecto de la suplementación por 28 días con vitaminas C (500 mg/día) y E (400 UI/día) en corredores bien entrenados y reportaron que las concentraciones de hepcidina permanecieron elevadas en respuesta a las señales inflamatorias y de hierro (Díaz y col., 2015).

Sin embargo, la mayoría de los trabajos analizados sí evidenciaron un efecto beneficioso y protector de la vitamina E. Asimismo, a diferencia de lo publicado para otras vitaminas, no parecería tener efectos tóxicos en las dosis estudiadas. Kan y colaboradores, vislumbraron un claro efecto genoprotector de la suplementación con vitamina E en pacientes con diálisis (Kan y col., 2002). Wawrzyniak y colaboradores sugieren, a partir de la experimentación en un modelo de ratones, que el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico y el  $\beta$ -caroteno, tienen principalmente efectos antioxidantes sobre la peroxidación lipídica cuando se administran simultáneamente (Wawrzyniak y col., 2013). Madhikarmi y Murthy, investigaron los niveles de antioxidantes y la peroxidación de lípidos en pacientes con ADH. Sus resultados revelaron que luego de la suplementación con vitaminas, se logró una menor peroxidación de lípidos y un aumento de las vitaminas antioxidantes (Madhikarmi y Murthy, 2014). Riffle y colaboradores, observaron en un modelo de ratones que tanto la

vitamina C como la vitamina E favorecerían la eliminación de especies reactivas de oxígeno y ayudarían a normalizar el estado oxidativo de la médula espinal alterado por el dolor (Riffel y col., 2018). Rodríguez y colaboradores, observaron que el uso de membranas recubiertas con vitamina E supone una disminución en los niveles de daño oxidativo del ADN y a su vez mejora el estado de la anemia urémica en pacientes con hemodiálisis (Rodríguez-Ribera y col., 2017). Altamura y colaboradores, visualizaron que la maduración alterada de los reticulocitos en respuesta a la pérdida de Gpx4 en las células hematopoyéticas causa una eritropoyesis ineficaz y esto resulta parcialmente atenuado por la suplementación dietética de vitamina E (Altamura y col., 2020).

Son pocos los trabajos específicos donde se analiza en conjunto el efecto del hierro y la vitamina E, entre ellos se destaca el de Şimşek Orhon y colaboradores, quienes investigaron específicamente el estado oxidante-antioxidante en la ADH y evaluaron el efecto antioxidante de la vitamina E en el tratamiento terapéutico con hierro. Los resultados evidenciaron que la administración de hierro en el tratamiento con ADH puede estimular la peroxidación lipídica y que la vitamina E suministrada podría reducir la producción de malonaldeído (MDA) (Şimşek Orhon y col., 2006). Arnon y colaboradores, observaron que el tratamiento de hierro con suplementos de vitamina E, resulta eficaz y seguro para mejorar la anemia en los recién nacidos prematuros (Arnon y col., 2009). Tang y colaboradores, plantearon que adicionar vitamina E junto con la suplementación terapéutica con hierro podría disminuir la inflamación y favorecer la absorción del hierro (Tang y col., 2016). Según destacaron Isler y colaboradores, la suplementación con vitamina E junto con el tratamiento con hierro parenteral, puede ser una estrategia eficaz para restaurar parcialmente la respuesta antioxidante durante la anemia (Isler y col., 2002).

## 9. Significado de la investigación

En relación a la prevención de la ADH, la OMS recomienda la suplementación universal farmacológica de lactantes y embarazadas cuando la prevalencia en un grupo particular es mayor a 40%. En este sentido, en el ámbito local, la Sociedad Argentina de Pediatría recomienda la suplementación preventiva diaria con sulfato ferroso a partir de los 2 meses de vida. A pesar de ello, la prevalencia de la ADH continúa siendo muy alta en los niños menores de 2 años, debido en parte a la baja adhesión a la administración. Como alternativa, algunos autores han recomendado una suplementación semanal para la prevención de la ADH en niños y embarazadas, la cual sería igual de efectiva y presentaría una mayor adhesión como consecuencia de los menores efectos adversos asociados con administración diaria. Hasta el presente, la evidencia a favor de la administración semanal no es concluyente. No hay trabajos que logren esclarecer cuál de las dos formas de administración resulta más efectiva en relación a la mejora de los parámetros bioquímicos y a la adhesión, con lo cual se mantiene la recomendación de la suplementación diaria. Cabe destacar que a la fecha, se encontró sólo un trabajo donde se evaluó el efecto preventivo de ambos tipos de administración del sulfato ferroso en lactantes hasta los seis meses de vida.

En lo que respecta al efecto genético provocado por el hierro, si bien hay algunos trabajos que difieren, en líneas generales hay abundante evidencia de un efecto pro-oxidante del mismo. La mayoría de las investigaciones realizadas, se llevaron a cabo en pacientes con deficiencia de hierro y/o ADH, utilizando dosis terapéuticas. En estos trabajos, se encuentran resultados contradictorios, donde algunos tratamientos con hierro logran recuperar el estrés oxidativo producto de la patología y en otros casos el tratamiento incrementa el estrés generado por las mismas. De todos modos, son escasos los trabajos donde se realizó el análisis de los efectos de la suplementación preventiva con hierro en personas sanas y, más escasos aún, aquellos realizados en lactantes, donde el metabolismo y el desarrollo presenta grandes diferencias respecto de otras etapas de la ontogenia.

Por su parte, también se observaron resultados contradictorios en los trabajos donde se analizaron los efectos combinados de la administración conjunta de hierro con vitaminas. Sin embargo, en el caso de la vitamina E, si bien algunos trabajos no evidencian efecto alguno, en la mayoría se destacó el efecto protector sobre la peroxidación lipídica.

Por lo anteriormente expuesto, la importancia de la presente tesis doctoral reside en que, hasta donde se tiene conocimiento, se trata del primer trabajo de investigación donde se realiza la evaluación *in vitro* de los efectos genotóxicos y el estrés oxidativo provocados por la suplementación preventiva de la anemia del lactante, a partir de la comparación de ambas formas de administración de la suplementación (diaria y semanal) y su combinación con un poderoso antioxidante como la vitamina E (Fig. 6). En base a una exhaustiva búsqueda bibliográfica en distintos modelos experimentales (Tablas 36 y 37, Anexo 2), se deja constancia que la presente tesis propone una alternativa novedosa para el tratamiento de la anemia ferropénica.

Resulta de suma importancia poder contribuir a esclarecer esta problemática para favorecer el diseño de políticas públicas adecuadas las cuales permitirán revisar, sobre una base científica, los esquemas de suplementación actuales, optimizar los recursos económicos destinados a la prevención de la anemia y hacer frente a esta patología universalmente distribuida.

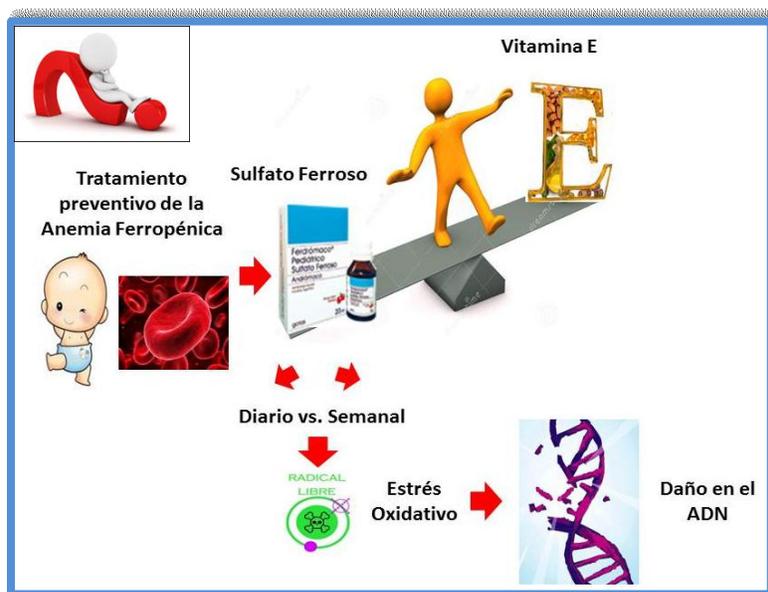


Figura 6. Resumen gráfico de la tesis doctoral.

## CAPÍTULO III. OBJETIVOS

### 10. Objetivos generales

- Comparar los efectos sobre el genoma provocados por la administración semanal y diaria de sulfato ferroso, a través de marcadores de viabilidad celular, estrés oxidativo y daño genético en sangre periférica cultivada *in vitro*. La disminución del estrés oxidativo y del daño genotóxico, podría ser el punto de partida para rever las normas en relación a la forma de administración aceptada actualmente en la prevención de la anemia ferropénica.

- Evaluar el efecto conjunto de ambas formas de administración del sulfato ferroso (semanal y diario) y la vitamina E (antioxidante no enzimático liposoluble), sobre la viabilidad celular, el estrés oxidativo y el daño genotóxico en sangre periférica cultivada *in vitro*. La vitamina E, es el antioxidante no enzimático liposoluble más importante y esencial en la defensa celular. Así, esta vitamina podría prevenir el daño ocasionado por el hierro y evitar la ferroptosis.

### 11. Objetivos específicos

- Evaluar la viabilidad celular en linfocitos de sangre periférica cultivados *in vitro*, producto de dos formas de administración del sulfato ferroso (semanal y diario), a través de la medición MTT y RN.

- Determinar el estrés oxidativo provocado en sangre periférica cultivada *in vitro*, por dos formas de administración de la suplementación preventiva de la anemia ferropénica, a partir de la medición de T-BARS, Catalasa y superóxido dismutasa.

- Comparar la frecuencia de daño cromosómico, citotóxico y citomolecular inducido en linfocitos de sangre periférica cultivados *in vitro*, por dos formas de administración de la suplementación preventiva de la anemia ferropénica, por medio de los ensayos de micronúcleos y cometa.

- Evaluar la viabilidad celular en linfocitos de sangre periférica cultivados *in vitro*, suplementados de manera conjunta con sulfato ferroso (semanal y diario) y vitamina E, a través de los ensayos de MTT y RN.

- Evaluar el estrés oxidativo provocado en sangre periférica cultivada *in vitro*, por la administración conjunta de sulfato ferroso y vitamina E, a partir de la medición de T-BARS, catalasa y superóxido dismutasa.

- Determinar la frecuencia de daño cromosómico, citotóxico y citomolecular provocado en linfocitos de sangre periférica cultivados *in vitro*, por la administración conjunta de sulfato ferroso (semanal y diario) y vitamina E, por medio de los ensayos de micronúcleos y cometa.

## CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

- La suplementación preventiva semanal con sulfato ferroso, induce una menor producción de radicales libres del oxígeno, evitando el estrés oxidativo y, por lo tanto, el daño sobre el genoma en comparación con la suplementación preventiva diaria en cultivos de sangre periférica *in vitro*.
- La administración de vitamina E concomitantemente con la de hierro, disminuye la acción pro-oxidante de este mineral, evitando una mayor producción de radicales libres del oxígeno, disminuyendo el estrés oxidativo y ocasionando un menor daño sobre el genoma en cultivos de sangre periférica *in vitro*.

## CAPÍTULO V. MÉTODOS Y TÉCNICAS

El presente plan de trabajo se desarrolló *in vitro* con la utilización de cultivos de sangre entera para evaluar la viabilidad celular, el estrés oxidativo y el daño genómico, asociados a la suplementación preventiva con hierro de la anemia ferropénica.

Cabe destacar que el presente plan de tesis presenta la aprobación del Comité Consultivo de Bioética de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. La investigación, se rige por los principios proclamados en la Declaración Universal de los Derechos Humanos de 1948, las normas éticas instituidas por el Código de Núremberg de 1947 y la declaración de Helsinki de 1964 y sus sucesivas enmiendas y clarificaciones. Se prestó especial atención a lo normado por la Ley 26529 (modificada por la ley 26742) sobre Derechos del paciente en su relación con los profesionales e instituciones de la salud y la Ley Nacional 25326 de Protección de Datos Personales, su decreto reglamentario y restantes normas que la complementan. Se tomó la autorización escrita en la que consta el consentimiento libre e informado en los términos de los artículos 5° y 6°.

### 12. Historia del Cultivo celular

Las células conforman el sustrato esencial de la vida que constituye a todos los seres vivos. Desde hace siglos, han despertado la curiosidad por averiguar sus características y funciones, por lo que a mediados del siglo XIX se empezaron a desarrollar cultivos celulares. Se perseguía el propósito de establecer técnicas para el mantenimiento, la observación y la realización de cultivos de células animales de manera aislada (Montalván y col., 2009).

A finales del siglo XIX, se inició el cultivo de células animales *in vitro*, donde se intentó desarrollar el crecimiento y mantenimiento de los órganos de distintos animales sumergiéndolos en fluidos biológicos (Harrison, 1906). Sin embargo, hasta 1907 se estudiaban las células animales aisladas, sin tener en cuenta las variaciones sistémicas. Una de las principales limitaciones que surgió, fue la de establecer un medio de cultivo nutritivo. En 1910 Burrowsel, utilizó el plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos

embrionarios, y se constituyó como uno de los primeros medios que permitió el crecimiento de tejidos (Santacruz Reyes y col., 2017).

Burrows y Carrel, realizaron los primeros cultivos celulares de mamífero a partir de explantes obtenidos de perros, gatos y conejo, y de esta manera lograron el crecimiento de tumores sólidos. Esto, permitió determinar que la vida de los diferentes cultivos se puede extender a partir de subcultivos, para lo cual emplearon como medio de cultivo plasma con extractos de embrión (Santacruz Reyes y col., 2017).

Gracias a Roux y Jones, en 1912, se utilizó por primera vez tripsina con la finalidad de romper las células de embriones de pollo, creando de esta manera el primer cultivo celular, conocido y funcional (Carrel, 1912).

A partir de los años 40, el descubrimiento de los primeros antibióticos fue clave para desarrollar y perfeccionar numerosas aplicaciones posteriores.

Actualmente, se entiende por cultivo de células de animales, al aislamiento de un tipo específico de células provenientes de tejidos u órganos, que son colocadas en un ambiente artificial que favorece su división, crecimiento, multiplicación y en algunos casos, diferenciación. Esta técnica ha permitido abordar novedosas temáticas tales como la actividad intracelular, los flujos metabólicos, las interacciones con el medio ambiente, las interacciones célula-célula, la genética y la generación de metabolitos de interés. A su vez, se ha aplicado en diversas disciplinas de las ciencias naturales, abarcando desde la biología celular, biología del desarrollo y la fisiología, entre otras (Santacruz Reyes y col., 2017).

Específicamente, los ensayos con células de mamíferos han desempeñado un importante papel en la determinación de la genotoxicidad potencial de los agentes químicos y físicos que rodean al hombre (Fenech, 2010).

### **13. Puesta a punto del diseño experimental**

En una primera instancia, y siguiendo los lineamientos de Fenech (2007), se aplicó la técnica de aislamiento de linfocitos con Hystopaque.

## ***Aislamiento de linfocitos***

### *Protocolo*

- La sangre se diluye en partes iguales con solución de Hanks en un tubo estéril.
- En otro tubo estéril se agrega 2,65 ml de ficoll y se incorpora la mezcla realizada en el paso anterior sin remover la interfaz que se genera.
- Se centrifuga a 1500 rpm por 30 minutos.
- Se aparta el plasma y se retira el anillo amarillo formado por los linfocitos en un nuevo tubo estéril (1 ml aproximadamente) tratando de no remover el ficoll.
- Se completa con 3 ml de solución de Hank, se resuspende y se centrifuga por 10 minutos a 1000 rpm.
- Se retira el sobrenadante, se agrega 2 ml de Hanks nuevamente, se resuspende y se centrifuga por 10 minutos a 700 rpm.
- Por último, a las células resultantes (1 ml), se les agrega 4 ml de plasma y se completa con 5 ml de medio HAM F12.
- La solución obtenida en el paso anterior, se distribuye en partes iguales según la cantidad de ensayos que presente el diseño experimental.

A partir de las pruebas iniciales, de la bibliografía consultada y, sobre todo, en base a las particularidades del micronutriente estudiado (hierro), se replanteó la utilidad del aislamiento de linfocitos. Al separar el plasma y el paquete eritrocitario, no se lograba reproducir fielmente el metabolismo del micronutriente de interés. Por otro lado, los linfocitos aislados, al ser tan pequeños, suelen formar cúmulos que son muy difíciles de disgregar, dificultando el análisis en el microscopio. Por los motivos anteriormente expuestos, se optó por continuar para el desarrollo metodológico de la tesis doctoral con cultivos de sangre entera, sin el aislamiento de los linfocitos.

Posteriormente, se realizaron sucesivos cultivos de prueba con el fin de evaluar el tiempo adecuado de cultivo. Para ello se utilizaron el índice mitótico (IM) y el índice de

división nuclear (IDN), este último a partir del ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).

Se probaron 6 tiempos de cultivos y las alternativas con y sin cambio de medio de cultivo:

- a) 7 días sin cambio de medio
- b) 9 días sin cambio de medio
- c) 15 días sin cambio de medio
- d) 7 días con 1 cambio de medio, al tercer día de iniciado
- e) 9 días con 2 cambios de medio, al tercer y al sexto día
- f) 15 días con 3 cambios de medio, al tercer, al sexto y al noveno día

Los cultivos de 9 y 15 días realizados inicialmente sin cambio del medio de cultivo fueron descartados, ya que favorecían la contaminación debido al tiempo transcurrido sin la renovación de los nutrientes y los antibióticos necesarios. Optar por cultivos de 48 o 72 horas, si bien implicaba un correcto crecimiento celular, no permitía apreciar y comparar el impacto acumulativo de la suplementación semanal vs. diaria.

En base a los resultados obtenidos (Capítulo VI. Hierro Fig. 10), se concluyó que el tiempo óptimo de cultivo fue de una semana. Se optó también por trabajar sin realizar cambios del medio de cultivo, dado que no se hallaron diferencias significativas en la viabilidad celular entre los cultivos a los que se les realizó dicho cambio y los que no. Esto se fundamenta en el hecho de que el propósito de la tesis fue evaluar el efecto crónico y acumulativo de la suplementación diaria con sulfato ferroso, y el cambio del medio de cultivo impedía analizar el efecto acumulativo. Si se hubiera optado por realizar los cambios, habría que haber repuesto todo el hierro suplementado previamente, generando un nuevo pico metabólico, distorsionando de esta manera los resultados. Si bien es cierto que el tiempo de cultivo es más extenso de lo habitual, pudiendo provocar cierto agotamiento de los nutrientes, es de resaltar que tanto los tratamientos como los controles se encuentran sometidos a la misma condición, permitiendo partir entonces de la misma base para todos los puntos experimentales. Tiempos superiores a una semana

sin cambio en el medio de cultivo, comprometerían sustancialmente la viabilidad celular y favorecerían la lisis de los glóbulos rojos y la contaminación de los cultivos.

Asimismo, se consideró apropiado no suplementar los cultivos con suero fetal bovino, dado que se desconoce la concentración de hierro en el mismo. De esta manera, se optó por la utilización de un medio de cultivo celular que no requiere la adición de suero (HAM F12/DMEM). Realizar cultivos de sangre entera permitió, a su vez, conservar el plasma propio de la sangre evitando la precipitación del hierro. Las proteínas del plasma están estrechamente involucradas en el proceso de solubilidad/degradación del hierro y son fundamentales para evitar la generación de productos insolubles como el  $\text{Fe}^{+3}$ , óxidos, carbonatos y/o fosfatos (Fagali y col., 2015).

#### **14. Cultivos de sangre entera**

Los cultivos de sangre entera, constituyen un modelo experimental ideal para evaluar deficiencias o excesos de micronutrientes sobre el daño genómico y la citotoxicidad, ya que se trata de muestras fáciles de obtener y cultivar. Además, dado que la sangre circula por todo el cuerpo, experimenta fluctuaciones constantes de las concentraciones de micronutrientes que pueden representar lo que ocurre en diferentes tejidos y, por lo tanto, puede integrar y permitir visualizar el impacto genómico de una nutrición subóptima en todo el cuerpo (Fenech, 2010).

Las muestras empleadas en este trabajo de tesis se obtuvieron del Banco de Sangre del Instituto de Hemoterapia de la ciudad de La Plata. Respecto al número de muestras, dado que las directrices para el ensayo CBMN (MacGregor y col., 1987) y el ensayo cometa (OECD, 2016), no establecen un número mínimo de donantes sanos para los protocolos *in vitro* y siendo cinco el número mínimo para los protocolos *in vivo*, se optó por trabajar con un pool génico (teniendo en cuenta grupo y factor sanguíneo) proveniente de 10 individuos de sexo femenino de entre 20 y 40 años de edad, para cada uno de los ensayos llevados a cabo.

*Protocolo*

- La sangre se recogió por punción venosa con jeringa heparinizada y se cultivó en frascos Falcon T-25 (Nunc, Denmark).
- Se utilizó como medio base al HAM F12/DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sin suero fetal bovino, con la adición de antibióticos (60UI de Penicilina y 50µg/ml de Estreptomicina) (Bagó Laboratorio, Buenos Aires, Argentina).
- La estimulación de los linfocitos se logró con 100 µg/ml de fitohemaglutinina (GibcoThermo Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina).
- Las muestras se cultivaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, durante 7 días (Fenech, 2007, 2010, 2014).

## **15. Diseño experimental**

### **15.1. Hierro**

Se establecieron 4 tratamientos:

1. Control negativo (CN): sin tratar.
2. Suplementación semanal (HS): 0,55 mg de sulfato ferroso (Ferdrómaco Pediátrico, laboratorios Andrómaco, Buenos Aires, Argentina).
3. Suplementación diaria (HD): 0,14 mg de sulfato ferroso (Ferdrómaco Pediátrico, laboratorios Andrómaco, Buenos Aires, Argentina).
4. Control positivo (CP): bleomicina/peróxido de hidrógeno/etanol (según la técnica).

La concentración para simular *in vitro* los efectos de la suplementación preventiva diaria (HD), se calculó utilizando los valores recomendados por la Sociedad Argentina de Pediatría (suplementación preventiva diaria: 1mg/kg/día) (Anexo 1) (Comité Nacional de Hematología, 2009). Para la suplementación preventiva semanal, en base a la bibliografía consultada, se optó por una dosis menor a la que implicaba 7 veces (7 días) la dosis diaria (suplementación preventiva semanal: 4mg/kg/semana). Las suplementaciones diaria y semanal no son equivalentes. Se espera que una suplementación semanal con una menor concentración de hierro, resulte igual de efectiva que la suplementación diaria, al

optimizar la absorción del hierro, y disminuya a su vez los efectos adversos del sulfato ferroso.

## **15.2. Hierro y vitamina E**

Se establecieron 8 puntos experimentales.

1. Control negativo (CN): sin tratar.
2. Control de vitamina E<sub>1</sub>: 8,3 µg/ml (C 8,3).
3. Control de vitamina E<sub>2</sub>: 16,6 µg/ml (C 16,6).
4. Suplementación hierro semanal y E<sub>1</sub>: 0,55 mg/ml + vitamina E 8,3 µg/ml (HS 8,3).
5. Suplementación hierro semanal y E<sub>2</sub>: 0,55 mg/ml + vitamina E 16,6 µg/ml (HS 16,6).
6. Suplementación hierro diario y E<sub>1</sub>: 0,14 mg/ml + vitamina E 8,3 µg/ml (HD 8,3).
7. Suplementación hierro diario y E<sub>2</sub>: 0,14 mg/ml + vitamina E 16,6 µg/ml (HD 16,6).
8. Control positivo (CP): peróxido de hidrógeno/etanol/bleomicina (según la técnica).

Se establecieron 2 concentraciones para la vitamina E (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), la más baja corresponde a la ingesta recomendada por día para niños (4 mg/día) y la más alta al doble de la misma, calculadas para 10 ml de medio de cultivo (vitamina E<sub>1</sub>: 8,3 µg/ml; vitamina E<sub>2</sub>: 16,6 µg/ml). La vitamina E fue previamente disuelta en etanol. Las concentraciones de hierro, se corresponden con las del primer diseño experimental.

## **16. Técnicas desarrolladas**

### **16.1. Cinética de proliferación celular**

#### **16.1.1. Índice mitótico**

A través del índice mitótico (IM) es posible evaluar la cinética de proliferación celular. Se calcula como el coeficiente entre el número de células que experimentan mitosis y el número total de células, de este modo permite cuantificar la división celular en ese cultivo. Esta técnica sólo se utilizó durante la puesta a punto del diseño experimental, para evaluar los tiempos adecuados de cultivo. Una vez ya establecido el diseño experimental

final, se realizaron técnicas específicas de viabilidad celular, estrés oxidativo y daño genómico.

#### *Protocolo*

- Dos horas antes de finalizar los cultivos se adiciona 100 µg/ml de colchicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para detener las células en metafase.
- Una vez transcurrido este tiempo se trasvasa el contenido del frasco a un tubo de centrifuga y se centrifuga por 10 minutos a 1000 rpm.
- Luego se saca el sobrenadante y se agrega suavemente solución hipotónica (KCl 0,075 molar) (Anexo 1).
- El tubo se deja en reposo en baño termostático por 20 minutos a 37°C.
- Se centrifuga nuevamente por 10 minutos a 1000 rpm y luego de sacar el sobrenadante se agrega suavemente el fijador Carnoy (metanol-acético 3:1).
- Se realizan dos cambios más de fijador en las condiciones especificadas en el paso inmediato anterior.
- Posteriormente se gotean los preparados según procedimiento estándar y se analizan con el microscopio óptico.
- El índice mitótico se establece contando el número de células en división en 1000 células.

## **16.2. Viabilidad**

### **16.2.1. MTT**

Se trata de un ensayo colorimétrico para evaluar la viabilidad celular. Bajo determinadas condiciones, la enzima NAD(P)H, puede reflejar la cantidad de células viables presentes: esta enzima es capaz de reducir el colorante *thiazolyl blue tetrazoliumbromide* MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo, a su forma reducida que es insoluble y se denomina formazán, la cual es de color

púrpura. Para la cuantificación, se suele adicionar un disolvente orgánico, como DMSO (dimetilsulfóxido) y se mide por espectrofotometría a 550 nm.

La actividad metabólica de las células incluye la de las enzimas deshidrogenasas. Se considera que la acción sobre el MTT, se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH), convertirán el MTT en su formazano. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular; y se utiliza también para medir citotoxicidad (pérdida de viabilidad celular) o actividad citostática (paso del estado proliferativo al de descanso) de agentes o sustancias potencialmente tóxicas. En el caso de esta técnica se usó como control positivo etanol 10% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

#### *Protocolo*

- Una vez realizado el cultivo se retiran los glóbulos rojos con un buffer de lisis ACK (Anexo 1 1).
- Se realizan dos lavados con PBS y el recuento celular en la cámara de Neubauer.
- Posteriormente se agregan 240 µl de la solución stock MTT (Anexo 1 1).
- Luego de las 3hs de incubación se agregan 100 µl del solvente de extracción (DMSO) por pocillo, se agita por 10 minutos, se centrifuga y se siembra la placa de 96 pocillos.
- Se procede con la lectura a 550 nm en un espectrofotómetro con lector de placas (Multiskan<sup>TM</sup>go- Termo Fisher Scientific).

#### *16.2.2. Rojo neutro (RN)*

Se desarrolló en base al protocolo inicialmente descrito por Borenfreund y Puerner (Borenfreund y Puerner, 1985). El colorante rojo neutro es captado y almacenado en el interior de las células, en los lisosomas y endosomas. Si la célula pierde viabilidad, esta sustancia se libera al medio pues sólo las células viables son capaces de retenerlo en su interior. Para evaluar la liberación de rojo neutro al medio de cultivo, se mide la

absorbancia en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad lisosomal. Al igual que para el ensayo MTT se utilizó como control positivo el etanol 10% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

#### *Protocolo*

- Una vez finalizado el cultivo de sangre se retiran los glóbulos rojos con un buffer de lisis ACK (Anexo 1).
- Se adiciona el RN durante 3 horas disuelto en PBS en una concentración final de 0,33% (3 h, 37°C) (Anexo 1).
- Finalizado el tiempo de incubación, se realiza un lavado con PBS.
- Posteriormente, se adicionan 100 µl de solución de extracción (Anexo 1) por pocillo.
- Por último, se realiza la lectura del sobrenadante utilizando un espectrofotómetro para la medición de la absorbancia a 550 nm (MultiskanTMgo- Termo Fisher Scientific).

#### *16.2.3. Hemotoxicidad*

La hemólisis es el proceso de destrucción de los hematíes, que conlleva la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición. Este ensayo colorimétrico, se basa en la detección por espectrofotometría del grado de lisis que sufren los glóbulos rojos (Mitarotonda, 2018). La determinación de la actividad hemolítica resulta de gran importancia para compuestos que son fuertes candidatos a nuevos fármacos que deban atravesar la membrana celular e interactuar con la hemoglobina (Martínez y col., 2013).

#### *Protocolo*

- Al término de los 7 días de cultivo, se trasvasa el material a un tubo de centrifuga y se centrifuga a 1200 rpm.
- Se conserva el sobrenadante y se descarta el precipitado.
- Se extraen 100 µl del mismo y se realiza la lectura a 540 nm en espectrofotómetro (MultiskanTMgo- Termo Fisher Scientific) para determinar el grado de hemólisis.

- El control positivo (100% de hemólisis), se obtiene del tratamiento de la sangre con Tritón al 1% y como control negativo se utiliza solución fisiológica.

### **16.3. Mediciones de hierro**

#### *16.3.1. Espectroscopia de absorción atómica por llama*

La espectroscopia atómica abarca un conjunto de técnicas basadas en la emisión, absorción y fluorescencia de la radiación producida por el vapor atómico. En la atomización por llama, la disolución acuosa de la muestra se dispersa o nebuliza como una fina nube, y luego se mezcla con el combustible gaseoso y oxidante para arrastrarla al mechero. Se utilizó espectroscopia de absorción atómica (AAS) para determinar los niveles de Fe en el medio de cultivo después de la suplementación. Esta técnica se utilizó para la primera etapa del diseño experimental.

Las muestras se diluyeron con ácido tricloroacético y se analizaron mediante AAS en el Instituto de Desarrollo e Investigaciones Pediátricas (IDIP), Profesor Fernando Viteri, del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sor María Ludovica” de La Plata.

#### *16.3.2. Contenido de hierro total en células*

Esta técnica permite evaluar la cantidad de hierro presente en las células, en este caso de linfocitos, una vez transcurrido el tiempo de cultivo y los tratamientos correspondientes (Fagali y col., 2015). Estas mediciones se llevaron a cabo en el laboratorio IMBioMat (Interacciones de medios biológicos y materiales) perteneciente al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas, INIFTA (CONICET-UNLP).

#### *Protocolo*

- Finalizado el tiempo de cultivo, se eliminan los glóbulos rojos con el buffer de ACK (Anexo 1).
- Se lavan bien las células con PBS, y se pasan a tubos de vidrio o Eppendorf, se centrifuga y descarta sobrenadante.
- Luego, se deja secar 48 hs a 80 °C. Cubrir los tubos con papel.

- Se agregan 500 µl de HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> 4 (1:1) para mineralizar dejando el tapón flojo hasta que la solución se torne transparente.
- La cuantificación se realiza con batofenantrolina (Anexo 1) a 535 nm.

### *16.3.3. Contenido de hierro en medio de cultivo*

Esta técnica permite evaluar cuanto hierro quedó en el medio de cultivo después del tratamiento realizado (Fagali y col., 2015). Estas mediciones también se llevaron a cabo en el laboratorio IMBioMat (Interacciones de medios biológicos y materiales) perteneciente al Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas, INIFTA (CONICET-UNLP).

#### *Protocolo*

- Se separa el medio de cultivo y homogeneiza bien.
- Luego se mezclan 100 µl de medio de cultivo con 100 µl de HCl 0,2 N (se solubiliza todo el Fe).
- Se agregan 400 µl de desferal 2 mM y 400 µl de buffer Tris.
- Se deja incubando a temperatura ambiente por 15 minutos.
- por último, se mide la absorción a 430 nm.

## **16.4. Estrés oxidativo**

### *16.4.1. T-BARS*

En lo que respecta al estrés oxidativo, la medición de la peroxidación lipídica de membrana se considera un indicador básico. El fundamento de esta técnica es hacer reaccionar el malonaldehído (MDA) presente en la muestra (producto secundario de la peroxidación lipídica) con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Este proceso, permite la formación de un aducto conocido como MDA-TBA. Este aducto expuesto a alta temperatura (95-100°C) y en un medio ácido, es medido colorimétricamente a 532 nm por espectrofotometría y su concentración es proporcional a la absorción registrada. Se utilizó el control positivo universal para las técnicas de estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno

(Cicarelli Laboratorios San Lorenzo- Santa Fe- Argentina). En la primera parte del diseño experimental los resultados se corresponden al análisis de la técnica en sobrenadante de cultivo, y en la segunda parte, la técnica se realizó en homogenado de linfocitos. Los resultados se analizaron por comparación con una curva de calibración propia en distintas concentraciones y se expresaron como nmoles de MDA/ml.

#### *Protocolo*

- Para la medición en sobrenadante, se trasvasa el cultivo a un tubo de centrifuga, se centrifuga a 12000 rpm y se utiliza directamente.
- Para la medición en homogenado, en primer lugar se lisan los glóbulos rojos con un buffer ACK (Anexo 1).
- Luego, los linfocitos se congelan y descongelan tres veces para romper las células mecánicamente.
- En un eppendorf se procede a colocar 50 µl de muestra, 100 µl de ácido tricloroacético (Anexo 1) y 50 µl de TBA (Anexo 1).
- Se agita cada tubo sobre un vórtex y se incuba en baño termostático 20 minutos a 95°C.
- Los tubos se enfrían y se centrifugan por 10 minutos a 4000 rpm.
- Se lee la absorbancia en espectrofotómetro a 532 nm (MultiskanTMgo- Thermo Fisher Scientific).

#### *16.4.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS)*

El uso de sondas fluorescentes permite la detección de ROS. La sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) es utilizada para detectar la presencia de especies reactivas del oxígeno producidas en el citoplasma y en diversas organelas. Se basa en la capacidad que tiene la DCFH-DA en fluorescer en presencia de radicales hidroxilo, peróxidos, etc. La intensidad de fluorescencia es proporcional a los niveles de especies oxidantes (Paraidathathu y col., 1992; Young y col., 2002). En este caso, se agregó un control antioxidante con N-Acetil Cisteína (NAC).

### *Protocolo*

- Finalizado el tiempo de cultivo se lisan los glóbulos rojos con un buffer de ACK (Anexo 1) y se lava el paquete celular restante con PBS.
- Se realiza el conteo con la cámara de Neubauer y se siembra una placa de 96 pocillo con 100 µl de suspensión celular y 100 µl de la diclorofluoresceína 10 µM (Anexo 1).
- Se incuba en oscuridad por 20-30 minutos a 37°C.
- Se procede a la lectura por fluorimetría donde la longitud de excitación es de 488 y de emisión de 535.
- Se utiliza el Nac (5 mM), (Anexo 1) un potente antioxidante, como control negativo; y peróxido de hidrógeno (1M), como control positivo.

#### *16.4.3. Lactato deshidrogenasa (LDH)*

La encima LDH se utiliza como indicador de disrupción y muerte celular. La misma cataliza la reacción reversible de lactato a piruvato, pudiendo utilizarse ambos compuestos como sustrato. Cuando ocurre la oxidación de lactato a piruvato se reduce el NAD a NADH.

La LDH se encuentra concentrada en el corazón, riñón, hígado, músculo y glóbulos rojos, entre otros. Cuando se realiza la evaluación en glóbulos rojos, se utiliza como un indicador de estado oxidante total. Se realizó con un kit de Wiener Laboratorios S.A.I.C. - Rosario - Argentina, adaptado para su realización en formato de placa de 96 pocillos.

### *Protocolo*

- La sangre se centrifuga a 700-1.000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Se elimina con pipeta la capa de plasma amarilla superior sin alterar la capa leucocitaria.
- Los eritrocitos se lisan mezclándolos con cuatro veces su volumen de agua de grado HPLC helada.
- Se centrifuga a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C.
- Luego, se recoge el sobrenadante (lisado de eritrocitos) y se congela a -80°C o se prosigue con la técnica.

- Se realiza una nueva dilución 1/10 en PBS y se toman 100 µl de esa muestra.
- Se reconstituye el vial de NADH con la solución buffer de Tris, pH 7,2 conteniendo el piruvato y cloruro de sodio.
- En una placa de 96 pocillos se agregan 100 µl de muestra previamente diluida (1/100) y 100 µl de reactivo.
- Se determina la concentración de LDH a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm.
- Se realizaron 40 mediciones cada 15 segundos.

#### 16.4.4. Enzimas Antioxidantes

##### 16.4.4.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Esta técnica resulta un método indirecto de evaluación del estrés oxidativo. La enzima superóxido dismutasa (SOD) es un potente antioxidante. Cataliza la dismutación del radical superóxido ( $O_2^-$ ) en oxígeno ( $O_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Se llevó a cabo mediante la utilización de dos kits comerciales:

1- *Ransod* (Randox Laboratories LHD, United Kingdom). Se siguió el protocolo como se especifica en la hoja técnica, adaptando el mismo a muestras de cultivo. Este kit se utilizó para la primera parte del diseño experimental para la comparación entre el hierro diario y semanal. Este método emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para generar radicales superóxido que reaccionan con cloruro de 2- (4-yodofenil) -3 - (4-nitrofenol) -5 - feniltetrazolio (INT) para formar el colorante rojo formazán. La actividad de superóxido dismutasa se mide luego por el grado de inhibición de esta reacción. Una unidad de SOD es la que provoca una inhibición del 50% de la tasa de reducción de INT en las condiciones del ensayo.

##### *Protocolo*

- La sangre entera se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos para separar el plasma con el medio de cultivo del paquete globular.

- Se toman 0,5 ml del paquete globular y se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 3000 rpm.
- Luego se lavan los eritrocitos cuatro veces con 3 ml de solución de NaCl al 0,9% centrifugando durante 10 minutos a 3000 rpm después de cada lavado.
- Se completa hasta 2,0 ml con agua fría redestilada, se mezcla y deja reposar a 4°C durante 15 minutos.
- El lisado se diluye con tampón fosfato 0,01 mol/l pH 7,0, de modo que el porcentaje de inhibición se sitúe entre 30 y 60%.
- Se recomienda una dilución de lisado de 25 veces para muestras humanas (factor de dilución final = 100).
- Se lee con lector de placa a 505 nm en cubeta de cuarzo.
- De manera paralela, se realiza una curva de calibración y una muestra control para lograr la confiabilidad de los resultados.

2- *Cayman* (Cayman Chemical, Michigan, USA). Se realizó el protocolo siguiendo las especificaciones exactas de la hoja técnica para muestras de eritrocitos. Este kit se utilizó para la segunda parte del diseño experimental (hierro y vitamina E).

El kit de ensayo de superóxido dismutasa de Cayman utiliza una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una unidad de SOD, se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir una dismutación del 50% del radical superóxido. Este ensayo de SOD mide los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD).

#### *Protocolo*

- La sangre se centrifuga a 700-1.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se elimina con pipeta la capa de plasma superior amarilla sin alterar la capa leucocitaria.
- Los eritrocitos se lisan suspendidos en cuatro veces su volumen de agua de grado HPLC helada.
- Se centrifuga a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C.

- Se recoge el sobrenadante (lisado de eritrocitos) y se congela a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- El lisado de eritrocitos debe diluirse 1:100 con tampón de muestra antes de analizar la actividad de SOD.
- Se agregan 200  $\mu\text{l}$  del detector de radicales diluido y 10  $\mu\text{l}$  de estándar (tubos A-G) por pocillo en los pocillos designados en la placa.
- Se adicionan 200  $\mu\text{l}$  del detector de radicales diluido y 10  $\mu\text{l}$  de muestra a los pocillos.
- Para iniciar la reacción hay que agregar, lo más rápido posible, 20  $\mu\text{l}$  de xantina oxidasa diluida a todos los pocillos. Se debe anotar la hora exacta de comienzo.
- Se agita con cuidado la placa de 96 pocillos durante unos segundos para mezclar cubriendo la placa con la tapa.
- La placa se incuba en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lee la absorbancia a 440-460 nm utilizando un lector de placas.

#### *16.4.4.2 Catalasa*

Esta técnica colorimétrica constituye un método directo de evaluación del estrés oxidativo. La catalasa pertenece al grupo de antioxidantes enzimáticos, la cual cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La actividad de la misma se determina observándose una disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno a 240 nm a tiempo cero y en el transcurso de cinco minutos. La lectura se realiza en un espectrofotómetro. Para la muestra blanco se utiliza buffer fosfato de sodio. Una unidad de enzima catalasa se define como 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno consumido por minuto.

#### *Protocolo*

- La sangre se centrifuga durante 10 minutos y se separa el plasma del paquete eritrocitario.
- Se lava con solución fisiológica, se centrifuga y se repite el procedimiento dos veces más. De ser necesario, se puede congelar el paquete eritrocitario a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Los eritrocitos se hemolizan con agua destilada empleando una dilución 1/20, se agita vigorosamente y se centrifuga durante 10 minutos.
- Se recolecta el sobrenadante y se diluye 1/100 con buffer fosfato de sodio 50 mM a pH 7.0.
- En la cubeta de cuarzo se colocan el buffer y la muestra y se homogeniza todo con la pipeta.
- Se adiciona el peróxido de hidrógeno y se vuelve a homogenizar.
- La absorbancia se lee en espectrofotómetro a 240 nm, a tiempo cero y luego de transcurridos 5 minutos.

## **16.5. Daño genético**

### **16.5.1. Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)**

La simplicidad de la técnica y la variedad de aplicaciones que posee el ensayo CBMN, tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes tipos celulares, lo convirtieron en una herramienta de suma utilidad para la evaluación de anomalías cromosómicas (Kirsch-Volders y col., 2003). Este ensayo ha sido recurrentemente utilizado para el estudio de la genotoxicidad causada por agentes químicos, físicos o biológicos (Fenech, 2007)

En 1976 el ensayo de micronúcleos fue propuesto por primera vez y desde entonces ha sufrido varias modificaciones, que le permitieron ampliar su campo de aplicabilidad. Una de las modificaciones más importantes fue la utilización, en bajas concentraciones, de la Citocalasina B producida por el hongo *Helminthosporium dematioideum*. La misma bloquea la citocinesis y la movilidad celular permitiendo obtener células binucleadas (BN) (Fenech y Morley, 1985a, 1985b). De esta manera, la utilización de la citocalasina permitió el análisis de aquellas células que hubieren sufrido la injuria a evaluar durante ese ciclo celular, evitando el conteo de aquellas células que se hallaran en interfase y que aún no se hubieran dividido. De este modo se logra una apreciación de la frecuencia real de daño inducido (Fenech, 2007).

Un micronúcleo (MNi) consiste básicamente en un fragmento acéntrico de un cromosoma o un cromosoma completo que no se ha distribuido adecuadamente en

ninguno de los dos núcleos hijos durante anafase (Fig. 7). De este modo, la técnica permite analizar procesos clastogénicos y/o aneugénicos, respectivamente (Fenech, 2010).

Asimismo, esta técnica permite realizar el conteo de los puentes nucleoplásmicos (NPBs) que se forman entre los núcleos de una célula BN, ya que proveen una medida de la frecuencia de rearrreglos cromosómicos (Umegaki y Fenech, 2000), producto de cromosomas dicéntricos que no se han separado correctamente en anafase (Fig. 7). Son utilizados como biomarcadores de reparación errónea del ADN y/o de fusiones teloméricas.

Con posterioridad al surgimiento de la técnica, se descubrió otro mecanismo de formación de MNi conocido como brote nuclear (NBUDs). Shimizu y colaboradores (1998; 2000) demostraron que la amplificación del ADN se localiza en sitios específicos de la periferia del núcleo y se elimina a través de brotes nucleares que forman los MNi durante la fase S del ciclo celular. Los NBUDs presentan una morfología semejante a los MNi, pero se encuentran unidos por un pedúnculo al núcleo celular (Lindberg y col., 2007) (Fig. 7).

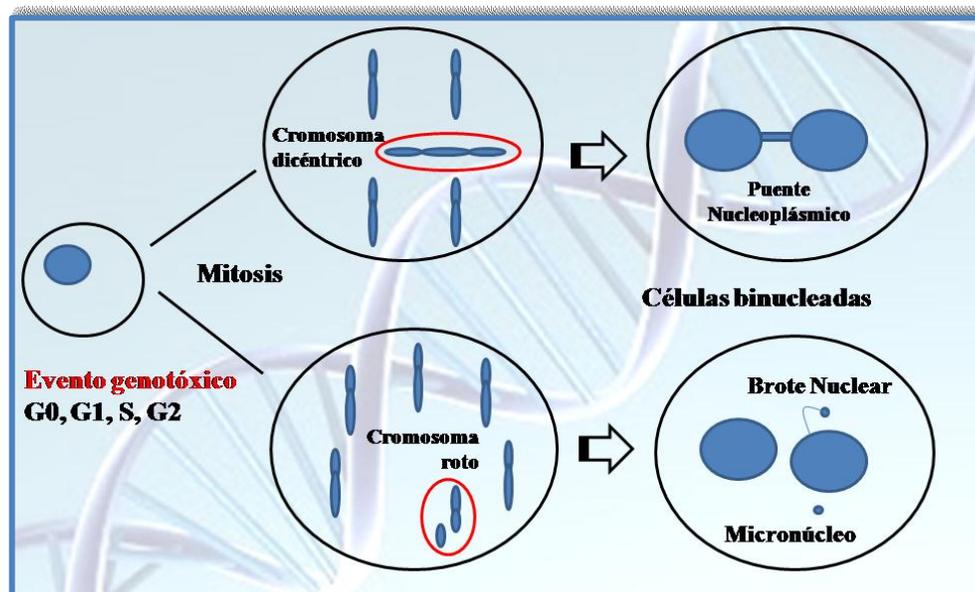


Figura 7. Evento genotóxico (Gambaro y col., 2018a).

Asimismo, para demostrar que la proliferación celular es suficiente para asegurar que la mayoría de las células contadas deriven de la primera o de la primera y segunda división luego del tratamiento, se debe calcular el índice de división nuclear (IDN).

$$\text{IDN} = 1 \times \text{no. de células mononucleadas} + 2 \times \text{no. de células binucleadas} + 3 \times \text{no. de células tri y tetranucleadas} / \text{no. total de células contadas (500)}.$$

### *Protocolo*

Se implementó de acuerdo al método de Fenech y Morley (1985b), con las modificaciones propuestas posteriormente por Fenech (2007).

- Aproximadamente 30 hs antes de terminar el cultivo de sangre, se adicionan 100 µl de citocalasina B (3 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Finalizado el tiempo de cultivo se trasvasa el contenido del frasco a un tubo Falcon con el cual se centrifuga por 10 minutos a 1200 rpm.
- Se saca el sobrenadante, se agrega suavemente solución hipotónica fría (ClK 0,075 molar) y se centrifuga nuevamente por 6 minutos a 1200 rpm.
- Se saca nuevamente el sobrenadante y se agrega el fijador I (cloruro de sodio-metanol-acético 6:5:1).
- Se realizan dos cambios más con fijador II (metanol-acético 5:1), previa centrifugación por 10 minutos a 1200 rpm.
- Luego de 24 hs de reposo en heladera, se procede al goteo de material en portaobjetos.
- Los preparados se tiñen con colorante Giemsa durante 10 minutos.
- Se analizan 1000 células por punto experimental, de acuerdo a los criterios de Fenech, con microscopio óptico con objetivo de magnitud de 40x (Fenech, 2007).

Para realizar la clasificación de las células se siguieron los criterios establecidos por Fenech (2007), según se detalla a continuación.

✓ Células binucleadas (CB): corresponde a aquellas células detenidas en citocinesis, con dos núcleos principales, que no poseen daño en el material genético (Fig. 8a).

- ✓ Células binucleadas con micronúcleos (MNi): son aquellas células que poseen núcleos pequeños además de ambos núcleos principales (Fig. 8b).
- ✓ Células binucleadas con puentes nucleoplásmicos (NPBs): células con puentes nucleoplásmicos entre ambos núcleos principales (Fig. 8c).
- ✓ Células binucleadas con brotes nucleares (NBUDs): presencia de brotes de cromatina unidos a alguno de los núcleos principales por un pedúnculo (Fig. 8d).

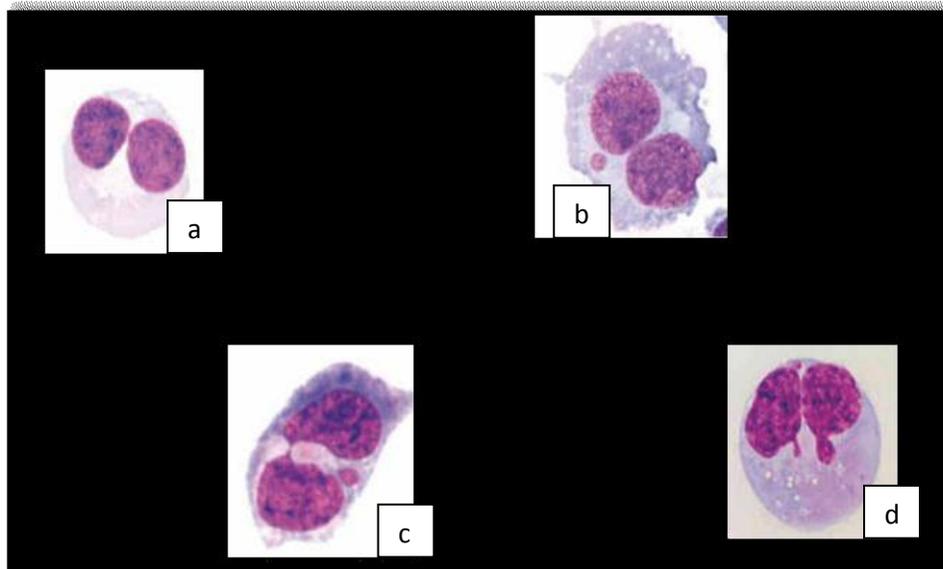


Figura 8. Clasificación de las células para el ensayo CBMN (Fenech, 2007).

#### 16.5.2. Electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa)

El ensayo cometa (EC), conocido también como electroforesis de células aisladas constituye uno de los principales métodos para estimar el daño en el ADN, tanto en biomonitorio poblacional y en pruebas de genotoxicidad, como en investigaciones relacionadas al daño y reparación en el ADN (Collins, 2004).

Este ensayo consiste en someter a electroforesis a una muestra de células previamente embebida en agarosa, colocada sobre un portaobjetos y lisada en una solución conteniendo el detergente tritón X-100. La electroforesis produce la migración del ADN nuclear de cada célula a lo largo del campo eléctrico, en forma proporcional a la cantidad de daño presente. De esta manera, su nombre se debe a la imagen que se

obtiene luego de la corrida electroforética, la cual se asemeja a un “cometa” formado por una *cabeza*, cuyo componente principal es el ADN nuclear intacto, y una *cola*, constituida por los fragmentos del ADN dañado.

Tanto Singh y colaboradores (1988) como Olive (1999) propusieron, de manera independiente, desarrollar la lisis celular a un pH elevado. La utilización de soluciones alcalinas permitió la formación de colas de cometas más pronunciadas, extendiendo el rango de daño que puede ser detectado (Collins y col., 2001). En la actualidad, la versión del ensayo más utilizada para identificar los efectos de los agentes genotóxicos, es la versión alcalina (pH>13) y resulta fundamental para la visualización de los fragmentos generados por la ruptura de una o ambas hebras del ADN. Esta versión es capaz de detectar rupturas de simple y doble cadena en el ADN, sitios lábiles al álcali (como por ejemplo sitiosapurínicos), entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas, y rupturas de cadena simple asociadas a la escisión incompleta de sitios de reparación (Choucroun y col., 2001).

Los fragmentos de ADN, son liberados durante la exposición a la solución de lisis y migran como consecuencia de la electroforesis (Choucroun y col., 2001). Dada su carga negativa, tenderán a desplazarse a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico. La distancia de migración de los fragmentos de ADN dependerá directamente del tamaño de los mismos. Es importante destacar que las lesiones en el ADN, resultantes en ruptura de cadena, incrementan la migración del ADN en el gel de agarosa, mientras que los enlaces cruzados de ADN-ADN y ADN-proteína resultan en un retraso en la migración comparado con sus correspondientes controles (Tice y col., 2000). Así, se asume que a mayor cantidad de rupturas se corresponde una mayor cantidad de fragmentos de bajo peso molecular aumentando la cola del cometa y, por ende, sus parámetros.

Las principales ventajas de este ensayo incluyen: a) la obtención de datos al nivel de células individuales, permitiendo posteriormente realizar análisis estadísticos robustos; b) la necesidad de obtener pocas células por punto experimental; c) la sensibilidad para detectar el ADN dañado; d) su utilización con cualquier tipo celular eucariota, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

### *Protocolo*

Se implementó de acuerdo al método de Singh y colaboradores (1988), con algunas modificaciones menores. El protocolo se desarrolló de la siguiente manera:

- Se toman 30  $\mu$ l de solución celular y se suspenden en 170  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) (Anexo 1)
- Se siembran 2 portaobjetos, previamente tratados con 100  $\mu$ l de agarosa de punto de fusión normal (APFN) (Anexo 1).
- Las muestras se cubren con un cubreobjetos y se mantienen a 4°C durante 10 minutos.
- Posteriormente se retiran los cubreobjetos y se conservan los preparados en solución de lisis durante 2 hs a 4°C (Anexo 1).
- A continuación, los portaobjetos se transfieren a la cuba de electroforesis horizontal cubiertos con solución buffer pH>13 durante 20 minutos a 4°C (Anexo 1).
- La corrida electroforética se realiza bajo las siguientes condiciones: 20 voltios, 200 mA durante 20 minutos a 4°C.
- Una vez completada la corrida electroforética, se neutraliza el pH de las muestras por medio de tres lavados con Tris-Cl a temperatura ambiente (Anexo 1).
- Para la visualización de las muestras los portaobjetos se tiñen con 20  $\mu$ l de colorante Syber Green 1 (Anexo 1).
- Por último, se realiza el análisis al microscopio de fluorescencia con un objetivo 40x.

Se utilizó un microscopio Olympus modelo BX 40 equipado con un cubo de fluorescencia Olympus modelo U-MNB con filtro de excitación de 470-490 nm y de emisión de 520 nm de longitud de onda.

Todo el protocolo se realiza en oscuridad, para evitar el daño que podría causar la luz sobre el material genético.

### *Análisis de las imágenes*

Se realizaron 2 preparados por punto experimental y se analizaron al azar 100 imágenes por cada uno. A cada una de ellas, se le asignó un valor entre 0 a 4, de acuerdo

con el nivel de daño observado, siguiendo los criterios de Collins (2004) detallados a continuación.

- a. Grado 0: células sin daño en el ADN. La totalidad del ADN se encuentra en la cabeza del cometa (Fig. 9a).
- b. Grado 1: células con daño leve en su ADN. La mayor parte del ADN se encuentra en la cabeza del cometa y pocos fragmentos en su cola (Fig. 9b).
- c. Grado 2: células con daño intermedio en su ADN. La mayor parte del ADN se encuentra en la cabeza y varios fragmentos en la cola del cometa (Fig. 9c).
- d. Grado 3: células con daño severo en su ADN. La menor parte del ADN se encuentra en la cabeza y muchos fragmentos en la cola del cometa (Fig. 9d).
- e. Grado 4: células con daño grave en su ADN. La cabeza del cometa prácticamente desaparece de la imagen, ya que casi la totalidad del ADN se encuentra formando su cola (Fig. 9e).

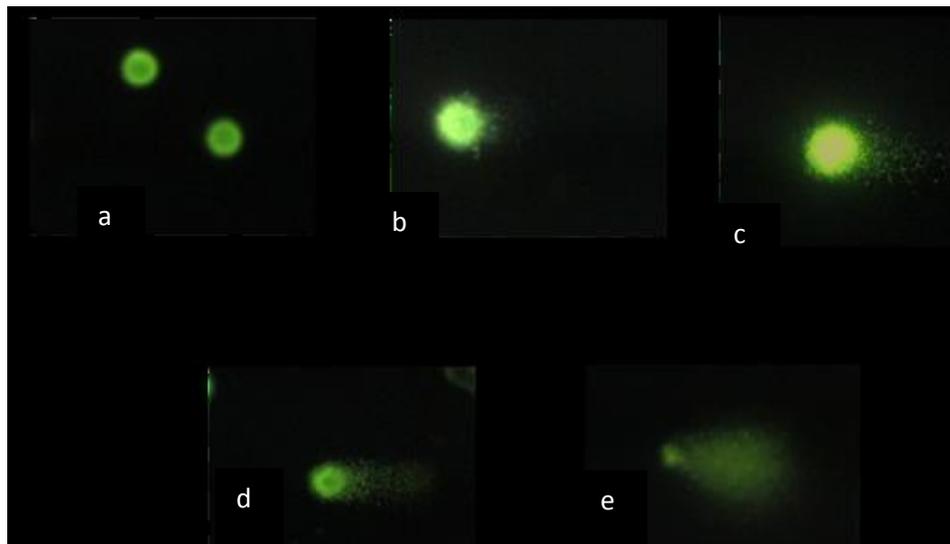


Figura 9. Clasificación de los niveles de daño citomolecular (Collins, 2004).

De este modo, el puntaje total obtenido para cada gel podría oscilar entre 0 “unidades arbitrarias”, cuando todas las células analizadas se encuentran sin daño; y 400 “unidades arbitrarias”, cuando todas las células analizadas tienen el mayor de los daños.

En base a esta clasificación, se estableció para cada uno de los geles un índice de daño genético (ID), según la siguiente fórmula (Collins, 2004).

$$ID = \frac{(1 \times NG1 + 2 \times NG2 + 3 \times NG3 + 4 \times NG4) \times 100}{\text{Total de células analizadas}}$$

### 16.6. Resumen técnicas

En la Tabla 3, se realiza un resumen de las técnicas utilizadas para cada uno de los dos modelos analizados (hierro; hierro y vitamina E).

Técnicas	Hierro	Hierro y vitamina E
IM	✓	
MTT	✓	✓
RN	✓	✓
Hemólisis		✓
Hierro/Absorción Atómica	✓	
Hierro Medio de Cultivo	✓	✓
Hierro Celular	✓	✓
T-BARS	✓	✓
ROS		✓
LDH		✓
SOD	✓	✓
Catalasa	✓	✓
CBMN	✓	✓

Ensayo cometa	✓	✓
---------------	---	---

Tabla 3. Resumen de técnicas aplicadas a cada diseño experimental.

## 17. Análisis estadístico

Para cada ensayo, se realizaron 3 experimentos independientes los cuales se representaron con la media  $\pm$  desvío estándar. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA simple) para aquellas variables normalmente distribuidas. Cuando las diferencias resultaron significativas, se realizó la prueba de contraste de múltiples rangos. A partir de esta prueba a cada tratamiento se le adiciona una letra, donde los grupos que no comparten la misma son significativamente diferentes entre sí. Para las variables que no presentaron una distribución normal, se realizó el análisis de Kruskal Wallis. El análisis de datos se llevó a cabo a través del programa estadístico Statgraphics® 5.1 software (Manugistics Inc., Rockville, MD) y se consideró  $P < 0,05$  estadísticamente significativo.

## CAPÍTULO VI. RESULTADOS y ANÁLISIS: HIERRO

### 18. Resultados de la puesta a punto del diseño experimental

Como fue explicado en el apartado de Métodos y Técnicas, para poder tomar una decisión acerca del diseño experimental y definir el tiempo óptimo de cultivo, se comenzó evaluando el índice mitótico (IM) y el índice de división nuclear (IDN).

#### 18.1. Índice mitótico e índice de división nuclear

Los resultados encontrados para IM e IDN se muestran en la tabla 4 y en la figura 10. Las diferentes combinaciones analizadas para establecer el tiempo de cultivo presentaron una eficiencia similar. Cuando se analizaron estadísticamente los datos, a través del ensayo de ANOVA simple, no se observaron diferencias significativas en relación a los distintos tiempos de cultivos (IM  $F= 6,24$   $p= 0,0546$  y IDN  $F= 0,08$   $p= 0,9648$ ). Debido a ello, se decidió llevar a cabo el diseño experimental mediante la realización de cultivos de siete días de duración sin cambios en el medio de cultivo, por los motivos explicados en la metodología.

<b>Tiempo de Cultivo</b>	<b>IM (‰)</b>	<b>IDN</b>
<b>7 días s/ cambio</b>	1,25 (0,07)	1,198 (0,003)
<b>7 días 1 cambio</b>	1,35 (0,07)	1,198 (0,001)
<b>9 días 2 cambios</b>	1,05 (0,07)	1,197 (0,019)
<b>15 días 3 cambios</b>	1,3 (0,14)	1,194 (0,002)

Tabla 4. Valores de IM e IDN en sangre entera para distintos tiempos de cultivo. IM  $p= 0,0546$  y IDN  $p= 0,9648$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

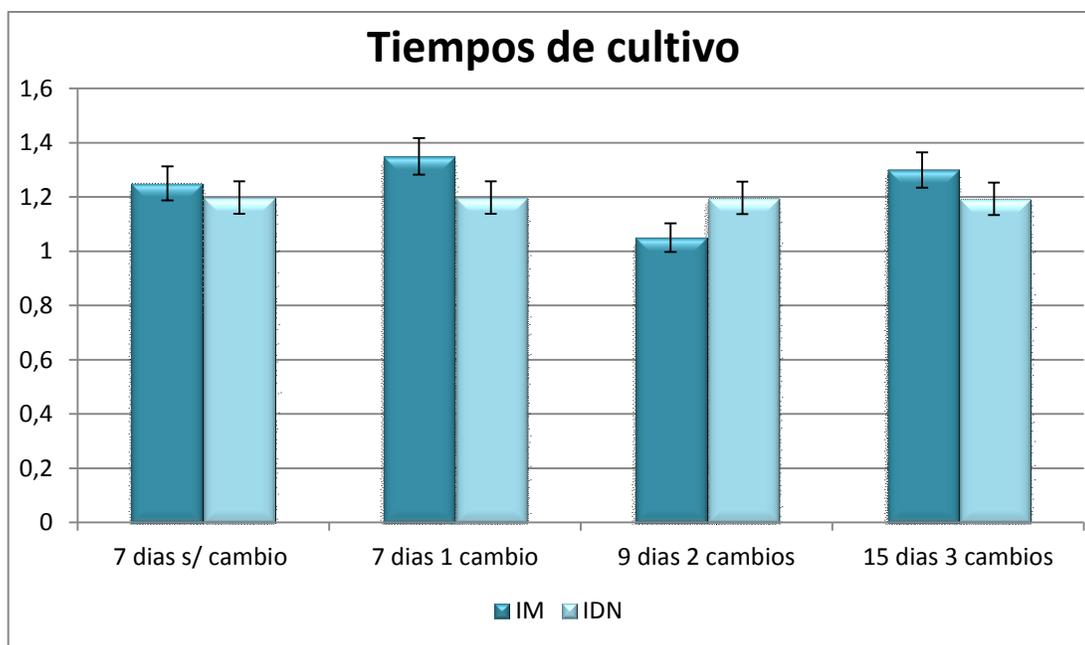


Figura 10. Viabilidad en diferentes tiempos de cultivo en sangre entera. IM (%) e IDN. IM  $F= 6,24$   $p= 0,0546$  y IDN  $F= 0,08$   $p= 0,9648$ .

## 19. Resultados hierro

### 19.1. Cinética de proliferación celular

#### 19.1.1. Índice mitótico (IM)

En lo que respecta al IM, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre puntos experimentales con la prueba de ANOVA simple ( $F= 41,18$ ;  $p= 0,0000$ ). A su vez, se efectuó un análisis por contraste de múltiples rangos, en donde se detectaron tres grupos homogéneos: a) HS; b) HD y CN; c) CP (Fig. 11). La suplementación con hierro semanal presentó un IM significativamente más elevado que con hierro diario (Tabla 5).

Cultivos	Índice mitótico (IM) (‰)
CN	1,53 (0,28)
HS	2,03 (0,25)
HD	1,33 (0,23)
CP	0,66 (0,19)

Tabla 5. Ensayo IM. ANOVA simple ( $p=0,0000$ ). Los valores están expresados cada 1000 células y corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

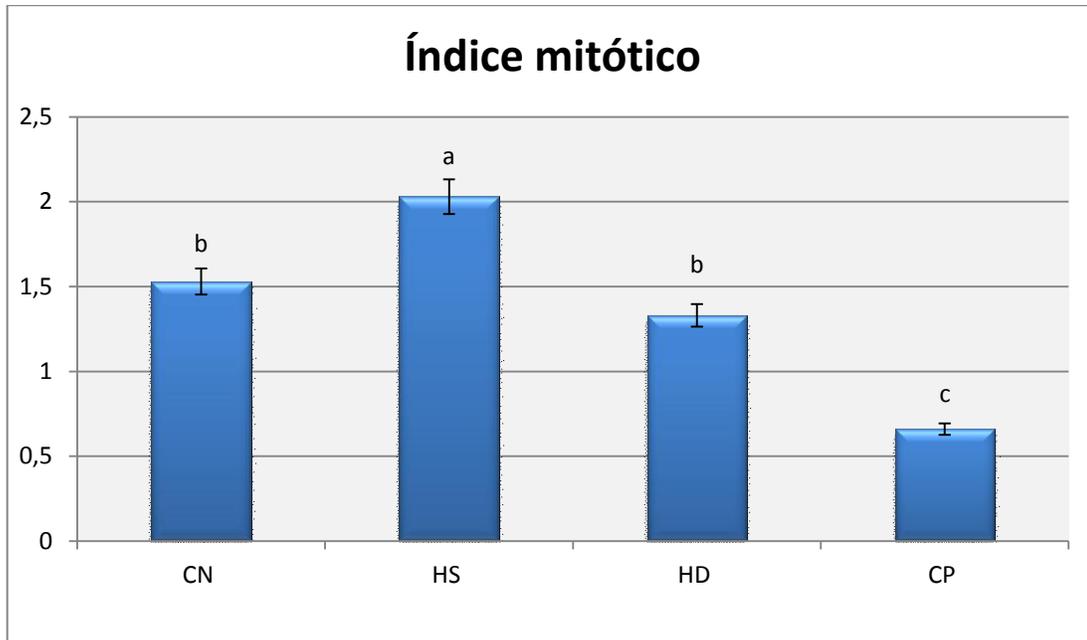


Figura 11. Ensayo IM. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ( $p=0,0000$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

## 19.2. Viabilidad celular

### 19.2.1. MTT

En la tabla 6 y la figura 12, se expresan los resultados obtenidos con el ensayo MTT. Como la distribución de los datos no fue normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de los resultados y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas suplementaciones ( $P < 0,01$ ). Los grupos que presentaron mayor viabilidad celular fueron el CN y el HS. Al realizar la comparación de a pares, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre: CN y HD; CN y HS; CN y CP ( $P < 0,01$ ); HD y HS ( $P < 0,05$ ).

Cultivos	MTT (%)
CN	98 (1)
HS	68 (5)
HD	62 (7)
CP	40 (6)

Tabla 6. Ensayo MTT. Porcentaje de viabilidad. Kruskal Wallis ( $P < 0,01$ ). Los valores se corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

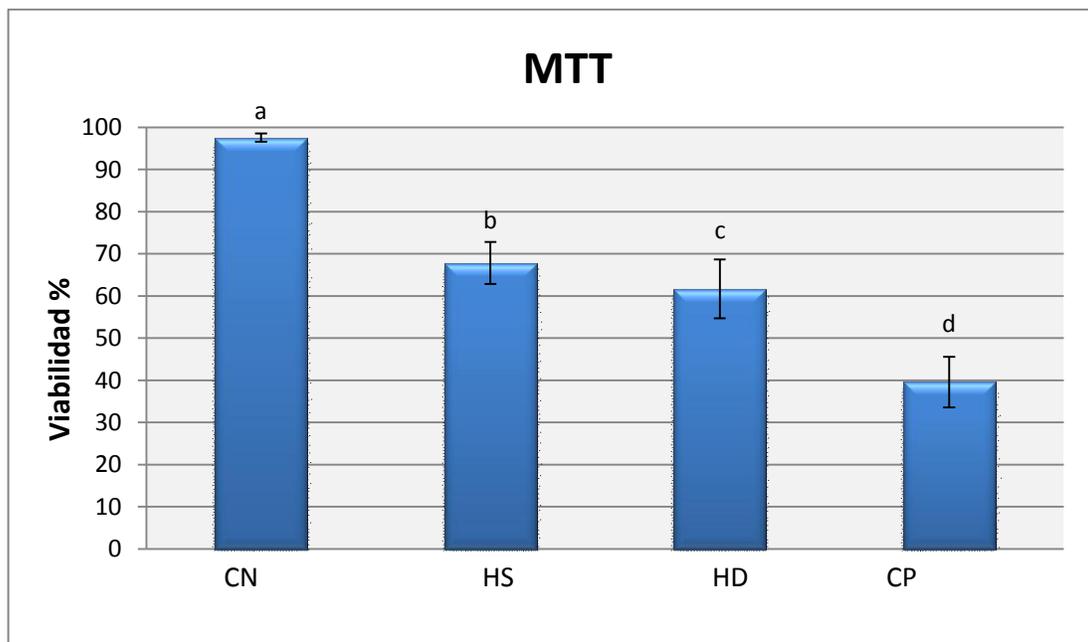


Figura 12. Ensayo MTT. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (Kruskal Wallis  $P < 0,01$ ). Los valores se corresponden a los porcentajes y las barras al desvío estándar.

### 19.2.2. Rojo neutro (RN)

En la tabla 7 y la figura 13, se presentan los resultados del ensayo de RN. Debido a que los datos estaban normalmente distribuidos, se realizó un análisis de ANOVA simple, que permitió observar diferencias estadísticamente significativas entre los puntos experimentales ( $P < 0,01$ ). Al igual que en el MTT, la mayor viabilidad se observó en el CN y

HS. El contraste por múltiples rangos, evidenció tres grupos definidos entre los tratamientos: a) CN, b) HD y HS, c) CP.

Cultivos	RN (%)
CN	100 (10)
HS	95 (4)
HD	92 (7)
CP	46 (2)

Tabla 7. Ensayo Rojo Neutro. Porcentaje de viabilidad. ANOVA simple ( $P < 0,01$ ). Los valores se corresponden a los promedios de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

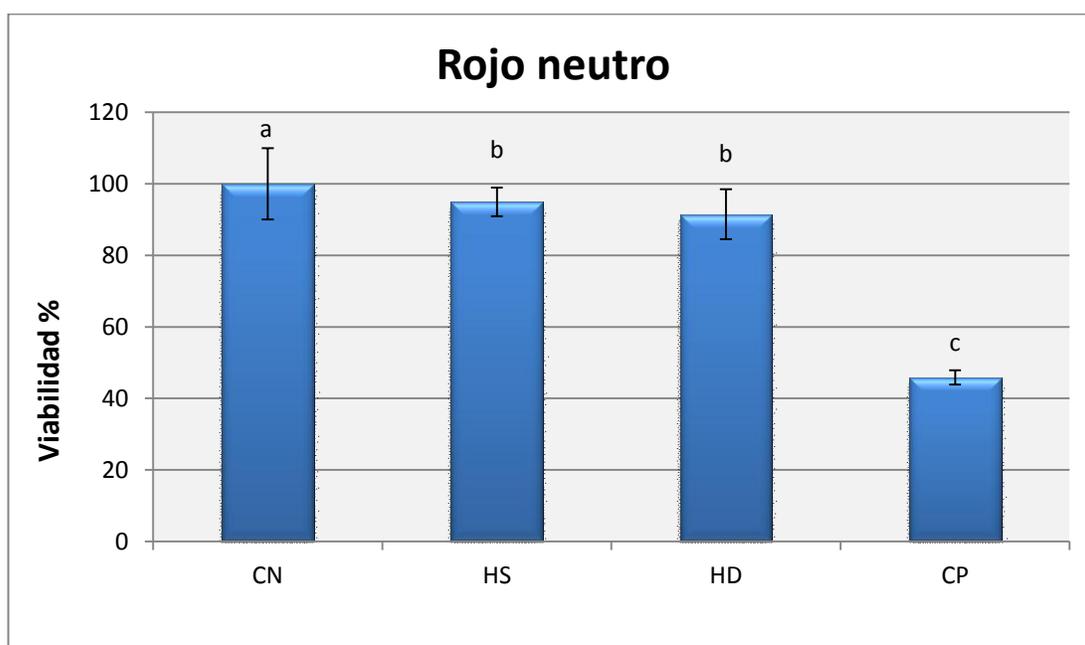


Figura 13. Ensayo RN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,01$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

### 19.2.3. Índice de división nuclear (IDN)

En la tabla 8 y la figura 14, se muestran los valores del IDN establecidos a través del ensayo CBMN. Se observó una disminución del mismo en los cultivos HD, HS y CP. El IDN más elevado se encontró en los cultivos correspondientes al CN. A partir del ensayo de ANOVA simple, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P < 0,0001$ ). El análisis por contraste de múltiples rangos, permitió visualizar tres grupos homogéneos: a) CN, b) HD y HS y c) HD y CP. La suplementación con hierro semanal presentó un IDN ligeramente superior al diario.

Cultivos	IDN
CN	1,21 (0,004)
HS	1,1805 (0,007)
HD	1,17 (0,007)
CP	1,162 (0,014)

Tabla 8. IDN a partir del Ensayo CBMN. ANOVA simple  $P < 0,0001$ . Los valores se corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

..

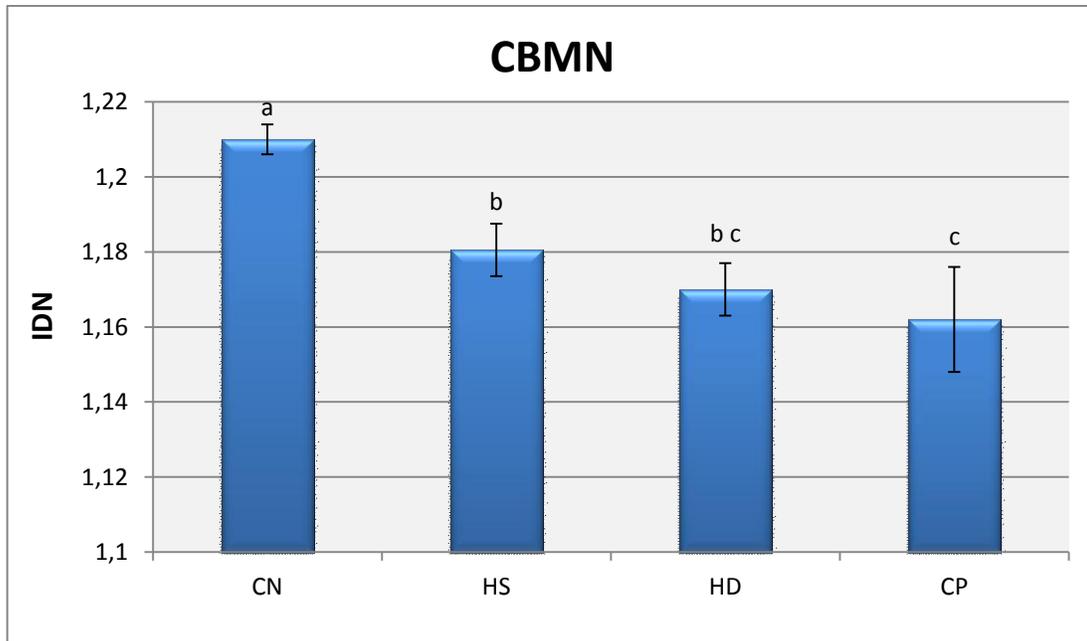


Figura 14. IDN, Ensayo CBMN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,0001$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 19.2.4. Resumen de las técnicas de viabilidad celular

En la tabla 9, se presentan los datos resumidos de las técnicas de viabilidad celular analizadas (IM, MTT, RN e IDN), comparando específicamente ambas formas de administración del sulfato ferroso (HS vs. HD). Se puede observar que en todos los casos la suplementación semanal presenta una mayor viabilidad que la diaria.

Técnica	IM	MTT	RN	IDN
Comparación	HS >* HD	HS >* HD	HS > HD	HS > HD

Tabla 9. Cuadro comparativo técnicas de viabilidad celular para ambos tipos de suplementación. HS: Hierro Semanal, HD: Hierro Diario, <: tendencia no significativa, <\* tendencia estadísticamente significativa.

### 19.3. Mediciones de hierro

La cuantificación de hierro por espectroscopia de absorción atómica evaluada al término de la suplementación en el sobrenadante de cultivo, arrojó para ambos controles (CN y CP) valores similares a los blancos (agua), esta cantidad varía entre 0,5 y 2  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 10). En el HD se encontró una concentración de 12,4  $\mu\text{g/ml}$  de hierro y en el HS 7,3  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 10). La diferencia entre ambos tipos de suplementación resultó estadísticamente significativa ( $p= 0,003$ ). Estos resultados son similares a los obtenidos por espectrofotometría por medio de la técnica colorimétrica con desferal (Figura 15). En el caso de los suplementos se observaron valores similares, en el HD 13,9  $\mu\text{g/ml}$  de hierro y en el HS 8,3  $\mu\text{g/ml}$ . Para esta técnica, la diferencia entre ambos tipos de suplementación (diaria vs. semanal) también resultó estadísticamente significativa ( $p= 0,002$ ). Lamentablemente, los valores de hierro de ambos controles se encontraron por debajo del límite de detección, por lo cual no pudieron determinarse (n.d.).

Cultivos	Absorción atómica	Colorimetría
CN	2 (0,1)	n.d.
HS	7,3 (0,3)	8,3 (0,4)
HD	12,4 (0,4)	13,9 (0,6)
CP	2 (0,2)	n.d.

Tabla 10. Mediciones de hierro por absorción atómica (HS vs. HD ANOVA simple  $p= 0,003$ ) y colorimetría (HS vs. HD ANOVA simple  $p= 0,002$ ). Los valores están expresados en  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores se corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

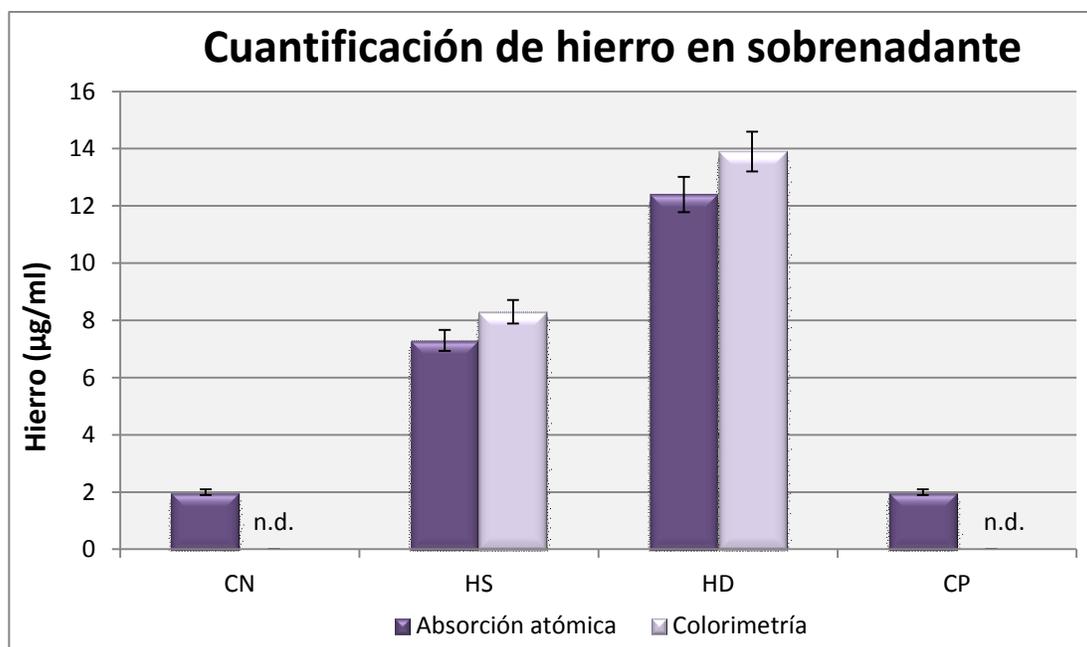


Figura 15. Comparación de la medición de hierro ( $\mu\text{g/ml}$ ) en sobrenadante de medio de cultivo por absorción atómica (HS vs. HD ANOVA simple  $p=0,003$ ) y por colorimetría (HS vs. HD ANOVA simple  $p=0,002$ ).

#### 19.4. Estrés oxidativo

##### 19.4.1. T-BARS

La peroxidación lipídica fue analizada a partir del ensayo de T-BARS (Tabla 11, Fig. 16). Los valores se estimaron en el sobrenadante del medio de cultivo. Se realizó la prueba de ANOVA simple y las diferencias entre los puntos experimentales resultaron estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ). La mayor peroxidación lipídica se observó en el CP, seguido por el HD. Se analizó por contraste de múltiples rangos y se distinguieron 3 grupos: a) CN y HS; b) HS y HD; c) HD y CP. La suplementación HS presentó una menor peroxidación lipídica que la HD.

Cultivos	T-BARS (nmol MDA/ml)
CN	35 (0,7)
HS	37 (5,9)
HD	42 (3,5)
CP	80 (2,6)

Tabla 11. Ensayo T-BARS. Valores de peroxidación lipídica. ANOVA simple  $P < 0,001$ . Los valores se corresponden a los promedios de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

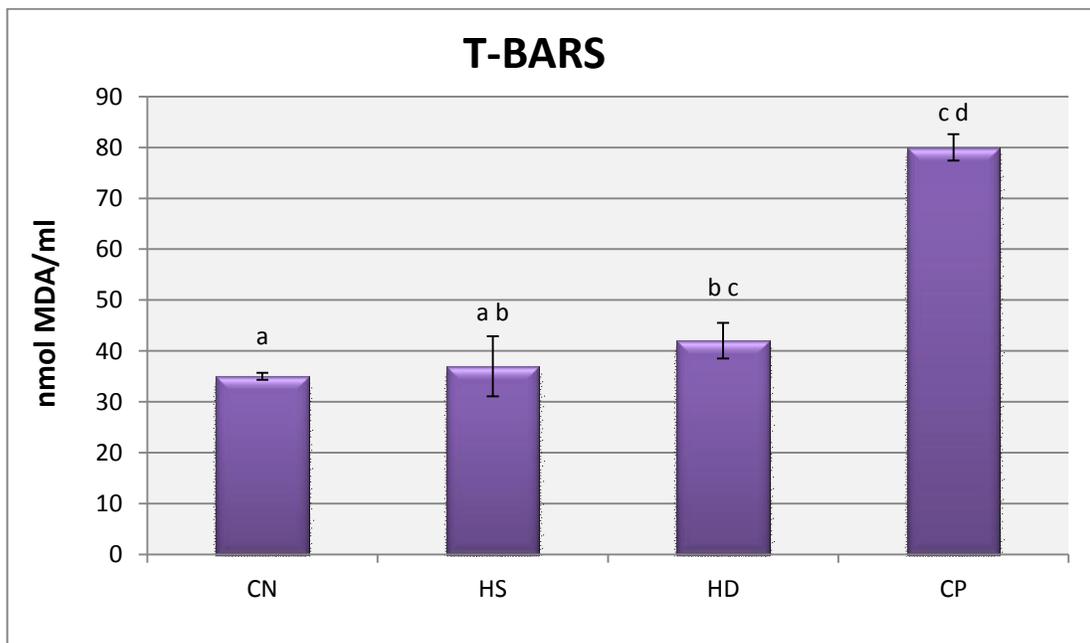


Figura 16. Ensayo T-BARS. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,001$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 19.4.2. Enzimas antioxidantes

En lo que respecta a la evaluación de la respuesta enzimática antioxidante del sistema *in vitro*, se realizaron los ensayos de SOD (Tabla 12, Fig. 17) y catalasa (Tabla 13, Fig. 18). Para ambas técnicas el HS tuvo la menor respuesta enzimática antioxidante.

#### 19.4.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

En el ensayo SOD, los resultados obtenidos fueron comparados a través de la prueba de ANOVA simple, la cual arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). En el contraste de múltiples rangos se distinguen tres grupos homogéneos: a) HS y CN; b) CN y HD; c) CP. La suplementación HS presentó el índice más bajo de USOD/ml.

Cultivos	SOD (USOD/ml)
CN	287,88 (57)
HS	224,81 (42)
HD	323,84 (41)
CP	413,85 (40)

Tabla 12. Ensayo SOD. ANOVA simple ( $P < 0,05$ ). Los valores corresponden a los promedios de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

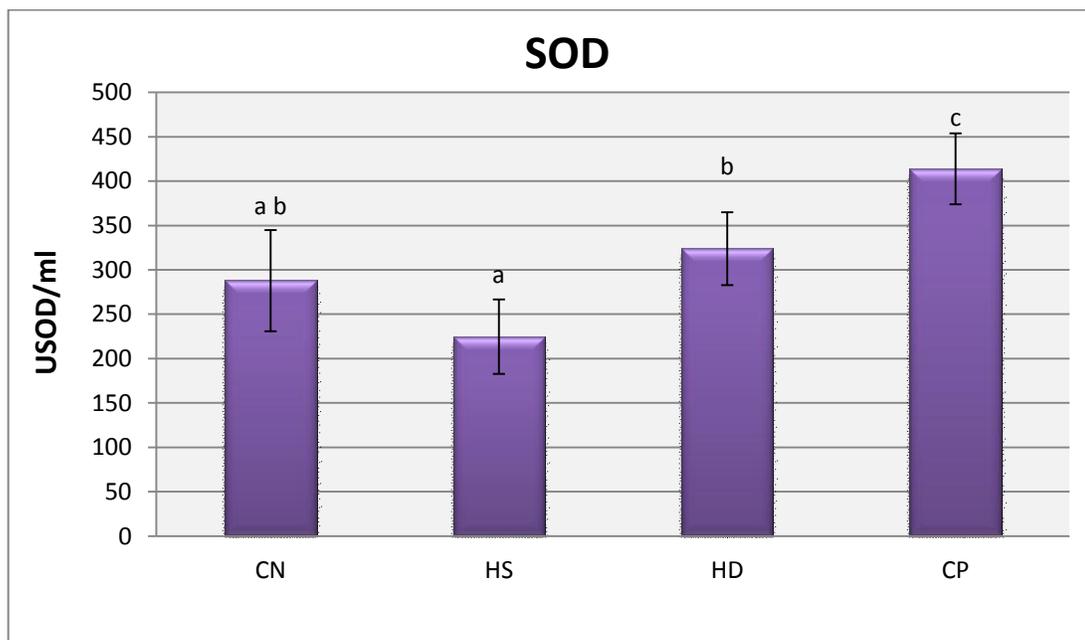


Figura 17. Ensayo SOD. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,05$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 19.4.2.2. Catalasa

Para catalasa las diferencias entre los puntos experimentales, analizadas a través de la prueba de ANOVA simple, también resultaron estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Posteriormente, se realizó el análisis por contraste de múltiples rangos y se observaron tres grupos: a) CN y HS, b) CN y HD y, por último, c) CP. La suplementación HS presentó los menores valores expresados en U catalasa/ml de eritrocitos.

Cultivos	Cat (UCatalasa/ml)
CN	49137 (1630)
HS	39526 (6057)
HD	51801 (9526)
CP	85821 (1630)

Tabla 13. Ensayo Catalasa. ANOVA simple  $P < 0,001$ . Los valores corresponden a los promedios de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

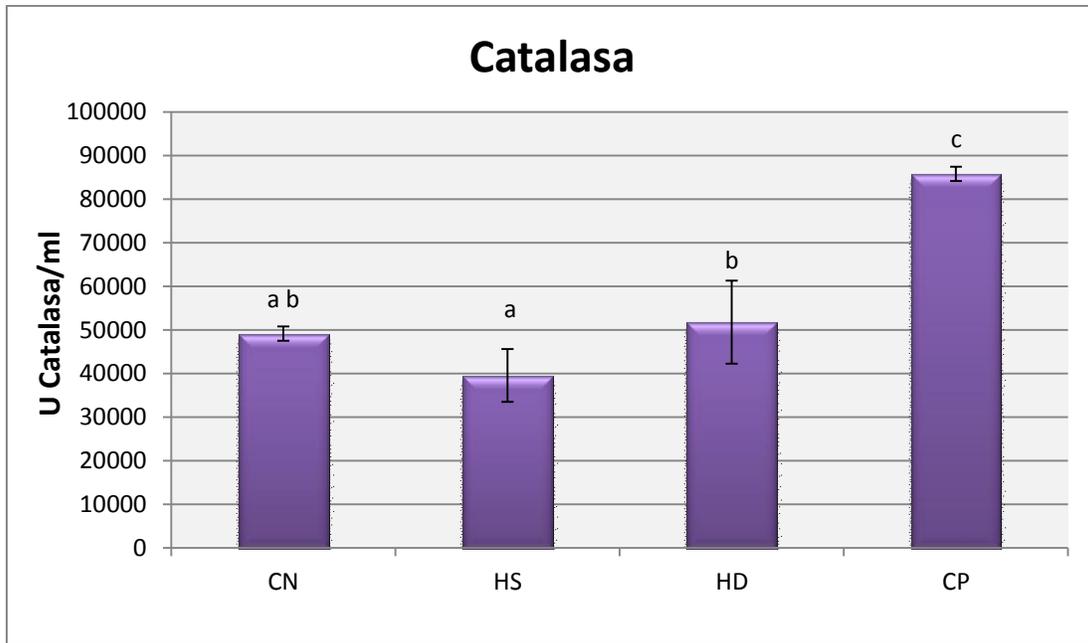


Figura 18. Ensayo Catalasa. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,001$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

## 19.5. Daño genético

### 19.5.1. Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)

Para valorar el daño cromosómico, se contabilizó la frecuencia de MNi, NPBs y NBUDs en 1.000 células binucleadas (Tabla 14).

Cultivos	MNi ‰	NPBs ‰	NBUDs ‰
<b>CN</b>	0,98 (3,7)	0,05 (0,6)	0 (0,0)
<b>HS</b>	1,15 (3,41)	0,13 (0,9)	0 (0,0)
<b>HD</b>	1,95 (3,10)	0,2 (0,8)	0,025 (0,5)
<b>CP</b>	3,03 (4,0)	0,3 (1,6)	0,15 (1)

*Tabla 14. Ensayo CBMN. Los valores corresponden a las frecuencias en 1000 células y entre paréntesis se indica el desvío estándar.*

Las mayores frecuencias de MNi se encontraron en el CP y en el HD (Fig. 19). El análisis por ANOVA simple arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ). A su vez, el análisis por contraste de múltiples rangos separó los datos en 3 grupos: a) CN y HS; b) HD y c) CP. Se observó un aumento significativo de MNi en la suplementación HD respecto de la HS.

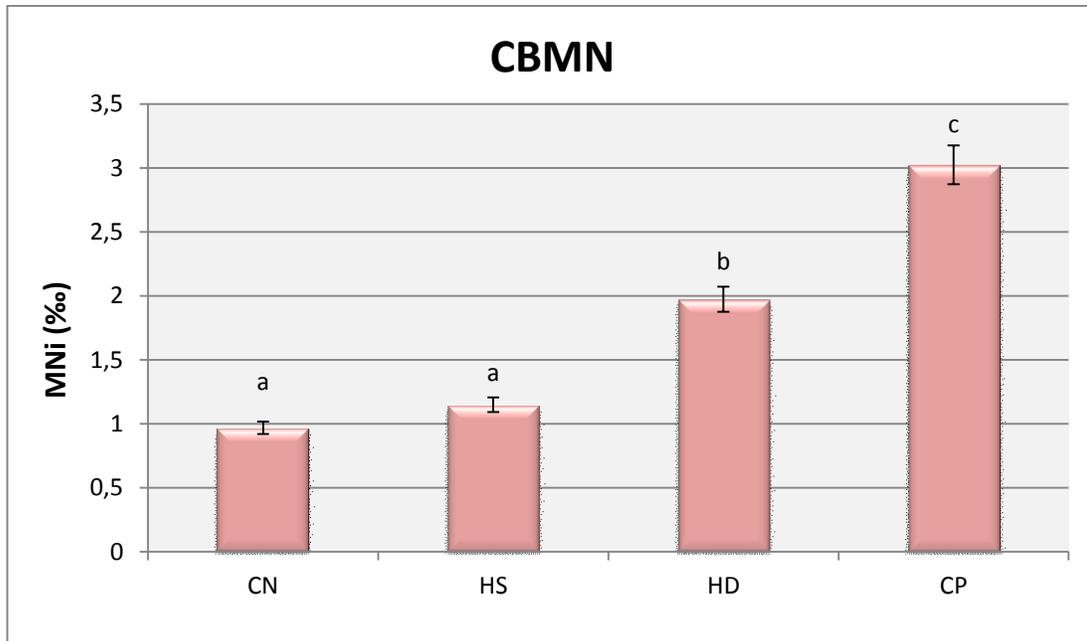


Figura 19. Frecuencias de MNI en 1000 células en el ensayo CBMN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,001$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

Las frecuencias obtenidas de puentes (NPBs) (Fig. 20) y brotes nucleares (NBUDs) (Fig. 21) fueron muy bajas para todos los puntos experimentales. En el caso de los NPBs, los resultados fueron comparados a través del ANOVA simple, el cual resultó estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

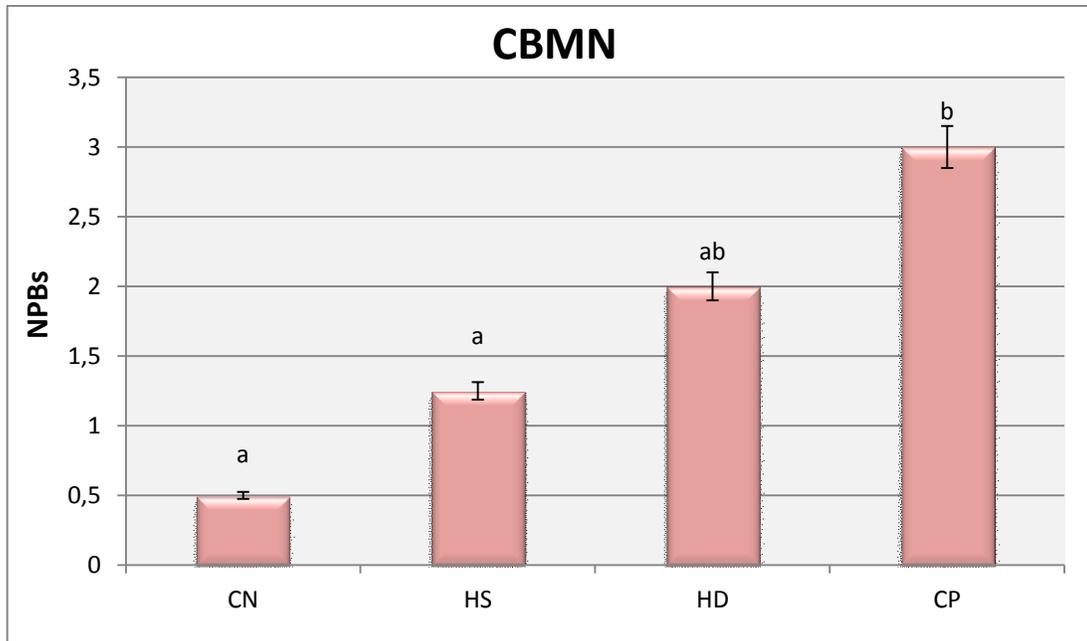


Figura 20. NPBS en el ensayo CBMN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,05$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

En el caso de los NBUDs, como los datos no respondían a una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. La comparación de a pares resultó estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ), tanto para el CP respecto del CN como para el CP respecto del HS. La comparación entre el resto de los puntos experimentales no reflejó diferencias significativas. La frecuencia para la suplementación HS fue nula.

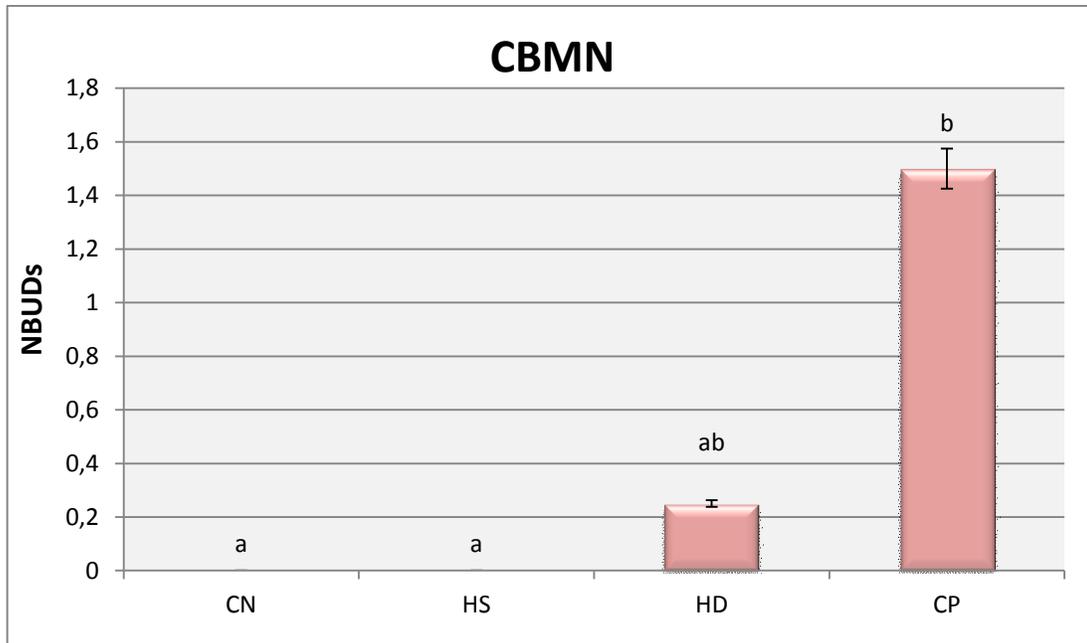


Figura 21. NBUDs en el ensayo CBMN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (Kruskal Wallis  $p < 0,05$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 19.5.2. Electroforesis en gel de células aisladas (Ensayo cometa)

En lo que respecta al ensayo cometa en su versión alcalina, se procedió a calcular el índice de daño (ID) (Tabla 15, Fig. 22). Su análisis, utilizando la prueba de ANOVA simple, arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,0001$ ). El mayor ID, se correspondió al CP seguido por el HD. Por medio de la prueba de contraste de múltiples rangos se pudieron diferenciar tres grupos: a) CN y HS, b) HD y c) CP. La suplementación HS presentó un daño genético significativamente inferior al HD.

Cultivos	ID
CN	19,16 (13)
HS	26,25 (11)
HD	51,08 (13)
CP	149 (53)

Tabla 15. ID Ensayo cometa. ANOVA simple  $P < 0,0001$ . Los valores se corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

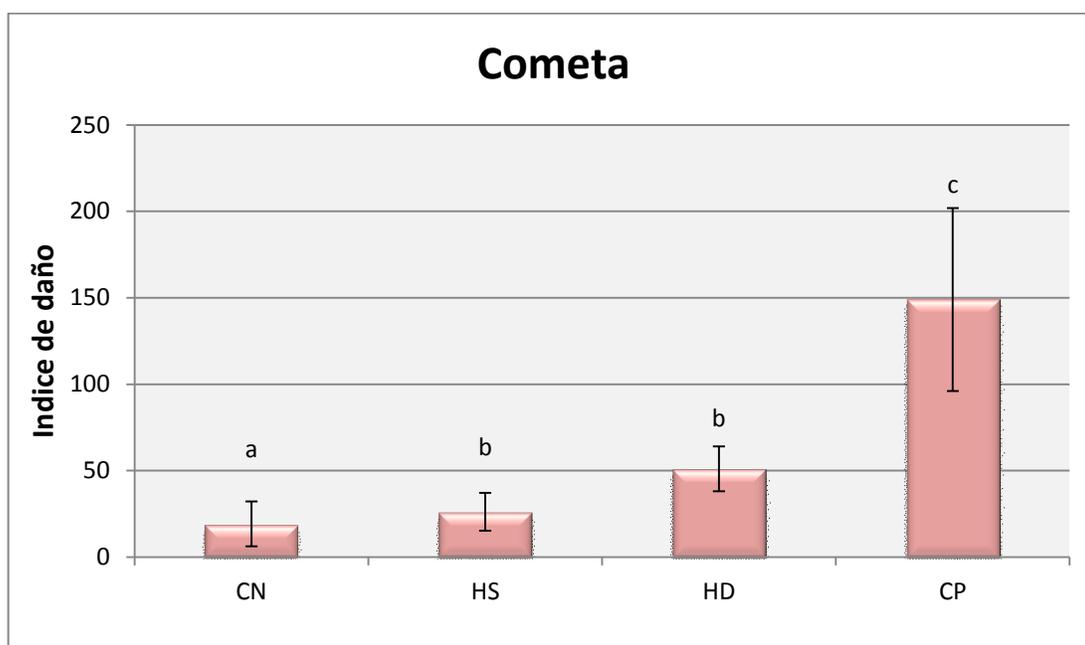


Figura 22. Ensayo Cometa. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,0001$ ). Los valores corresponden a los promedios de Índice de daño y las barras al desvío estándar.

### 19.5.3. Resumen de las técnicas de estrés oxidativo y daño genético

En la tabla 16, se presentan los datos resumidos de las técnicas de estrés oxidativo y daño genético analizadas (T-BARS, SOD, Cat, MNi y EC), comparando específicamente ambas formas de administración del sulfato ferroso (HS vs. HD). Se puede observar que en todos los casos la suplementación semanal presenta un menor estrés oxidativo y daño genético que la diaria.

Técnica	T-BARS	SOD	Cat	MNi	EC
Comparación	HS < HD	HS <* HD	HS <* HD	HS <* HD	HS < HD

Tabla 16. Cuadro comparativo técnicas de estrés oxidativo y daño genético para ambos tipos de suplementación. HS: Hierro Semanal, HD: Hierro Diario, <: tendencia no significativa, <\* Tendencia estadísticamente significativa.

## 20. Discusión hierro

Como se explicitó en el apartado de Antecedentes, la bibliografía que compara la suplementación con hierro diario y semanal en infantes es muy escasa. La mayoría de los trabajos son *in vivo* y principalmente evalúan los marcadores bioquímicos. Se trata de ensayos clínicos controlados, estandarizados y aleatorizados en personas con ADH, donde se utiliza el tratamiento terapéutico. Muchos de ellos, sostienen que la alternativa semanal es efectiva y permitiría mayor adhesión y compromiso con la recomendación.

Los resultados aquí presentados con respecto a la viabilidad celular y al efecto citotóxico, muestran que ninguno de los suplementos con hierro induce una disminución significativa de la viabilidad celular o un aumento de la citotoxicidad. No obstante, se pueden apreciar ciertos beneficios de la suplementación semanal. En el caso del ensayo MTT, se observó una disminución de la viabilidad tanto en el HD como en el HS con respecto al CN, siendo la viabilidad del HS un 10% superior que la del HD. Al respecto, otros autores han demostrado cierta citotoxicidad del sulfato ferroso administrado *in vitro*, pero con dosis mucho mayores que las utilizadas en este estudio (Jover y col., 1992; Alcântara y col., 2013). En el caso del ensayo de RN, el porcentaje de viabilidad promedio para el HS fue ligeramente superior al HD, aunque dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa. Con respecto al análisis del IDN del ensayo CBMN, no hubo diferencias significativas entre HD y HS. Por otra parte, se observó que todos los IDN encontrados fueron inferiores a los esperados para linfocitos humanos cultivados bajo óptimas condiciones. Estos valores, dependen de las condiciones de cultivo, el nivel de exposición a agentes geno y citotóxicos, la composición nutricional del medio, así como de la edad y el sexo de los donantes. En esta investigación en particular, la disminución en el IDN respecto de los valores publicados por Fenech (2007), podría ser explicada por la menor concentración de citocalasina utilizada y, sobre todo, por el tiempo de cultivo. En el reporte mencionado los cultivos fueron de 72 horas, mientras que en nuestro trabajo los mismos tuvieron una duración de 7 días.

La peroxidación lipídica fue analizada a través de la técnica de T-BARS. El HD mostró una mayor peroxidación lipídica que el CN y el HS, esta diferencia fue significativa respecto

del CN. Por otra parte, el análisis de la respuesta enzimática antioxidante, evaluada a través de los ensayos de SOD y catalasa, mostró una menor respuesta por parte del HS. Es decir que, la suplementación diaria implicó un aumento de la actividad enzimática. En su conjunto, nuestros datos sugieren que la suplementación HS produce menor estrés oxidativo que la HD. Los resultados reportados hasta el momento son contradictorios. Hacıhamdioglu y colaboradores, encontraron que la suplementación preventiva de la anemia con sulfato ferroso en niños sanos no causó peroxidación lipídica ni aumento de la respuesta antioxidante cuando se utilizó una dosis de 10 mg/día durante 2 meses (Hacıhamdioglu y col., 2013). Orozco y colaboradores, evaluaron la respuesta de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico urinario (T-BARS) y la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) como indicadores de oxidación sistémica en respuesta a la suplementación oral a corto plazo con hierro y antioxidantes. No observaron un efecto del hierro sobre los biomarcadores de la oxidación sistémica, sin embargo, encontraron una asociación significativa dentro del rango no patológico del estrés oxidativo en hombres adultos sanos (Orozco y col., 2012). A diferencia de los resultados aquí encontrados para la administración diaria, dichos autores no observan un incremento del estrés oxidativo a causa de la suplementación con hierro en individuos sanos.

Lo mismo destacan los siguientes autores pero para pacientes con ADH. Kurtoglu y colaboradores, así como Zaka-ur-Rab y colaboradores, observaron que el tratamiento con sulfato ferroso diario (6 mg/kg/día) en pacientes con anemia por deficiencia de hierro disminuía la peroxidación lipídica después de 6 u 8 semanas de tratamiento (Kurtoglu y col., 2003; Zaka-Ur-Rab y col., 2016). Sundaram y colaboradores, plantearon que después de un mes de tratamiento con hierro, los niveles de fructosamina y malondialdehído disminuyeron significativamente en pacientes anémicas, por lo que el hierro no habría intensificado los valores de peroxidación lipídica (Sundaram y col., 2007). Aycicek y colaboradores, compararon el efecto oxidante y antioxidante total de diferentes fármacos de administración oral de hierro en niños con ADH. Observaron que el estado oxidante total en suero aumentó significativamente, y el  $\text{Fe}^{+2}$  fue efectivo para corregir el estado oxidativo elevado (Aycicek y col., 2014). Los autores mencionados anteriormente

evidencian que el tratamiento con sulfato ferroso no incrementaría el estrés oxidativo, sino que a su vez ayudaría a restablecer el estrés oxidativo ocasionado por la ADH.

En contraparte con los anteriores trabajos y en concordancia con los resultados aquí presentados, los siguientes autores encontraron un incremento del estrés oxidativo a causa del tratamiento con hierro en pacientes con deficiencia. Mimić-Oka y colaboradores, buscaron esclarecer el rol de la terapia repetitiva intravenosa de hierro como una causa suplementaria de estrés oxidativo en pacientes con hemodiálisis. Concluyeron que, si bien el tratamiento mejora los parámetros hematológicos, un aumento en las reservas de hierro debido a la suplementación también podría contribuir a una mayor producción de radicales libres (Mimić-Oka y col., 2005). Akarsu y colaboradores, investigaron la capacidad antioxidante total de una dosis terapéutica de hierro en pacientes con anemia por deficiencia de hierro (ADH). Visualizaron que la terapia oral con sulfato ferroso indujo un estrés oxidativo leve, mientras que las terapias intramuscular e intravenosa indujeron niveles más altos de estrés oxidativo, en orden creciente de intensidad (Akarsu y col., 2013). Altun y colaboradores, observaron que la administración diaria de  $Fe^{+2}$  a una dosis terapéutica de 4 mg/kg/día para el tratamiento de la anemia durante un período de 8 a 12 semanas, aumentó el estrés oxidativo (Altun y col., 2014). En lo que respecta a pacientes sanos, Abtahi y colaboradores, evaluaron los efectos del consumo de pan fortificado con hierro con ciertos biomarcadores de estrés oxidativo en una población sana. Llegaron a la conclusión que, aunque el período a corto plazo (8 meses) de ingesta adicional de hierro no mostró efectos graves de los lípidos por oxidación, los cambios significativos de hierro sérico y algunos índices de estrés oxidativo sugieren que el enriquecimiento de la harina con hierro entre los adultos no anémicos a largo plazo podría conllevar a efectos adversos (Abtahi y col., 2014).

Los resultados arrojados para el ensayo CBMN muestran que la frecuencia de MNI inducida por el HS es significativamente menor que la correspondiente al HD, si bien ambas se encuentran dentro del rango de normalidad establecido por Fenech para cultivos de linfocitos de sangre periférica (Fenech, 2007). Este hecho es esperable, dado que ambas suplementaciones con sulfato ferroso son preventivas y ninguna supera la

dosis máxima establecida. Lo mismo ocurrió con las frecuencias de puentes y brotes nucleares, si bien en este caso no hubo diferencias significativas entre las suplementaciones de HS y HD. Nuestros resultados sugieren que el HS produciría menos daño genómico que el HD y, en este sentido, son coincidentes con lo encontrado en la bibliografía. Prá y colaboradores, reportaron un aumento significativo de la frecuencia de MNi en ratones suplementados *in vivo* con sulfato ferroso diario (Prá y col., 2008); los mismos autores, observaron una correlación negativa entre la frecuencia de MNi y la ingesta de 15 mg/d de hierro en niños (Prá y col., 2012). Premkumar y Bowlus, concluyeron que una dieta con alto contenido de sulfato ferroso incrementa la frecuencia de MNi en células de médula ósea de ratones tratados *in vivo* (Premkumar y Bowlus, 2003). Asimismo, Alcântara y colaboradores, encontraron que una dosis de 640 µg/ml de sulfato de hierro aumentó la frecuencia de MNi en una línea celular astrocítica. Estos autores propusieron que los efectos genotóxicos se deben, probablemente, a las propiedades pro-oxidantes del hierro (Alcântara y col., 2013).

El daño citomolecular, se analizó a través de la técnica de cometa en su versión alcalina. En correspondencia con los resultados hallados para el ensayo CBMN, se encontró que el HD presentó un ID significativamente mayor que el CN y el HS. Para esta técnica, el daño del HD no se encuentra dentro de los valores normales publicados. Nuestros resultados coinciden con los de Aksu y colaboradores, quienes observaron que la administración diaria de hierro (5-6 mg/kg/día) produjo un aumento de daño en el ADN y bases oxidadas en niños con deficiencia de hierro, sugiriendo que dicho aumento es el resultado de un mayor estrés oxidativo (Aksu y col., 2010). Asimismo, Ferro y colaboradores, observaron un aumento de los indicadores genotóxicos obtenidos por CBMN y el ensayo cometa inducidos por la sobrecarga de hierro en pacientes con talasemia (Ferro y col., 2016). Mollet y colaboradores, evidenciaron que dosis bajas de hierro son suficientes para modificar el endotelio vascular e inducir una respuesta de daño en el ADN (Mollet y col., 2016). Por su parte, Franke y colaboradores, observaron que el sulfato de hierro aumentaba el daño en el ADN en ratones tratados *in vivo* y que este daño se incrementaba con la vitamina C (Franke y col., 2005). Sin embargo, Díaz-Castro y

colaboradores evaluaron el efecto de varias dosis y fármacos con Fe sobre los parámetros hematológicos, el daño oxidativo de ADN, lípidos y proteínas, durante el curso de la recuperación de la anemia por deficiencia de Fe. Concluyeron que la suplementación de Fe con dosis bajas de Fe hem o formas combinadas de Fe no hem y hem (FeSO<sub>4</sub> + hem) son eficaces para restaurar los parámetros hematológicos deteriorados y prevenir el daño asociado con los suplementos de Fe (Díaz-Castro y col., 2013).

En el caso del presente trabajo, una explicación plausible para el aumento del estrés oxidativo y, por consiguiente, del daño cromosómico y citomolecular registrado en el HD, podría ser la acumulación de hierro que este induce. En este sentido, se ha constatado que la concentración final de hierro en el sobrenadante fue ampliamente mayor en el HD que en el HS.

## 21. Consideraciones parciales

En líneas generales, en la bibliografía analizada, se ha encontrado evidencia de que la administración de sulfato ferroso ocasiona, en diferente medida, daño en el ADN. En los trabajos de intervención, se destaca la efectividad del tratamiento semanal por sobre el tratamiento diario. Sin embargo, en los trabajos *in vivo* que evalúan el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante a la suplementación con sulfato ferroso, no se observan diferencias significativas para con los controles. En este trabajo de tesis doctoral, se observa que la administración de suplementos de sulfato de hierro en dosis diarias provocaría un leve aumento del estrés oxidativo y, por ende, un aumento en el daño genómico ocasionado. Si bien se evidencia un aumento en la respuesta antioxidante del sistema, se acompaña por un leve incremento en los valores de peroxidación lipídica, lo que indicaría un desequilibrio del sistema de óxido-reducción aquí emulado, en favor del estrés oxidativo. La suplementación semanal, por otro lado, no conlleva una respuesta antioxidante enzimática y tampoco un considerable aumento en la peroxidación lipídica. Esto podría correlacionarse con el menor daño genético observado a través de las técnicas de genotoxicidad. Cabe destacar que ninguno de los suplementos se corresponde con un efecto tóxico del sulfato ferroso, tal como era de esperar ya que las dosis aquí utilizadas son las empleadas en la suplementación preventiva de la anemia por deficiencia de hierro en lactantes. Aun así, se observa una ventaja de la suplementación semanal de la anemia ferropénica, debido a que minimiza los efectos genotóxicos asociados a la administración de hierro. Dicha forma de administración permitiría lograr un mayor cumplimiento de la suplementación preventiva al disminuir los efectos adversos, generando una respuesta menor o igual a la de la suplementación diaria con respecto a la inducción de estrés oxidativo y daño en el ADN.

## CAPÍTULO VII. RESULTADOS y ANÁLISIS:

### HIERRO Y VITAMINA E

#### 22. Resultados hierro y vitamina E

En el **Capítulo VI. Hierro**, se concluyó que la suplementación diaria ocasiona mayor estrés oxidativo y, concomitantemente, mayor daño genotóxico que la semanal. En el presente apartado, se presentan los resultados obtenidos a partir de la administración conjunta de sulfato ferroso con vitamina E, conocida por su potente capacidad antioxidante.

##### 22.1. Viabilidad celular

En lo que respecta a los ensayos de viabilidad se presentan los resultados del MTT (Tabla 17, Fig. 23), de rojo neutro (Tabla 18, Fig. 24), IDN (Tabla 19, Fig. 25) y hemotoxicidad (Tabla 20, Fig. 26).

###### 22.1.1. MTT

La suplementación que presentó la mayor viabilidad fue la HS 16,6 y la que presentó la más baja fue CP. Se realizó el análisis ANOVA simple y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los puntos experimentales ( $P < 0,001$ ). A partir de la prueba de contraste de múltiples rangos, se reconocieron 6 grupos homogéneos que van de mayor a menor viabilidad: a) HS 16,6; b) C 16,6 y HS 8,3; c) HS 8,3; HD 16,6 y C 8,3; d) CN; e) HD 8,3; f) CP.

Cultivos	MTT
CN	53 (2,5)
C 8,3	72,95 (2,5)
C 16,6	80,27 (0,4)
HS 8,3	79,7 (0,3)
HS 16,6	100 (0,5)
HD 8,3	44,82 (0,4)
HD 16,6	73,09 (1,0)
CP	9 (1,0)

Tabla 17. Ensayo MTT. ANOVA simple  $P < 0,001$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

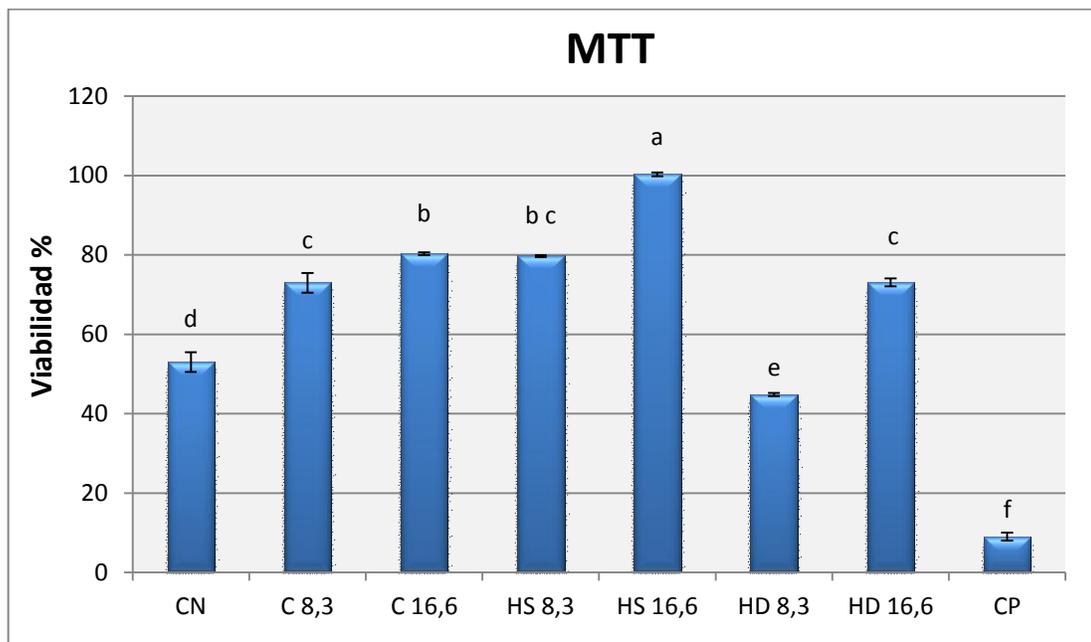


Figura 23. Ensayo MTT. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,001$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

### 22.1.2. Rojo neutro (RN)

Respecto del ensayo de RN (Tabla 18, Fig. 24), se realizó un análisis de ANOVA simple que permitió observar diferencias estadísticamente significativas entre los puntos experimentales ( $p= 0,00442$ ). La viabilidad más alta se encontró nuevamente para el tratamiento HS 16,6 seguido por el control de vitamina E (16,6). La más baja se observó en el control positivo, tal como es de esperarse, y se diferenciaron 2 grupos homogéneos por contraste de múltiples rangos: por un lado a) CN; C 8,3; C 16,6, HD 8,3; HD 16,6; HS 8,3; HS 16,6 y por otro lado b) CP.

Cultivos	RN
CN	82,36 (2,06)
C 8,3	90,11 (6,07)
C 16,6	100,00 (7,8)
HS 8,3	84,91 (3,9)
HS 16,6	101,67 (4,6)
HD 8,3	88,53 (5)
HD 16,6	95,95 (1,6)
CP	16,03 (6,68)

Tabla 18. Ensayo Rojo neutro. ANOVA simple  $p= 0,00442$ . Los valores corresponden al promedio de las 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

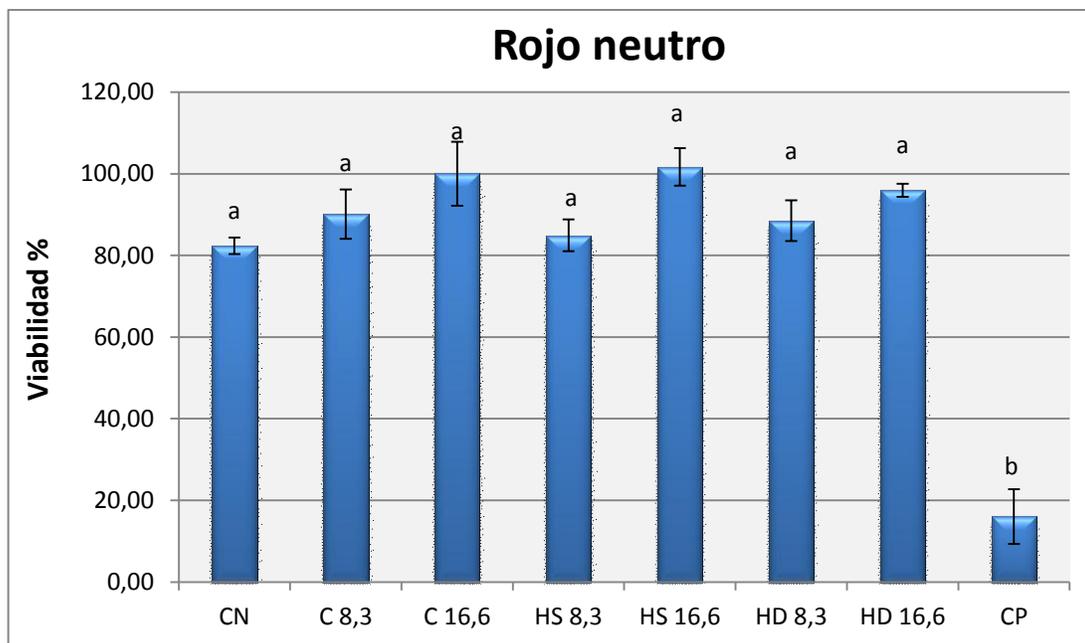


Figura 24. Ensayo RN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $p=0,00442$ ). Los valores corresponden a los promedios de viabilidad y las barras indican el desvío estándar.

### 22.1.3. Índice de división nuclear (IDN)

Se observó una disminución del IDN (Tabla 19, Fig. 25) en los cultivos con sulfato ferroso y en el control positivo (bleomicina). En el control negativo, se observó el IDN más elevado. En los suplementos con la dosis más alta de vitamina E, se observó un leve aumento de este indicador. A través del ensayo de ANOVA simple, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $F=114,11$ ;  $p=0,0$ ). Por otro lado, a partir del análisis por contraste de múltiples rangos se pudo analizar la homogeneidad al interior de los grupos. Se visualizaron cuatro grupos homogéneos de mayor a menor viabilidad: a) CN; b) C 8,3; C 16,6; c) HS 8,3; HS 16,6; HS 16,6 d) HD 8,3; CP. De todos los suplementos combinados HS 16,6 fue el que presentó el mayor IDN.

Cultivos	IDN
CN	1,136 (0,0014)
C 8,3	1,11 (0,007)
C 16,6	1,114 (0,0014)
HS 8,3	1,074 (0,0028)
HS 16,6	1,08 (0,0021)
HD 8,3	1,062 (0,0014)
HD 16,6	1,074 (0,0014)
CP	1,06 (0,007)

Tabla 19. IDN Ensayo CBMN. ANOVA simple  $p=0,0$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

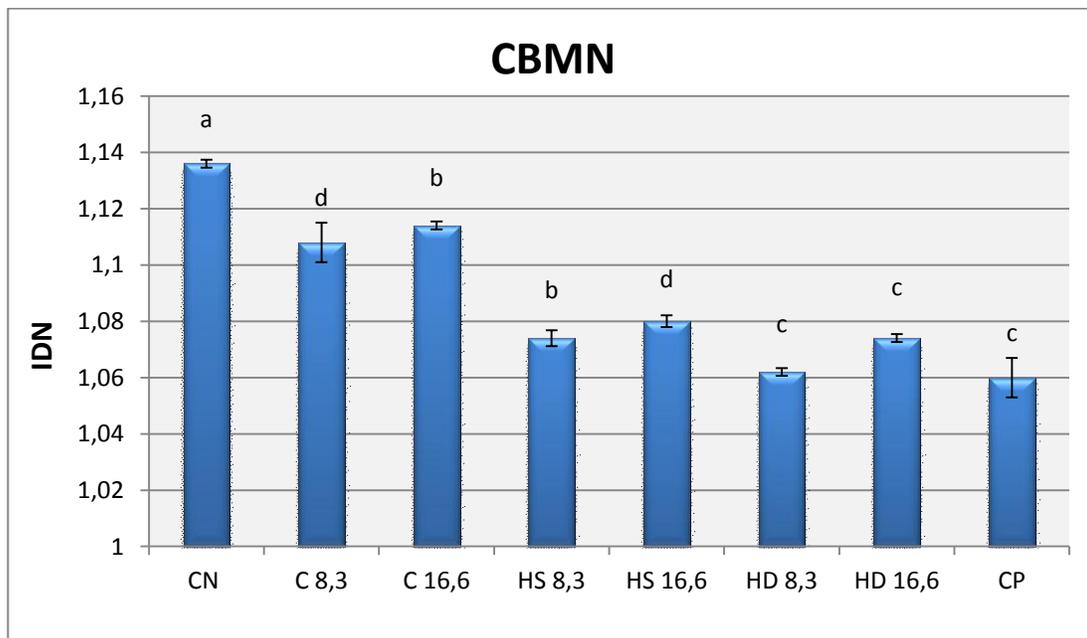


Figura 25. IDN, Ensayo CBMN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $p=0,0$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 22.1.4. Hemotoxicidad

Para la determinación de la hemólisis (Tabla 20, Fig. 26), se compararon los resultados a través de la prueba de Kruskal Wallis resultando las diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,0044$ ). La mayor hemólisis se observó en el control positivo y se diferenció ampliamente del resto de los puntos experimentales. La menor se corresponde con el control negativo, seguido por ambos controles de vitamina E. Se determinaron los siguientes grupos organizados de menor a mayor hemólisis: a) CN; C 8,3; C 16,6 y HS 16,6; b) HD y HS; c) HD y HS; d) CP. De las combinaciones analizadas HS 16,6 fue la que presentó la menor hemólisis.

Cultivos	Hemólisis
CN	15,24 (0,005)
C 8,3	13,14 (0,008)
C 16,6	15,60 (0,025)
HS 8,3	22,49 (0,006)
HS 16,6	18,74 (0,039)
HD 8,3	28,05 (0,024)
HD 16,6	27,05 (0,014)
CP	100,00 (0,07)

Tabla 20. Ensayo Hemotoxicidad. Kruskal Wallis  $p= 0,0044$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

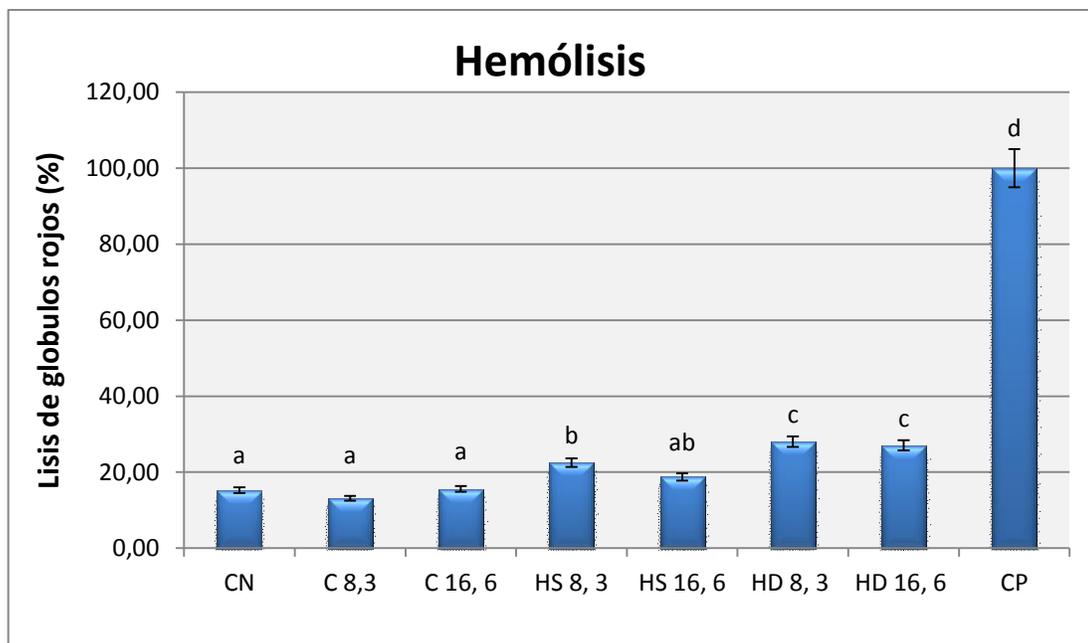


Figura 26. Ensayo de hemólisis. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (Kruskal Wallis  $p=0,0044$ ). Los valores corresponden a los promedios de lisis de glóbulos rojos y las barras al desvío estándar.

#### 22.1.5. Resumen de las técnicas de viabilidad celular

En la tabla 21, se presentan los datos resumidos de las técnicas de viabilidad celular analizadas (MTT, RN, IDN y Hem.), comparando específicamente ambas formas de administración del sulfato ferroso en la combinación con la vitamina E (HS 8,3 vs. HS 16,6; HS 8,3 vs. HD 8,3; HS 8,3 vs. HD 16,6; HD 8,3 vs. HD 16,6; HD 8,3 vs. HS 16,6; HD 16,6 vs. HS 16,6). Se puede observar que la suplementación semanal con la mayor dosis de vitamina E presenta la mayor viabilidad y la menor hemólisis.

	HS 8,3 vs HS 16,6	HS 8,3 vs HD 8,3	HS 8,3 vs HD 16,6	HD 8,3 vs HD 16,6	HD 8,3 vs HS 16,6	HD 16,6 vs HS 16,6
<b>MTT</b>	HS 8,3 <* HS 16,6	HS 8,3 >* HD 8,3	HS 8,3 > HD 16,6	HD 8,3 <* HD 16,6	HD 8,3 <* HS 16,6	HD 16,6 <* HS 16,6
<b>RN</b>	HS 8,3 < HS 16,6	HS 8,3 < HD 8,3	HS 8,3 > HD 16,6	HD 8,3 < HD 16,6	HD 8,3 < HS 16,6	HD 16,6 < HS 16,6
<b>IDN</b>	HS 8,3 <* HS 16,6	HS 8,3 >* HD 8,3	HS 8,3 >* HD 16,6	HD 8,3 < HD 16,6	HD 8,3 <* HS 16,6	HD 16,6 <* HS 16,6
<b>Hem.</b>	HS 8,3 > HS 16,6	HS 8,3 <* HD 8,3	HS 8,3 <* HD 16,6	HD 8,3 > HD 16,6	HD 8,3 >* HS 16,6	HD 16,6 >* HS 16,6

Tabla 21. Cuadro comparativo técnicas de viabilidad celular para ambos tipos de suplementación. >\* o <\*: mayor o menor estadísticamente significativo, > o <: mayor o menor tendencia no estadísticamente significativa.

## 22.2. Mediciones de hierro

La cuantificación de hierro, se evaluó por medio de la técnica colorimétrica que utiliza desferal en el sobrenadante de cultivo (Fig. 27). En el caso de los controles (CN y CP), no se pudieron determinar los valores de hierro debido a que cayeron por debajo del nivel de detección de la técnica (n.d.). En el caso de los suplementos, en HD se observa una cantidad de hierro que varía ente 13 y 15 µg/ml y en HS entre 7 y 8,5 µg/ml. Ambas combinaciones de hierro (diario y semanal) con la mayor cantidad de vitamina E (16,6) presentaron menor cantidad de hierro en el sobrenadante y en su equivalente con menor dosis de vitamina E (8,3).

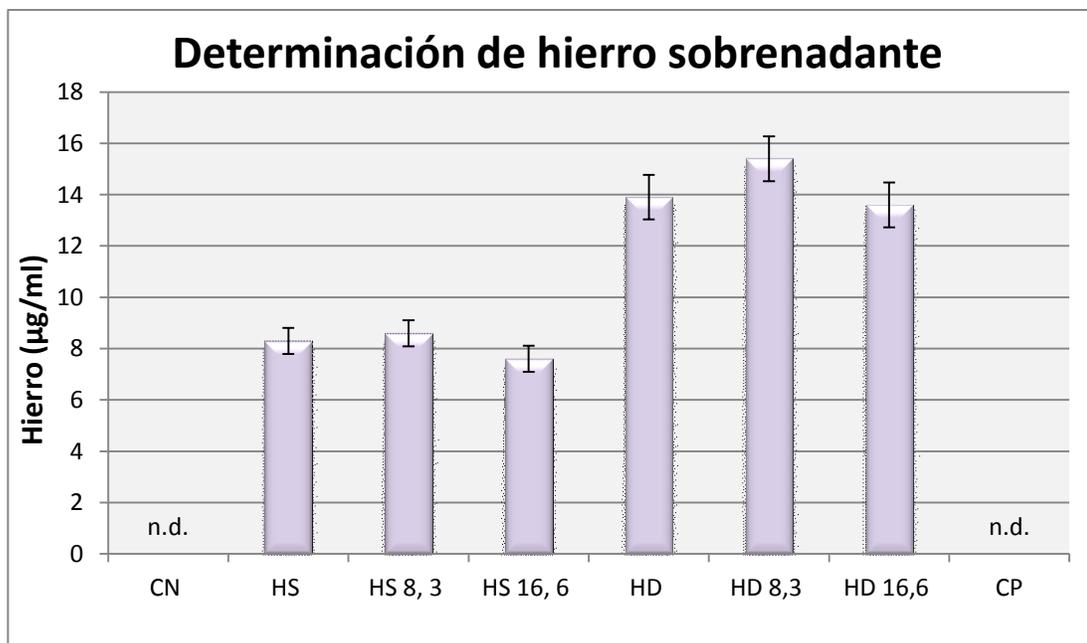


Figura 28. Medición colorimétrica de hierro (ug/ml) a partir de desferal en sobrenadante de cultivo.

La cuantificación de hierro en los linfocitos de sangre periférica se evaluó por medio de una técnica colorimétrica que utiliza batofenantrolina (Fig. 29). En el control negativo (CN) se pudieron detectar cantidades muy bajas de hierro (0,4 µg/ml) y en el control positivo (CP) no se pudieron detectar (n.d.). En el caso de los suplementos, en HD se observó una cantidad de hierro que varía ente 2,5 y 3 µg/ml y en HS entre 4 y 6 µg/ml.

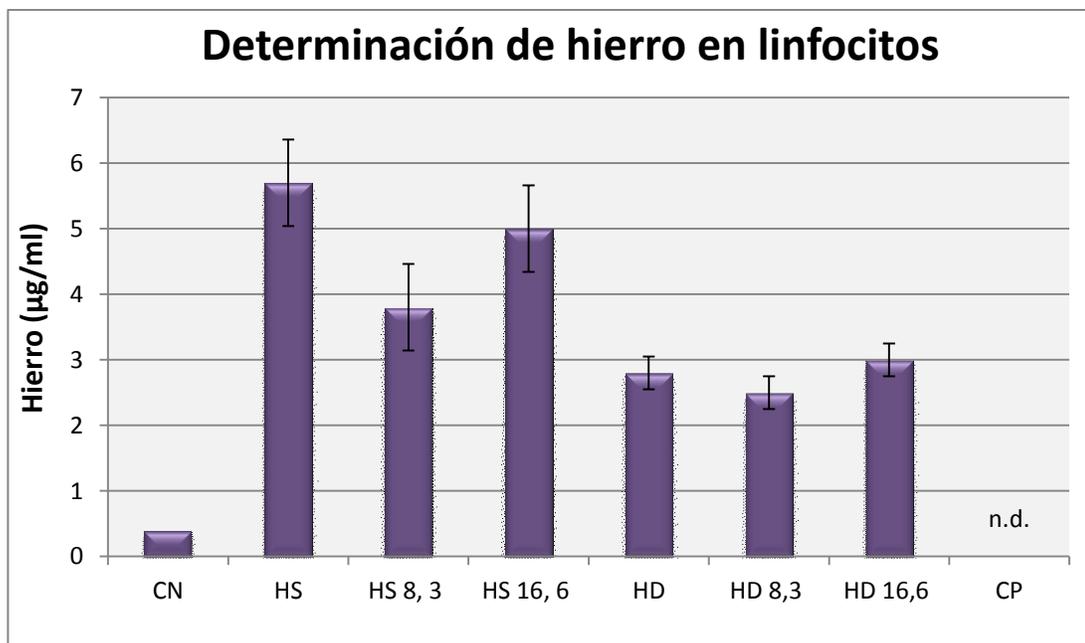


Figura 29. Medición colorimétrica de hierro ( $\mu\text{g/ml}$ ) a partir de batofenantrolina en linfocitos de sangre periférica cultivados por 7 días.

Los cultivos con mayor cantidad de vitamina E (16,6) para ambas modalidades de administración del hierro (semanal y diario) presentaron menor contenido de hierro en el medio extracelular y mayor en las células de cultivo comparado con la dosis recomendada de vitamina E (8,3). Para los tratamientos con HD el contenido total, sumando el sobrenadante y el pellet celular es mayor y dicha diferencia resulta estadísticamente significativa (ANOVA simple  $p= 0,0435$ ) (Tabla 22).

Cultivos	Hierro sobrenadante (µg/ml)	Hierro Linfocitos (µg/ml)	Hierro total (µg/ml)
CN	0 (0)	0,4	0,4
HS	8,3 (0,51)	5,7 (0,66)	14 (3,3)
HS 8,3	8,6 (0,51)	3,8 (0,66)	12,4 (3,3)
HS 16,6	7,6 (0,51)	5 (0,66)	7,6 (3,3)
HD	13,9 (0,87)	2,8 (0,25)	16,7 (0,7)
HD 8,3	15,4 (0,87)	2,5 (0,25)	17,9 (0,7)
HD 16,6	13,6 (0,87)	3 (0,25)	16,6 (0,7)
CP	0	0	0 (0,7)

Tabla 22. Medición de hierro en sobrenadante y en linfocitos de sangre periférica cultivados in vitro. El hierro total es la suma del hierro obtenido en el sobrenadante y el intracelular en los linfocitos, y resulta estadísticamente significativa (HD vs. HS ANOVA simple  $p=0,0435$ ). El DE se indica entre paréntesis.

### 22.3. Estrés oxidativo

#### 22.3.1. T-BARS

En lo que respecta al estrés oxidativo, la peroxidación lipídica fue analizada a partir del ensayo de T-BARS (Tabla 23, Fig. 30). Dado que la distribución de los datos no resultó normal, se realizó el análisis de Kruskal Wallis y en el mismo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. La mayor peroxidación lipídica se observó en el CP y las más bajas en ambos controles con vitamina E (C 8,3; C 16,6) y el CN. En relación a los suplementos combinados, se pudo observar una menor peroxidación en HS 16,6 y en HS 8,3 respecto de HD con ambas concentraciones de vitamina E.

Cultivos	T-BARS (nmol MDA/ml)
CN	425,625 (36)
C 8,3	423,25 (14)
C 16,6	400 (18)
HS 8,3	511,875 (10)
HS 16,6	502,625 (18)
HD 8,3	560,375 (13)
HD 16,6	528,125 (18)
CP	925,75 (34)

Tabla 23. Ensayo T-BARS. Valores de peroxidación lipídica calculados en homogenado de linfocitos. Kruskal Wallis no estadísticamente significativo. Promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

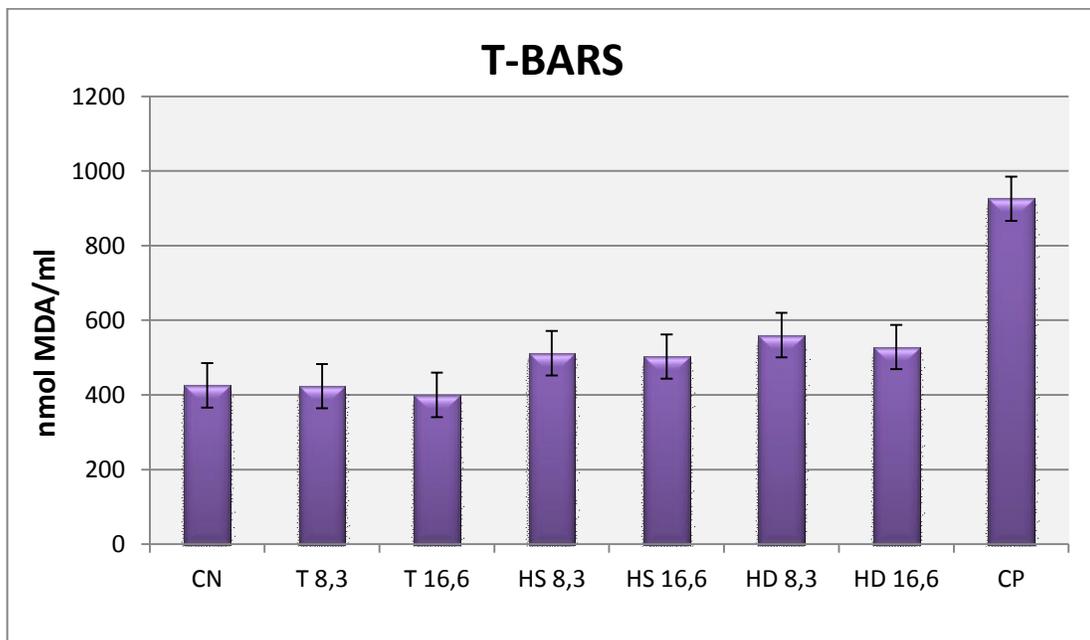


Figura 30. Ensayo T-BARS: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal Wallis  $P > 0,05$ ). Los valores corresponden a los promedios de peroxidación lipídica y las barras al desvío estándar.

### 22.3.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

En el caso del ensayo de ROS (Tabla 24, Fig. 31), los resultados del análisis de ANOVA simple evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,0000$ ). Del análisis de las diferencias al interior de los puntos experimentales, la prueba por contraste de múltiples rangos permitió visualizar seis grupos organizados de menor a mayor: a) NAC; b) C 8,3 y C 16,6; c) CN; d) HS 16,6 y HD 16,6; e) HS 8,3; f) HD 8,3; g) CP. La suplementación HS 16,6 presentó frecuencias menores de ROS respecto de las de HD 8,3 y 16,6.

Tratamientos	ROS (Int. Fluor.)
CN	14961 (326)
NAC	8434 (306)
C 8,3	12899 (282)
C 16,6	12387 (273)
HS 8,3	18607 (75)
HS 16,6	16212 (149)
HD 8,3	19626 (89)
HD 16,6	16644 (102)
CP	27266 (408)

Tabla 24. Ensayo ROS. ANOVA simple  $p= 0,0000$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

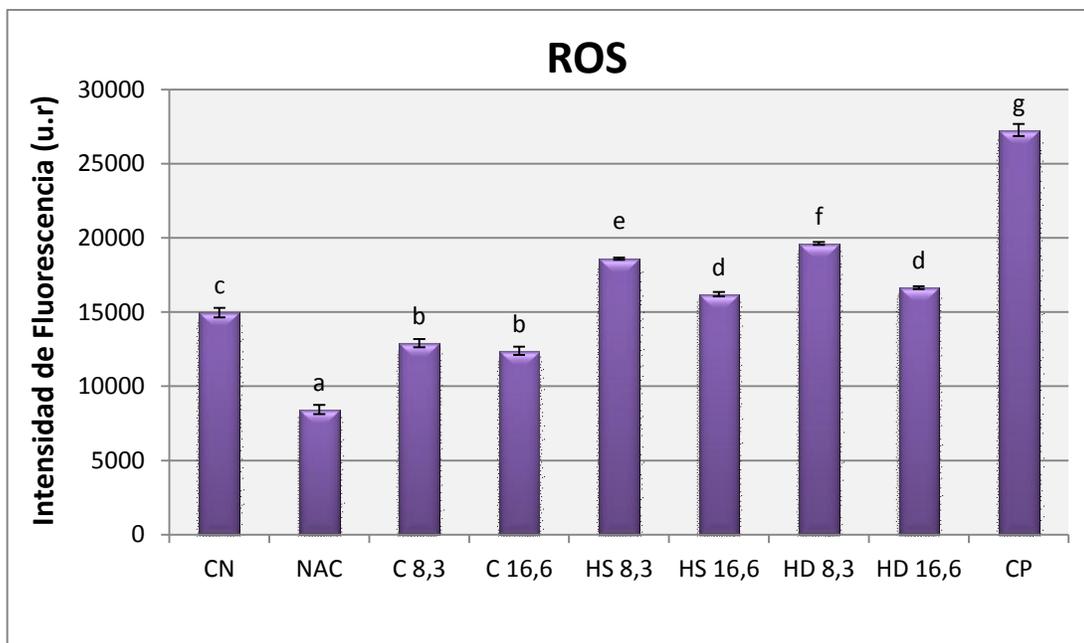


Figura 31. Ensayo ROS. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $p=0,0000$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

### 22.3.3. Lactato deshidrogenasa (LDH)

La medición de actividad de la enzima LDH en los glóbulos rojos (Tabla 25, Fig. 32), permitió analizar el estado oxidante total. La comparación de los resultados se realizó a partir de la prueba de ANOVA simple y se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,0001$ ). Cuando se aplicó la prueba de contraste de múltiples rangos, se diferenciaron 7 grupos homogéneos: a) CN; b) C 16,6; c) C 8,3; d) HS 16,6; e) HS 8,3; f) HD 16,6; g) HD 8,3 y CP. Ambas combinaciones de vitamina E con HS presentaron menores valores de LDH que HD.

Cultivos	LDH (λAbs/min)
CN	142,818 (2,8)
C 8,3	192,02 (2,8)
C 16,6	176,56 (2,8)
HS 8,3	225,772 (2,8)
HS 16,6	217,336 (2,8)
HD 8,3	263,734 (2,8)
HD 16,6	239,832 (2,8)
CP	266,546 (2,8)

Tabla 25. Ensayo LDH realizada en glóbulos rojos como indicador de estado oxidativo. ANOVA simple  $P < 0,0001$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

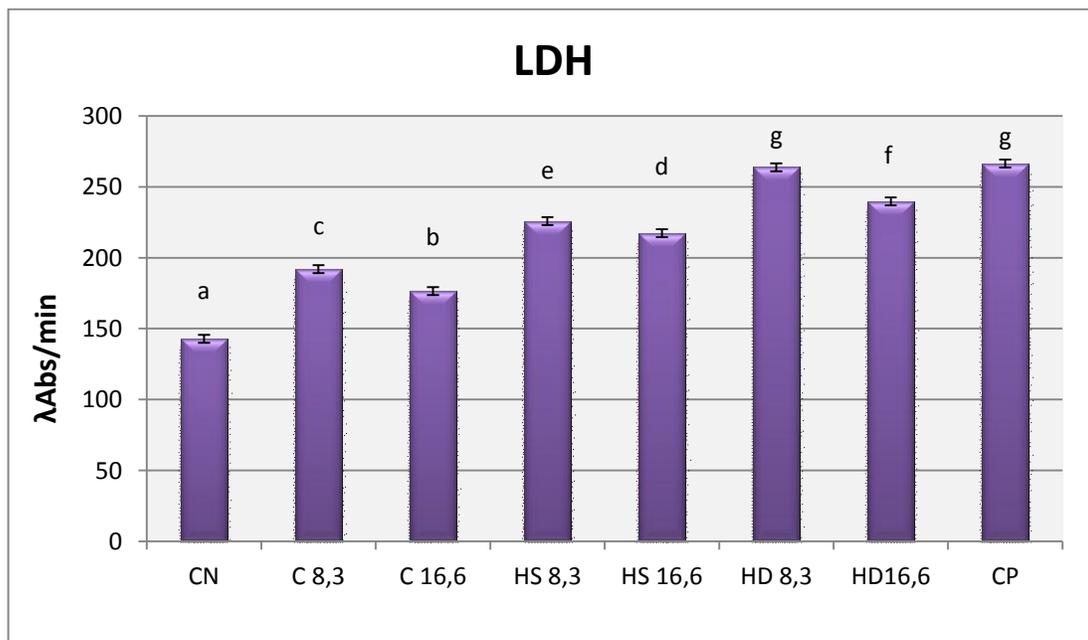


Figura 32. Ensayo LDH. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,0001$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 22.3.4. Enzimas antioxidantes

En lo que respecta a la evaluación de la respuesta enzimática antioxidante del sistema *in vitro*, se realizaron los ensayos de SOD y de catalasa. Para ambas técnicas el hierro semanal con ambas combinaciones de vitamina E presentó menor respuesta antioxidante que la suplementación diaria (HD 8,3 y 16,6).

##### 22.3.4.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Para el ensayo de SOD (Tabla 26, Fig. 33), se realizó la prueba de Kruskal Wallis, dado que los datos no respondían a una distribución normal y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los puntos experimentales ( $P= 0,09$ ). En relación a los suplementos combinados, se pudo observar una actividad de SOD menor en HS 16,6 y en HS 8,3 respecto de HD con ambas concentraciones de vitamina E.

Cultivos	SOD USOD/ml
CN	0,007 (0,0014)
C 8,3	0,005 (0,0007)
C 16,6	0,005 (0,0007)
HS 8,3	0,007 (0,0)
HS 16,6	0,007 (0,0014)
HD 8,3	0,009 (0,0)
HD 16,6	0,009 (0,0014)
CP	0,013 (0,005)

Tabla 26. Ensayo SOD. Kruskal Wallis  $P= 0,09$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

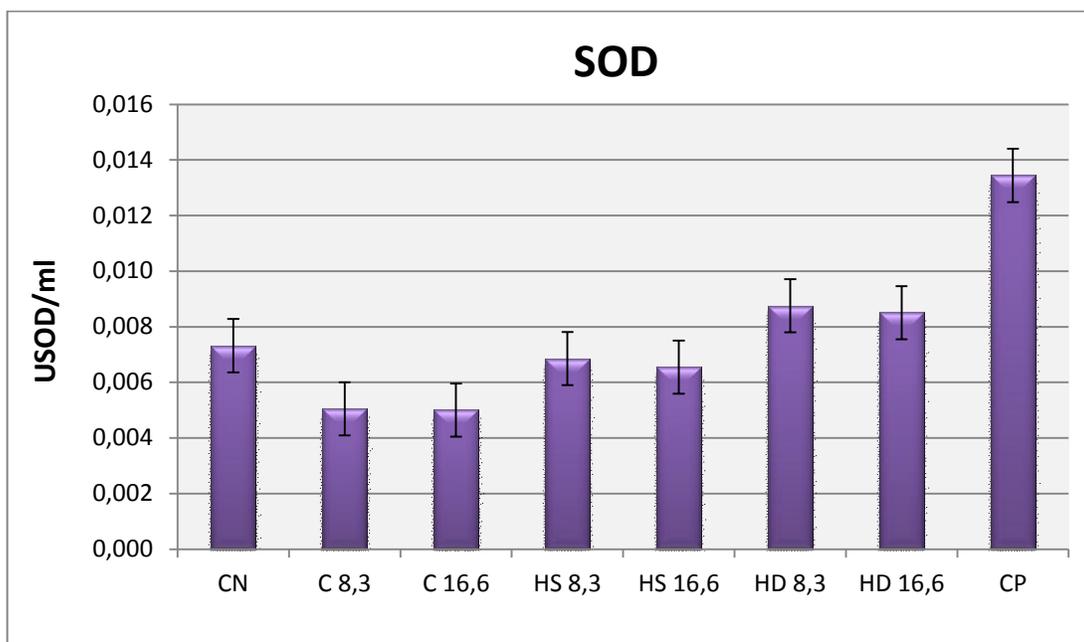


Figura 33. Ensayo SOD. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal Wallis  $P=0,09$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 22.3.4.2. Catalasa

En el caso del ensayo de catalasa (Tabla 27, Fig. 34), al tratarse de una distribución normal, se realizó la comparación entre puntos experimentales a través de la prueba de ANOVA simple y se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0000$ ). Se separaron siete grupos homogéneos con la prueba de contraste de múltiples rangos: a) CN; b) HS 16,6; c) HS 8,3; d) HD 16,6; e) C 16,6 y HD 8,3; f) C 8,3 y g) CP. Nuevamente se observó una menor actividad enzimática en HS 16,6 y en HS 8,3 respecto de HD con ambas concentraciones de vitamina E.

Cultivos	Catalasa UCatalasa/ml
CN	25530 (375)
C 8,3	52170 (120)
C 16,6	48840 (240)
HS 8,3	40515 (364)
HS 16,6	37740 (170)
HD 8,3	49395 (279)
HD 16,6	47175 (124)
CP	73815 (223)

Tabla 27. Ensayo Catalasa. ANOVA simple  $p=0,0000$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

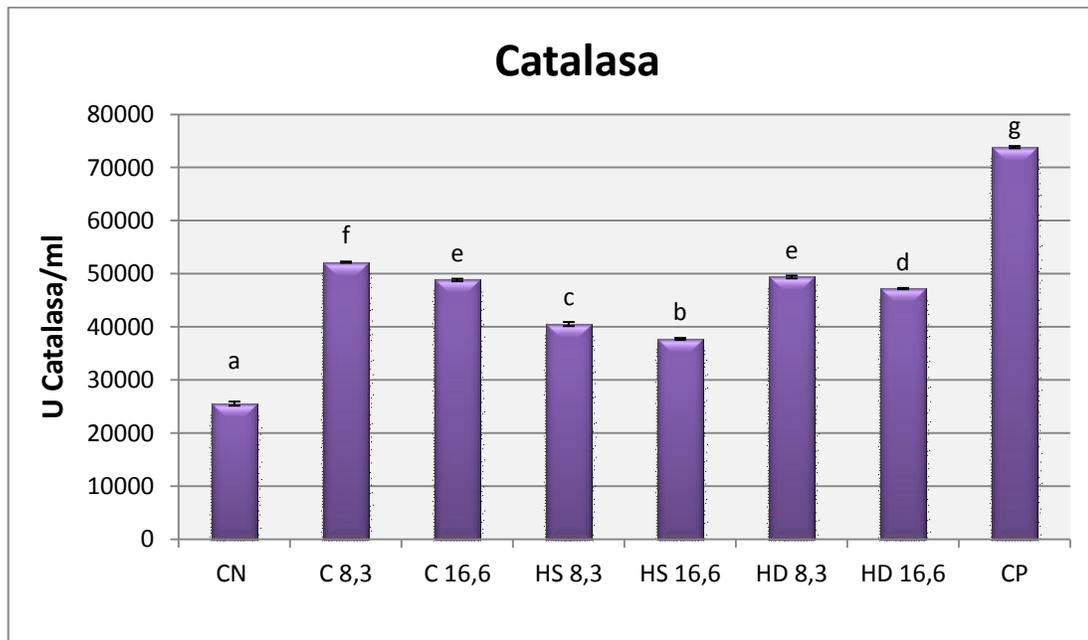


Figura 34. Ensayo catalasa. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $p=0,0000$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

## 22.4. Daño genético

### 22.4.1. Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)

En la Tabla 28, se muestran los resultados obtenidos para los indicadores analizados con el ensayo CBMN (MNi, NPBs y NBUDs).

Cultivos	MNi %	NPBs %	NBUDs %
CN	1,32 (0,001)	0,0 (0,0)	0
C 8,3	1,11 (0,007)	0,0 (0,7)	0
C 16,6	1,09 (0,007)	0,0 (0,0)	0
HS 8,3	2,22 (0,014)	0,1 (0,07)	0
HS 16,6	2,14 (0,014)	0,0 (0,0)	0
HD 8,3	2,47 (0,007)	0,2 (0,07)	0
HD 16,6	2,41 (0,014)	0,1 (0,07)	0
CP	4,1 (0,141)	0,7 (0,14)	0,3 (0,07)

Tabla 28. Ensayo CBMN. Los valores corresponden a las frecuencias cada 1000 células, el DE se indica entre paréntesis.

Para valorar el daño cromosómico, se contabilizó la frecuencia de MNi, NPBs y NBUDs en 1.000 células binucleadas. Las mayores frecuencias de MNi se encontraron en el CP y en los suplementos diarios (Fig. 35). El análisis por ANOVA simple arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,0000$ ). El análisis al interior de los grupos por contraste de múltiples rangos separó los resultados en 4 grupos: a) CN; C 8,3; C 16,6; b) HS

8,3 y HS 16,6 c) HD 8,3 y HD 16, 6; d) CP. Se observó un aumento significativo de micronúcleos en HD respecto de HS y, por otro lado, se pudo constatar que una mayor concentración de vitamina E se correlacionó con una menor frecuencia de daño cromosómico, aunque no de manera estadísticamente significativa.

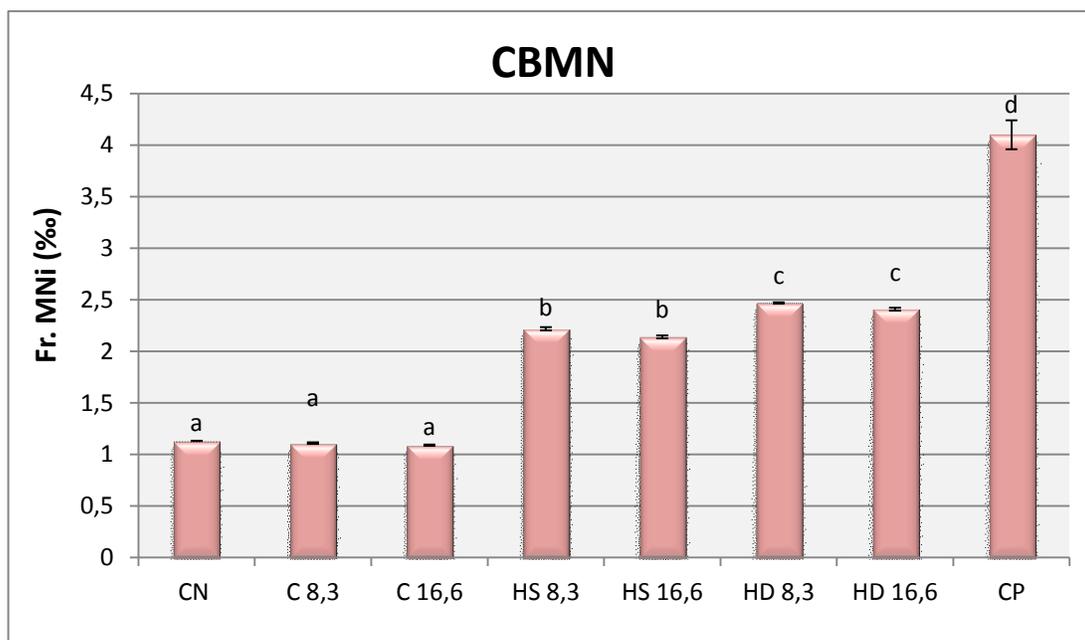


Figura 35. Frecuencia de MNi (%) en el ensayo CBMN. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $p=0,0000$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

Las frecuencias obtenidas de puentes nucleoplásmicos (NPBs) y brotes nucleares (NBUDs) fueron, en líneas generales, muy bajas. En el caso de los NPBs (Fig. 36), se realizó el análisis de ANOVA simple, el cual no resultó estadísticamente significativo ( $p=0,107$ ). Los valores de HS (8,3 y 16,6) fueron menores a los de HD (8,3 y 16,6).

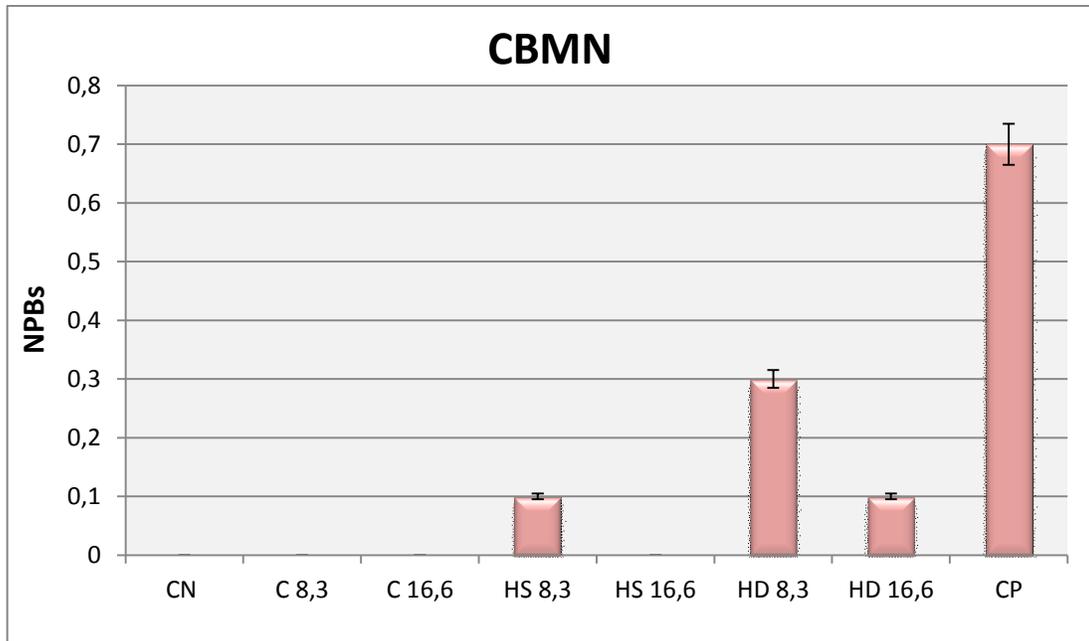


Figura 36. NPBS ensayo CBMN. Los valores de P se refieren al análisis de ANOVA ( $p = 0,107$ ). Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

Para los NBUDs (Fig. 37), como los datos no respondían a una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis ( $p = 0,082$ ). Sólo resultó estadísticamente significativa la comparación entre el control positivo y el resto de los cultivos.

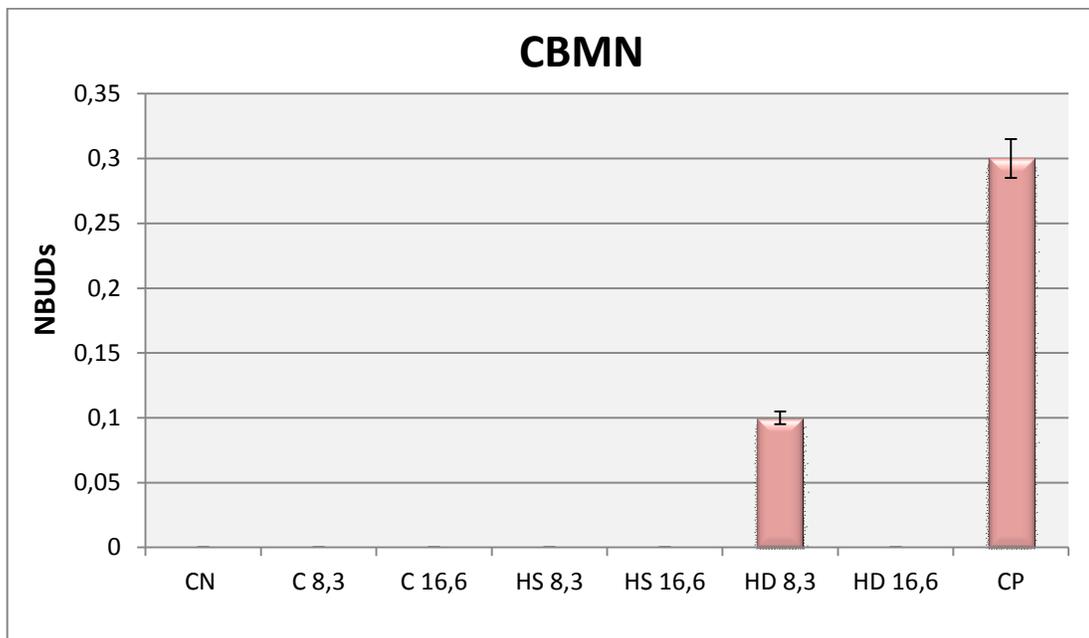


Figura 37. NBUDs ensayo CBMN. Kruskal Wallis  $p = 0,802$ . Los valores corresponden a los promedios y las barras al desvío estándar.

#### 22.4.2. Electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa)

En lo que respecta al ensayo cometa en su versión alcalina, se procedió a calcular el índice de daño (ID) (Tabla 29, Fig. 38). Su análisis, utilizando la prueba de ANOVA simple, arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,0001$ ). El mayor ID se correspondió al CP, seguido por la suplementación diaria con la dosis más baja de vitamina E (HD 8,3). Por medio de la comparación con la prueba de contraste de múltiples rangos se pudieron diferenciar cinco grupos: a) CN; C 8,3 y C 16,6; b) C 8,3 y HS 16,6 c) HS 8,3 y HD 16,6; d) HD 8,3; e) CP. Tanto HS 8,3 como HS 16,6 presentaron un menor ID que HD 8,3 y 16,6.

Cultivos	ID
CN	6,50 (4,2)
C 8,3	17,00 (5,2)
C 16,6	10,75 (3,3)
HS 8,3	41,00 (5)
HS 16,6	27,00 (2,5)
HD 8,3	66,00 (12)
HD 16,6	44,25 (11,8)
CP	156,75 (15,4)

Tabla 29. ID Ensayo cometa. ANOVA simple  $P < 0,0001$ . Los valores corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

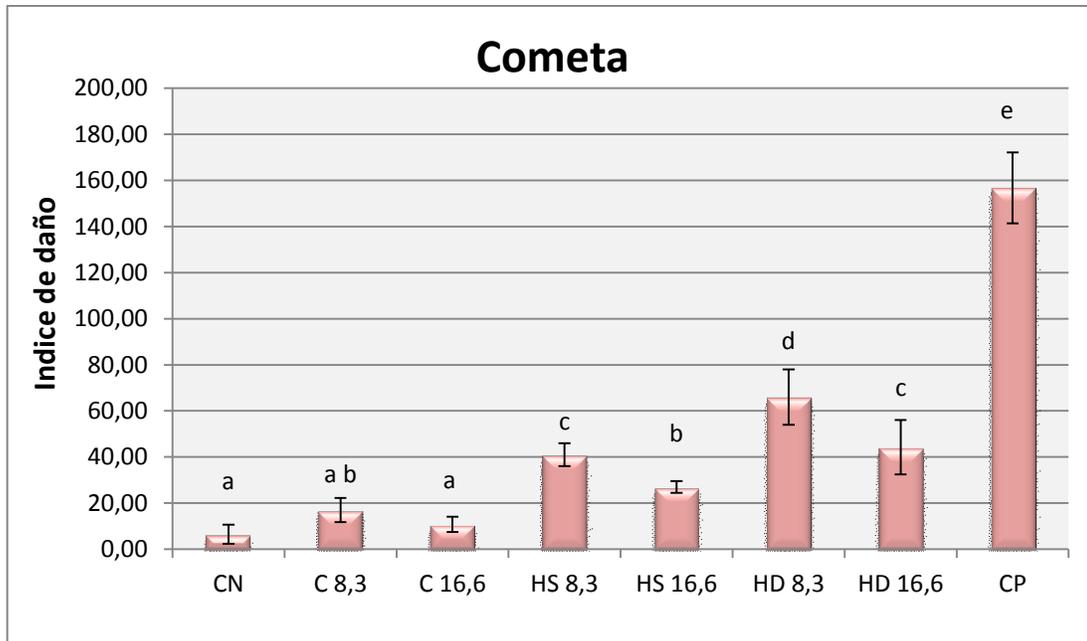


Figura 38. Ensayo cometa. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $P < 0,0001$ ). Los valores corresponden a los promedios de Índice de daño y las barras al desvío estándar.

## 22.5. Resumen de las técnicas de estrés oxidativo y daño genético

En la tabla 30, se presentan los datos resumidos de las técnicas de estrés oxidativo y daño genético analizadas (T-BARS, ROS, SOD, Cat, MNI y EC), comparando específicamente ambas formas de administración del sulfato ferroso en la combinación con la vitamina E (HS 8,3 vs. HS 16,6; HS 8,3 vs. HD 8,3; HS 8,3 vs. HD 16,6; HD 8,3 vs. HD 16,6; HD 8,3 vs. HS 16,6; HD 16,6 vs. HS 16,6). Se puede observar que la suplementación semanal con la mayor dosis de vitamina E (HS 16,6) presenta los menores valores de estrés oxidativo y de respuesta enzimática antioxidante así como de daño genético, respecto de la suplementación diaria (HD 8,3 y 16,6).

	HS 8,3 vs HS 16,6	HS 8,3 vs HD 8,3	HS 8,3 vs HD 16,6	HD 8,3 vs HD 16,6	HD 8,3 vs HS 16,6	HD 16,6 vs HS 16,6
<b>T- BARS</b>	HS 8,3 > HS 16,6	HS 8,3 < HD 8,3	HS 8,3 < HD 16,6	HD 8,3 > HD 16,6	HD 8,3 > HS 16,6	HD 16,6 > HS 16,6
<b>ROS</b>	HS 8,3 >* HS 16,6	HS 8,3 <* HD 8,3	HS 8,3 >* HD 16,6	HD 8,3 >* HD 16,6	HD 8,3 >* HS 16,6	HD 16,6 > HS 16,6
<b>LDH</b>	HS 8,3 >* HS 16,6	HS 8,3 <* HD 8,3	HS 8,3 <* HD 16,6	HD 8,3 >* HD 16,6	HD 8,3 >* HS 16,6	HD 16,6 >* HS 16,6
<b>SOD</b>	HS 8,3 = HS 16,6	HS 8,3 < HD 8,3	HS 8,3 < HD 16,6	HD 8,3 = HD 16,6	HD 8,3 > HS 16,6	HD 16,6 > HS 16,6
<b>Cat</b>	HS 8,3 <* HS 16,6	HS 8,3 <* HD 8,3	HS 8,3 <* HD 16,6	HD 8,3 >* HD 16,6	HD 8,3 >* HS 16,6	HD 16,6 >* HS 16,6
<b>MNI</b>	HS 8,3 > HS 16,6	HS 8,3 <* HD 8,3	HS 8,3 <* HD 16,6	HD 8,3 > HD 16,6	HD 8,3 >* HS 16,6	HD 16,6 >* HS 16,6
<b>EC</b>	HS 8,3 >* HS 16,6	HS 8,3 <* HD 8,3	HS 8,3 < HD 16,6	HD 8,3 >* HD 16,6	HD 8,3 >* HS 16,6	HD 16,6 >* HS 16,6

Tabla 30. Cuadro comparativo técnicas de estrés oxidativo y daño genético para ambos tipos de suplementación. >\* o <\*: mayor o menor estadísticamente significativo, > o <: mayor o menor tendencia no estadísticamente significativa.

### 23. Discusión hierro y vitamina E

En el presente apartado de la tesis doctoral, se analizó el efecto de la vitamina E sobre ambas modalidades de administración de la suplementación preventiva con sulfato ferroso (diario y semanal) de la anemia ferropénica. Se evaluó la viabilidad celular, el estrés oxidativo y el daño genético en sangre periférica cultivada *in vitro*.

En lo que respecta a los ensayos de MTT y de RN, se puede observar que para ambas técnicas la mayor viabilidad se presentó en la suplementación semanal con la mayor dosis de vitamina E (HS 16,6). A su vez, al comparar entre los suplementos combinados se puede apreciar una mayor viabilidad en ambos suplementos con hierro semanal por sobre el diario, la cual mejora con la dosis más alta de vitamina E. Como se esperaba, el control positivo presenta la viabilidad más baja al tratarlo con etanol. Todos los puntos experimentales, a excepción del control positivo, superan ampliamente el 50% de viabilidad celular y esto es de suma importancia, dado el prolongado tiempo de cultivo que tiene el presente diseño experimental. En este contexto, remarcamos lo antedicho, que las dosis de sulfato ferroso no representan dosis tóxicas por tratarse de suplementación preventiva. Resulta interesante destacar que todos los suplementos de vitamina E (C 16,6 y C 8,3) superan en cantidad de células vivas al control negativo, por lo que dicha vitamina pareciera favorecer la viabilidad celular. En la comparación entre la suplementación de hierro diario y semanal presentada en el apartado anterior no se habían encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambas formas de administración; mientras que al combinar los mismos con vitamina E se pudo observar que la administración semanal combinada con la dosis más alta de vitamina E presenta un IDN significativamente superior al de la administración diaria combinada con la dosis más baja de vitamina E. Respecto de los controles con ambas dosis de vitamina E, si bien se pudo observar un mayor IDN en la dosis más altas, dicho aumento no resultó significativo. Cabe mencionar que para todos los puntos experimentales, los valores de IDN resultaron bajos con respecto a los publicados por Fenech para linfocitos humanos (Fenech, 2007). Esto pudo variar en función de la cantidad de citocalasina B utilizada, pero sobre todo, podría haber incidido el extenso tiempo de cultivo que requiere el protocolo aquí

desarrollado. Avula y Fernández, en un ensayo con ratones, observaron que la suplementación con vitamina E en la dieta favorecería la proliferación celular así como disminuía la muerte celular programada al reducir los peróxidos lipídicos (Avula y Fernandes, 2000). Respecto de los resultados obtenidos para evaluar la hemólisis, se pudo comprobar que el valor más elevado fue para el control positivo tratado con tritón, el cual representa el 100% de glóbulos rojos degradados. A éste, le siguen ambos suplementos con hierro diario, donde se vio menos de un 30% de hemólisis, y ambos suplementos semanales, en los cuales la hemólisis disminuye hasta un máximo de 20% aproximadamente. Los menores valores (alrededor de 15%) se alcanzaron en el control negativo y en ambos controles con vitamina E. Se observó que a mayor dosis de vitamina E hubo menor hemólisis. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los de Marar, quien observó cierto efecto protector de la vitamina E al atenuar la hemólisis de los glóbulos rojos en condiciones hiperglucémicas a nivel *in vitro* (Marar, 2011). Por su parte, las experiencias de Jilani y colaboradores, brindan una explicación posible para este hecho, ya que encontraron que la vitamina E podría suprimir la inhibición de la apoptosis de las células progenitoras eritroides humanas para aumentar la concentración de hemoglobina (Jilani y col., 2015; Jilani y Iqbal, 2018).

Para analizar el estado oxidativo del presente sistema, se utilizaron los ensayos de T-BARS para evaluar la peroxidación lipídica, de ROS para valorar el estrés oxidativo general y de LDH como indicador de actividad oxidante total. Respecto del primero, si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, en los suplementos combinados se observa una marcada tendencia decreciente en el siguiente orden: HD 8,3; HD 16,6 HS 8,3 y, por último, HS 16,6, con la menor peroxidación lipídica. Esta misma tendencia decreciente se pudo observar en el análisis de LDH en glóbulos rojos, donde los resultados sí mostraron diferencias significativas entre puntos experimentales. Para ambas técnicas, la administración de hierro semanal con la mayor dosis de vitamina E (HS 16,6), evidencia el menor estado oxidativo entre los suplementos combinados. En ambos controles con vitamina E también se evidencia una leve disminución del estado oxidativo. En el caso del ensayo de ROS se observa una tendencia similar, ambos suplementos semanales

presentan menor estrés oxidativo que los de hierro diario. Además, las combinaciones con las dosis más altas de vitamina E, parecerían tener un efecto protector al presentar menores valores de ROS. Esto se puede apreciar también en el caso de ambos controles de vitamina E, aunque la diferencia no resulta estadísticamente significativa.

Respecto de la respuesta antioxidante, tanto la actividad de la catalasa como de la enzima SOD, se encuentran más elevadas en aquellos cultivos que recibieron la administración de hierro diaria y, en menor medida, en aquellos con administración semanal. Esto podría estar evidenciando que, frente a la presencia de un potente prooxidante como lo es el sulfato ferroso, se incrementa la respuesta antioxidante del sistema, aunque la misma no logra evitar el leve estrés oxidativo final que este mineral ocasiona. Lo mismo se pudo observar en el apartado anterior. Sin embargo, al realizar la co-suplementación con vitamina E, la misma parecería reforzar y complementar el sistema de defensas y así lograr atenuar el estrés oxidativo ocasionado por el sulfato ferroso. La bibliografía respecto a los efectos de la vitamina E sobre el estrés oxidativo resulta controversial. La mayoría de los trabajos generales refieren una función protectora y beneficiosa de esta vitamina. Por ejemplo, Wawrzyniak y colaboradores sugirieron, a partir de la experimentación en un modelo de ratones, que el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico y el  $\beta$ -caroteno, cuando se administran simultáneamente, tienen principalmente efectos antioxidantes sobre la peroxidación lipídica (Wawrzyniak y col., 2013). Riffle y colaboradores observaron, en un modelo de ratones, que tanto la vitamina C como la vitamina E favorecían la eliminación de especies reactivas de oxígeno y ayudarían a normalizar el estado oxidativo de la médula espinal alterado por el dolor (Riffel y col., 2018). Altamura y colaboradores, visualizaron que la maduración alterada de los reticulocitos en respuesta a la pérdida de Gpx4 en las células hematopoyéticas causa una eritropoyesis ineficaz, y esto resulta parcialmente atenuado por la suplementación dietética de vitamina E (Altamura y col., 2020).

Dentro de los trabajos que vinculan directamente la co-suplementación de la vitamina E con el hierro, Tang y colaboradores, plantearon que adicionar vitamina E junto con el tratamiento terapéutico con hierro podría, al disminuir la inflamación, favorecer la

absorción del hierro (Tang y col., 2016). Arnon y colaboradores, también observaron que dicha combinación resultó ser eficaz y segura para mejorar la anemia en los recién nacidos prematuros (Arnon y col., 2009). A su vez, tanto Madhikarmi y Murthy, como Şimşek Orhon y colaboradores, investigaron puntualmente el estado oxidante/antioxidante en la anemia por deficiencia de hierro (ADH). Ambos trabajos concluyeron que después de la suplementación con vitamina E, se logra una menor peroxidación de lípidos, ya que se reduce la producción de MDA (Madhikarmi y Murthy, 2014; Şimşek Orhon y col., 2006). Madhikarmi y Murthy, también observaron un aumento de las enzimas antioxidantes e Isler y colaboradores, vislumbraron que junto al tratamiento con hierro parenteral, la suplementación con vitamina E podría ser una estrategia eficaz para restaurar la respuesta antioxidante durante la anemia (Isler y col., 2002).

Al analizar los resultados del ensayo CBMN, se observa que la suplementación con hierro semanal ocasiona frecuencias de MNI significativamente inferiores a las observadas para los suplementos diarios. Las frecuencias más bajas de micronúcleos se corresponden con el control negativo y ambos controles de vitamina E. Hay que mencionar, que todas las frecuencias de micronúcleos registradas en ambas suplementaciones con sulfato ferroso, se encuentran dentro del rango de normalidad establecido por Fenech para cultivos de linfocitos de sangre periférica humana (Fenech, 2007). Dado que ambas administraciones se corresponden con las utilizadas para la suplementación preventiva de la anemia, se considera un resultado esperado que las frecuencias de ambos se encuentren dentro de dichos parámetros de normalidad. De todos modos, estos resultados sugieren que la suplementación semanal produciría un menor daño genómico que la diaria. Respecto de la combinación entre el sulfato ferroso y ambas dosis de vitamina E, si bien dichas diferencias no resultaron estadísticamente significativas para ambas administraciones de hierro, se puede observar una tendencia hacia un menor daño con la dosis más alta de vitamina (16,6). La vitamina E, al ser el antioxidante lipídico más potente, podría reducir el daño cromosómico inducido por los radicales libres mediante la inhibición de la formación de los mismos y la activación de las endonucleasas, que aumentan la tasa de eliminación del ADN dañado. Aunque algunos estudios sugieren dicha

función en la prevención de los efectos mutagénicos, en otros estudios no se observa ningún tipo de efecto protector (Claycombe y Meydani, 2001). Rodríguez y colaboradores, observaron que el uso de membranas recubiertas con vitamina E supone una disminución en los niveles de daño oxidativo del ADN y, a su vez, mejora el estado de la anemia urémica en pacientes con hemodiálisis (Rodríguez-Ribera y col., 2017). Sin embargo, Record y Jannes, evidenciaron que la suplementación con vitamina E tendría poco efecto contra el daño genómico oxidativo evaluado por la formación de micronúcleos en esplenocitos sometidos a estrés oxidativo *ex vivo* (Record y Jannes, 2000). A su vez, Fenech y colaboradores observaron durante un estudio de intervención, que el aumento de vitamina E no tuvo un impacto significativo en la tasa de daño genético basal y tampoco hubo correlación entre la frecuencia de daño genético basal y el estado de vitamina E evaluado en linfocitos humanos (Fenech y col., 1997). En lo que respecta específicamente a este plan de tesis, se podría interpretar que frente a la presencia de un poderoso pro-oxidante como es el sulfato ferroso, una mayor cantidad de vitamina E resultaría beneficiosa para contrarrestar la producción de radicales libres y evitar así el daño cromosómico.

Por su parte, en el caso del análisis de puentes y brotes nucleares, se puede vislumbrar la propensión hacia un menor daño genético con la suplementación semanal en comparación con la diaria, el cual es aún menor en combinación con la concentración más alta de vitamina E. Los resultados para ambos biomarcadores también se encuentran dentro de lo que Fenech considera rangos normales de daño genómico (Fenech, 2007).

En lo que respecta al daño citomolecular analizado a partir del ensayo cometa, los valores más altos corresponden al control positivo y los menores para el control negativo y los controles de ambas dosis de vitamina E. Los tres se encuentran por debajo del 15% de daño. Tal como se pudo observar en el apartado anterior, la suplementación semanal presenta menor índice de daño que la diaria (Gambaro y col., 2018 b). Ambos tipos de administración de la suplementación con sulfato ferroso (HD y HS), con la dosis más baja de vitamina E (8,3), tuvieron valores similares a los obtenidos en el apartado anterior, por lo que en este caso la misma no parecería sumar un efecto protector al sistema. Sin

embargo, al observar ambas suplementaciones con las dosis más altas de vitamina E (HD 16,6 y HS 16,6), el daño citomolecular disminuyó, por lo que si podríamos pensar en un efecto antioxidante al aumentar la dosis de dicha vitamina. Al respecto algunos autores encontraron resultados similares a los aquí presentados. Kan y colaboradores vislumbraron un claro efecto genoprotector de la suplementación con vitamina E en pacientes con diálisis después de 14 semanas de tratamiento; ellos observaron que el índice de daño disminuye 6 veces su valor (Kan y col., 2002). Según la bibliografía consultada si bien no hay un claro consenso, el índice de daño para los controles varía entre 1 y 30 aproximadamente para ensayos realizados *in vivo* (Martino-Roth y col., 2003; García y col., 2004). Este rango de referencia, se corresponde con los valores del control negativo y de los cultivos con suplementación semanal hallados en este trabajo. Mientras que en la suplementación diaria, los valores de daño serían levemente superiores a dicho rango, aunque este parámetro mejoraría después del tratamiento con la vitamina E. Por su parte, Ozdemir y colaboradores, quienes analizaron el daño en el ADN a partir del ensayo cometa, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes talasémicos suplementados con vitamina E durante 3 meses (Ozdemir y col., 2014).

Al igual a lo observado en el capítulo anterior, los niveles de hierro en el sobrenadante de la suplementación diaria son considerablemente más elevados que en la semanal. Contrariamente, se puede observar un leve incremento de hierro en los linfocitos de la suplementación semanal con respecto a la diaria. Una explicación plausible, podría ser que en la administración semanal están optimizados los mecanismos de absorción, regulación, transporte y almacenaje del hierro, evitando el aumento de las enzimas antioxidantes y, consecuentemente, un posible daño genético. Por el contrario, en la suplementación diaria se puede observar cierta sobrecarga de hierro que conllevaría al aumento observado de la respuesta de las enzimas antioxidantes y, con ello, a un mayor daño genético.

## 24. Consideraciones parciales

Los resultados del presente trabajo *in vitro* permiten sugerir que la vitamina E, por sus características antioxidantes, complementaría la respuesta de los antioxidante enzimáticos y ayudaría a disminuir el estrés oxidativo y el consecuente daño genómico ocasionado por el sulfato ferroso. Dicho efecto protector parecería ser mayor al aumentar al doble la dosis de ingesta diaria recomendada para lactantes (16,6). En función de los análisis de estrés oxidativo y de daño genético realizados, nuevamente la suplementación semanal se posiciona como una mejor alternativa que la diaria como método preventivo de la anemia ferropénica en niños menores de 24 meses. De este modo, realizar la administración conjunta de vitamina E con sulfato ferroso en dosis semanales, podría ser una estrategia a considerar para disminuir los efectos adversos que esta suplementación ocasiona.

## CAPÍTULO VIII. PROPUESTA ADICIONAL: NANOPARTÍCULAS DE VITAMINA E

### 25. Introducción

En base a cuestiones metodológicas relacionadas con el modelo experimental elegido para la realización de la presente tesis doctoral y a los hallazgos publicados en el campo de los nanobiomateriales, se procedió a encapsular la vitamina E en nanopartículas sólidas lipídicas (NSL). El propósito fue analizar si de este modo, se lograba efectivizar y potenciar el efecto antioxidante de dicha vitamina, disminuyendo o evitando así las complicaciones asociadas a la administración del sulfato ferroso, como suplemento preventivo de la anemia ferropénica. Para tal fin, se trabajó en colaboración con el laboratorio de Nanobiomateriales perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI, UNLP-CONICET).

Entre los diferentes vehículos para la administración de fármacos y moléculas, las NSL han surgido en los últimos años como sistemas óptimos para aplicaciones biológicas y biomédicas. La selección de este tipo de matrices lipídicas se basa en la ausencia de toxicidad y en sus propiedades de biocompatibilidad, de composición verde, en sus características fisicoquímicas y sus tamaños en la escala nanométrica, que les permiten penetrar en casi todos los tejidos y optimizar la biodistribución de las moléculas que transportan (Islan y col., 2018; B. Rodenak-Kladniew y col., 2019). Para mejorar las propiedades de las NSL, se ha desarrollado una nueva generación de nanopartículas denominadas transportadores lipídicos nanoestructurados (TLN). Consisten en nanopartículas lipídicas con lípidos líquidos incluidos en su estructura, lo cual permite disminuir el grado de cristalinidad de los lípidos constituyentes de la matriz. Mediante esta modificación, se logra una mejora tanto en la estabilidad de las nanopartículas durante su almacenamiento, como en el porcentaje de encapsulación de los fármacos y los perfiles de liberación (Fang y col., 2012). En este caso, el tocoferol (vitamina E), dada su naturaleza lipofílica, podría estar actuando de agente nanoestructurante de las NSL (Fig. 39). Las propiedades antioxidantes y fotoprotectoras que presenta la vitamina E,

resultan sumamente interesantes para el desarrollo de productos farmacéuticos y cosméticos. Sin embargo, su lipofilicidad y su inestabilidad química, así como su forma de administración, han limitado la eficacia de estas formulaciones. Han surgido muchos intentos de incluirla en diferentes sistemas de administración de fármacos (Saez y col., 2018), aunque su vehiculización resulta todavía un área a explorar con el fin de obtener formulaciones estables y versátiles a la hora de su administración. Cabe destacar, que su utilización como herramienta complementaria a la suplementación preventiva de la anemia ferropénica no ha sido reportada hasta el momento.

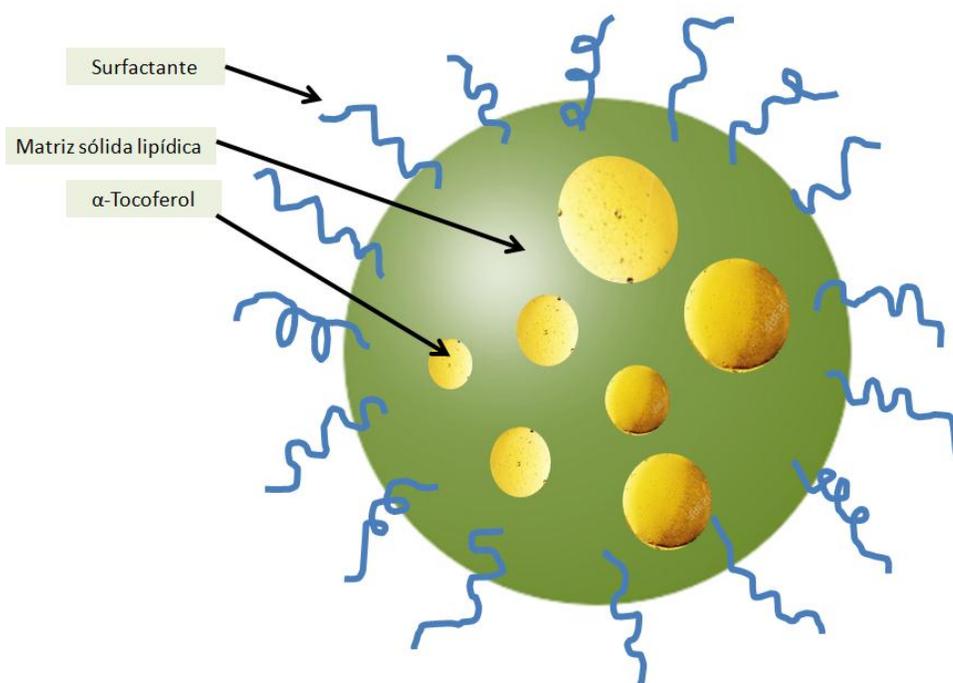


Figura 39. Representación de los componentes de una NSL para la vehiculización de vitamina E (tocoferol).

## 26. Materiales y métodos

### 26.1. Materiales

El lípido utilizado, denominado miristato de miristilo (Crodamol™ MM), fue donado por Croda (Argentina). El surfactante Pluronic®F68 (cat# A-6973) y la vitamina E (α-

tocoferol) fueron adquiridos en Sigma–Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Se utilizó agua Milli-Q para todas las formulaciones. Otros reactivos utilizados, fueron de grado analítico de fuentes disponibles en el mercado.

## **26.2. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL)**

### *Protocolo*

- Se utilizó el método de homogenización por ultrasonificación (Rodenak-Kladniew y col., 2019).
- Brevemente, 400 mg de lípido (2,0% p/v) se fundieron en un baño de agua a 60°C y se mezclaron con 200 mg de vitamina E.
- Después de 10 minutos, se añadió a la fase lipídica una solución acuosa caliente (20 ml) que contenía 3,0% (p/v) de Pluronic® F68.
- Inmediatamente, la mezcla se sometió a ultrasonido durante 15 minutos (70% de amplitud) usando un procesador ultrasónico (130 vatios, Cole-Parmer, EE. UU.) equipado con una punta de titanio de 3 mm.
- Luego, la dispersión se enfrió a temperatura ambiente y se almacenó a 5°C para su posterior uso.

## **26.3. Detección analítica de vitamina E por espectroscopia UV-Vis**

### *Protocolo*

- Se procedió con la preparación de una solución de vitamina E en etanol 90% con una concentración inicial de 10 mg/ml.
- Se realizaron diluciones sucesivas y se procedió a medir la absorbancia en el rango de longitudes de onda de 250 a 350 nm a fin de hallar el máximo de absorción (Fig. 40 a).
- Posteriormente, una vez identificado el máximo a  $\lambda_{\text{máx}} = 294$  nm, se realizó una curva de calibración a fin de establecer el rango de linealidad entre absorbancia y concentración.
- Se observó una relación lineal en el rango de concentraciones de 2,5 a 617,3  $\mu\text{g/ml}$  de vitamina E ( $r^2 = 0.998$ ) (Figura 40 b).

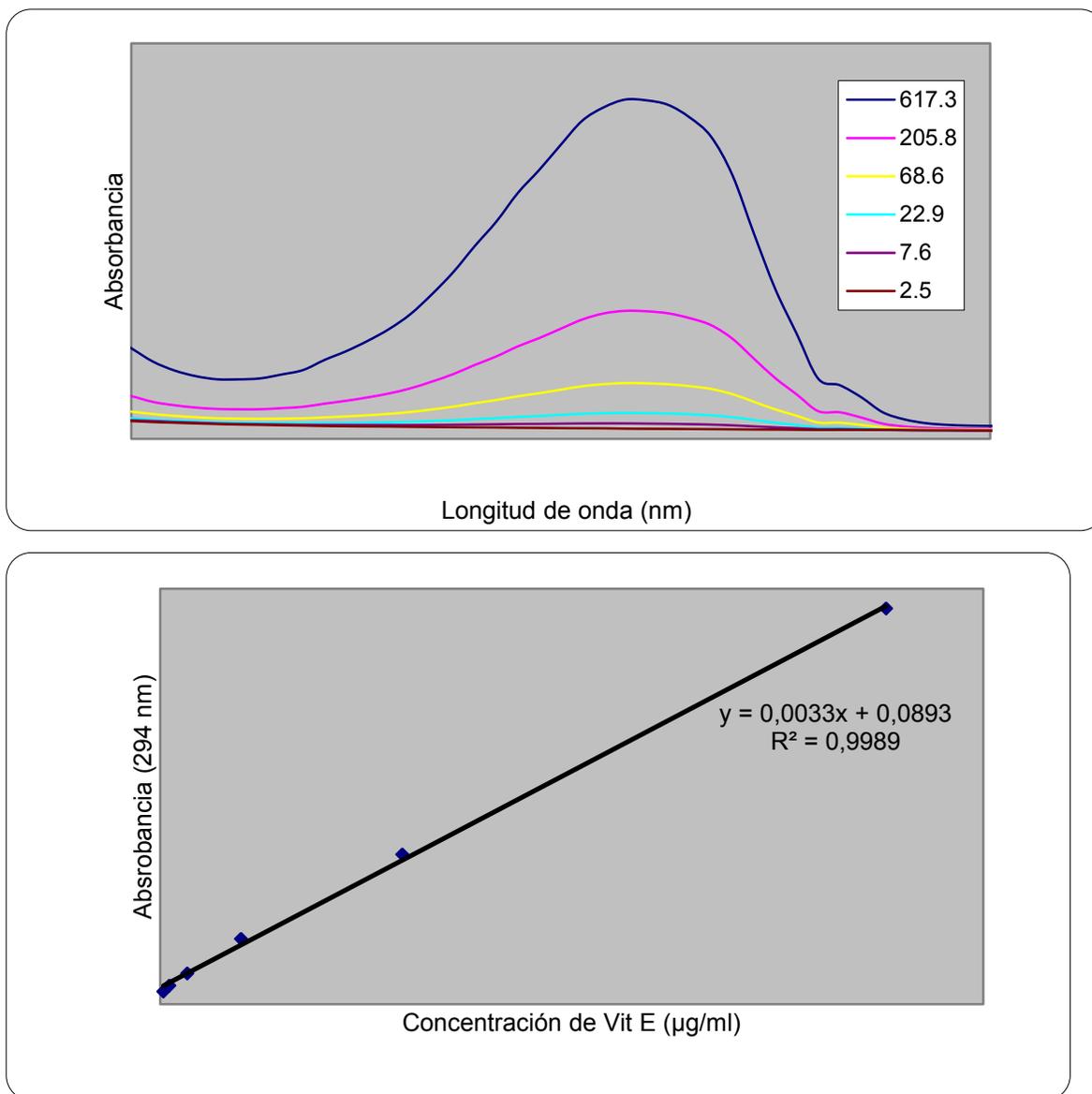


Figura 40. Detección analítica de vitamina E en etanol 90% vol/vol por espectroscopia UV-Vis. a) Barrido de absorbancia en el rango de 250 a 350 nm; b) Curva de calibración de vitamina E.

#### 26.4. Medición de la eficiencia de carga

##### Protocolo

- Se midió el volumen de reacción final, donde se produce evaporación durante el procedimiento de sonicación, y se determinó la concentración de vitamina E libre.

- Brevemente, se transfirieron 500 µl de la formulación de NSL a un dispositivo centrífugo de ultrafiltración (MWCO 10,000, Microcon, Millipore, Ma.) y se centrifugaron a 5,000 g durante 10 minutos para retener las NSL.
- El filtrado se diluyó diez veces en etanol absoluto para medir la vitamina E no encapsulada por espectroscopía UV-Vis ( $\lambda_{\text{máx}} = 294 \text{ nm}$ ).
- La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó de la siguiente manera:

$$EE (\%) = \frac{(Q_0 - (Cr \times V)) \times 100}{Q_0}$$

$Q_0$  es la cantidad inicial de vitamina E, Cr es la concentración de vitamina E en la solución filtrada y V es el volumen final después de terminar la preparación.

### **26.5. Tamaño de partícula, potencial zeta ( $Z_{\text{pot}}$ ) e índice de polidispersión (IPD)**

#### *Protocolo*

- El diámetro medio y la distribución del tamaño de las NSL se determinaron mediante espectroscopía de correlación de fotones DDL (dispersión dinámica de luz) en un Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments Corp, Reino Unido) a 25°C en cubetas de poliestireno con una longitud de trayectoria de 10 mm.
- El  $Z_{\text{pot}}$  que nos indica la carga superficial de las NSL, se determinó mediante anemometría láser Doppler también usando el Zetasizer Nano ZS.
- Las mediciones se realizaron en células capilares con longitudes de trayectoria de 10 mm, utilizando agua desionizada obtenida de un sistema Milli-Q.
- Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### **26.6. Estabilidad física**

#### *Protocolo*

- La estabilidad física de la dispersión de nanopartículas se evaluó examinando cambios macroscópicos (presencia de agregados, división de fases y precipitados) y mediante

cambios del tamaño medio de partícula y el  $Z_{pot}$  durante el almacenamiento a 4°C protegidos de la luz por 6 meses.

- Además, se determinaron las variaciones en la cantidad de la vitamina E encapsulada.

### **26.7. Observación de NSL por microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Se analizó presencia, dispersión, morfología y estabilidad (presencia de agregados) de las NSL.

#### *Protocolo*

- La dispersión de nanopartículas se diluyó diez veces con agua ultra pura y una gota de la dispersión se extendió sobre una rejilla de Cu recubierta con colodión (malla 400).

- El exceso de líquido se drenó con papel de filtro.

- Se añadió una gota de ácido fosfotúngstico a la dispersión, para mejorar el contraste.

- Finalmente, el análisis TEM se realizó utilizando el microscopio Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol USA, Ma.).

### **26.8. Hemotoxicidad**

#### *Protocolo*

- La sangre extraída previamente con heparina se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos.

- Se desechó el plasma, y el concentrado de eritrocitos se lavó tres veces con *buffer* fosfato salino (PBS) pH 7,4.

- Se preparó una suspensión de eritrocitos al 25% con el mismo *buffer* y se colocaron 2 ml por well.

- A cada well se le adicionó una concentración conocida de NPS, en una placa de 12 wells.

- Se resuspendió y se mantuvo en agitación constante durante 1 y 3 hs a temperatura ambiente.

- Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se desechó el precipitado.

- Debido a que es posible determinar el porcentaje de eritrocitos lisados por medio de la cuantificación de hemoglobina liberada, se leyó la absorbancia de 100 µl de suspensión a 540 nm en un espectrofotómetro.
- Se estableció el 100% de hemólisis mediante la incorporación de tritón X-100 (1%) en el medio, y como control negativo se utilizó solución fisiológica.

### **26.9. Viabilidad celular**

- Para evaluar la viabilidad celular, se utilizó el ensayo de MTT descrito en la Métodos y Técnicas (Capítulo V) en cultivos de sangre periférica.
- En el diseño experimental propuesto para la combinación de la vitamina E y el sulfato ferroso, sólo se reemplazó la vitamina E por las NSL con la vitamina E encapsulada (NSL-E).
- Se agregaron dos controles de las nanopartículas sin la vitamina E encapsulada (NSL 16,6 y NSL 33,2) para descartar la potencial toxicidad del resto de sus componentes.

#### *Diseño Experimental*

1. Control negativo (CN): sin tratar.
2. Control de nanopartículas 1: 16,6 µg/ml de NSL (NSL 16,6).
3. Control de nanopartículas 2: 33,2 µg/ml de NSL (NSL 33,2).
4. Control de nanopartículas (16,6 µg/ml de NSL) más vitamina E<sub>1</sub>: 8,3 µg/ml (NSL-E 8,3)
5. Control de nanopartículas (33,2 µg/ml de NSL) más vitamina E<sub>2</sub>: 16,6 µg/ml (NSL-E 16,6)
6. Suplementación hierro semanal 1: 0,55 mg/ml + vitamina E 8,3 µg/ml (HS NSL-E 8,3).
7. Suplementación hierro semanal 2: 0,55 mg/ml + vitamina E 16,6 µg/ml (HS NSL-E 16,6).
8. Suplementación hierro diario 1: 0,14 mg/ml + vitamina E 8,3 µg/ml (HD NSL-E 8,3).
9. Suplementación hierro diario 2: 0,14 mg/ml + vitamina E 16,6 µg/ml (HD NSL-E 16,6).
10. Control positivo (CP): etanol 10%.

## 27. Resultados

Tal como fuera explicitado en Metodología, se desarrollaron NSL mediante el método de homogenización por ultrasonificación y se obtuvieron formulaciones estables. Se logró encapsular eficientemente la vitamina E en NSL con un porcentaje de encapsulación del 90% y una relación de vitamina E/lípido de 500 µg/mg.

Tal como se observa en la Tabla 31, las NSL mostraron un diámetro medio de 145,9 nm con un índice de polidispersividad relativamente bajo (<0,3). Las mediciones de carga superficial ( $Z_{pot}$ ), evidenciaron que las nanopartículas poseen carga negativa. Por su parte, la incorporación de vitamina E en las NSL generó un aumento en el tamaño medio de las nanopartículas con un diámetro de 228 nm. A su vez, se observó un incremento de la polidispersividad con un valor de PDI de 0,335 y mayor negatividad en superficie. No obstante, cabe aclarar que ambos tipos de nanopartículas presentan valores de carga y polidispersividad aptos para su aplicación en sistemas biológicas (Danaei y col., 2018; Rodenak-Kladniew y col., 2019).

Formulación	NSL	NSL-E
Miristato de Miristilo	2,0 %	2,0 %
Pluronic F68	3,0 %	3,0 %
Vitamina E	-	1,0 %
Tamaño (nm)	145,9 (0,9)	228,2 (3,5)
Z Pot (mV)	3,86 (2,2)	8,92 (2,2)
IPD	0,032 (0,004)	0,335 (0,015)

Tabla 31. Caracterización por dispersión dinámica de luz (DDL) de las NSL vacías y cargadas con vitamina E ( $\alpha$  tocopherol). Entre paréntesis el desvío estándar.

El gráfico de distribución de tamaño de las formulaciones indica la presencia de una suspensión homogénea en el caso de las NSL (Fig. 41). Por su parte, la distribución de las NSL-E muestra una población que posee un tamaño medio alrededor de los 250 nm (mayor al 90%) y una pequeña población con un tamaño cercano de 50 nm (menor al

10%). Esta pequeña fracción puede deberse a la presencia de micelas formadas por la vitamina E no encapsulada y el tensio-activo utilizado, lo cual ha sido previamente reportado para la encapsulación de compuestos de base oleosa o de alta hidrofobicidad (Rodenak-Kladniew y col., 2017).

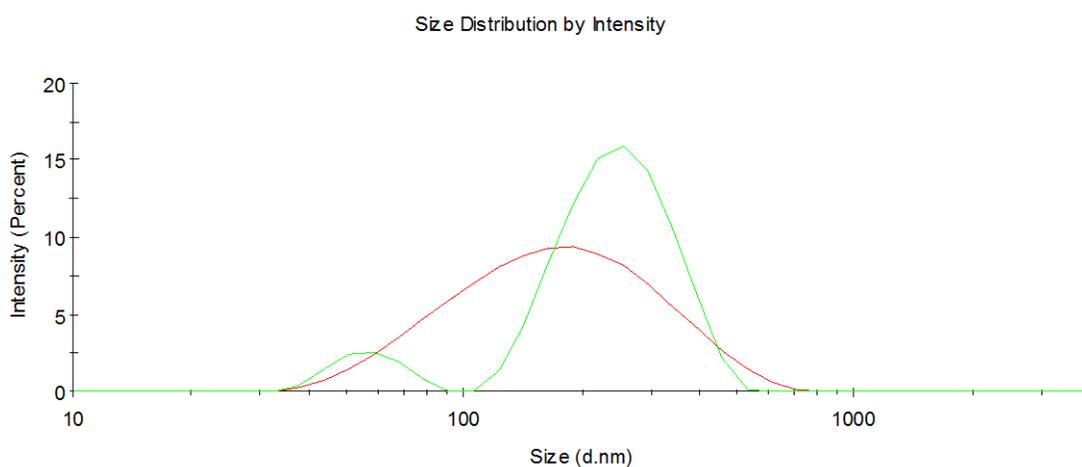
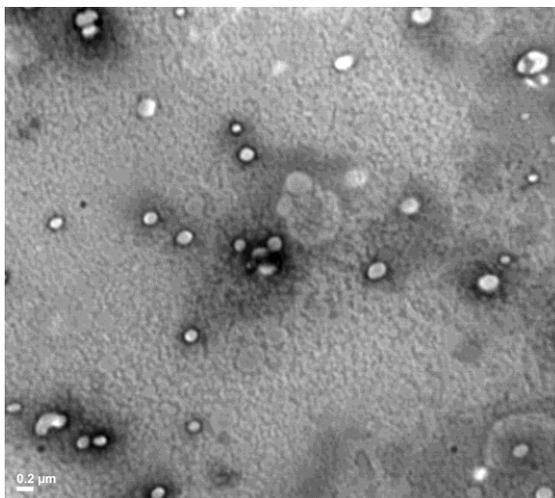
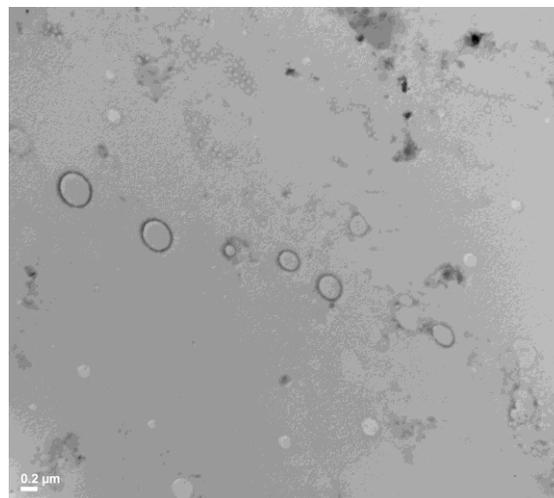


Figura 41. Distribución de tamaño de las NSL (rojo) y las NSL/vitamina E (verde).

Finalmente, la formación de las nanopartículas fue confirmada por microscopía electrónica de transmisión (Fig. 42). Se puede observar la presencia de nanopartículas homogéneas, esféricas y sin la presencia de agregados. Las NSL conteniendo vitamina E muestran un tamaño mayor que las NSL vacías en concordancia con las mediciones realizados por DDL.



**NSL**



**NSL-E**

*Figura 42. Microscopia electrónica de transmisión de las formulaciones.*

Una vez confeccionado el diseño y realizada la encapsulación de la vitamina E en las nanopartículas, se procedió a la evaluación de la hemotoxicidad de las mismas en distintas concentraciones. Se evaluaron, por un lado, las nanopartículas vacías (NSL) y, por el otro, las nanopartículas con vitamina E encapsulada (NSL-E), con el propósito de determinar si alguno de ambos compuestos podía ocasionar hemólisis.

Dado que los resultados de hemotoxicidad no responden a una distribución normal, los mismos se analizaron con el ensayo de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre las concentraciones registrados a una hora (Fig. 43) resultaron estadísticamente significativos ( $p = 0,019$ ), al igual que a las tres horas (Fig. 44) ( $p = 0,020$ ). El 100% de hemólisis la registró el CP con tritón al 1%, la cual superó ampliamente los valores para el resto de los puntos experimentales con diferentes concentraciones de nanopartículas. Ninguna de las concentraciones testeadas para las nanopartículas control ni para las nanopartículas con vitamina E, superaron el 1% de hemólisis. De este modo, ni los compuestos de las nanopartículas ni la vitamina E encapsulada resultarían hemotóxicas en las concentraciones aquí evaluadas, lo cual sustenta su potencial aplicación en sistemas biológicos.

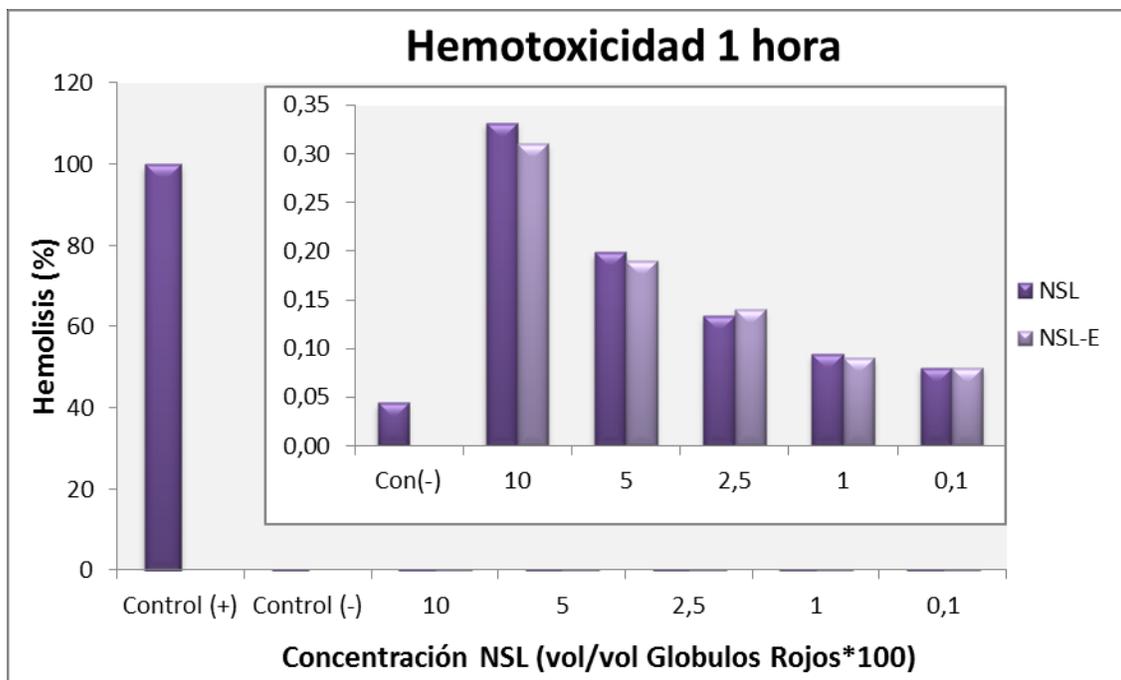


Figura 43. Ensayo hemotoxicidad. Nanopartícula sólida lipídica (NSL), control Nanopartícula sólida lipídica con vitamina E (NSL-E). Las diferencias entre los valores registrados a una hora resultaron estadísticamente significativas ( $p = 0,019$ ). En el recuadro se observan los valores que no se ven por la escala de los resultados. Los valores corresponden a los porcentajes.

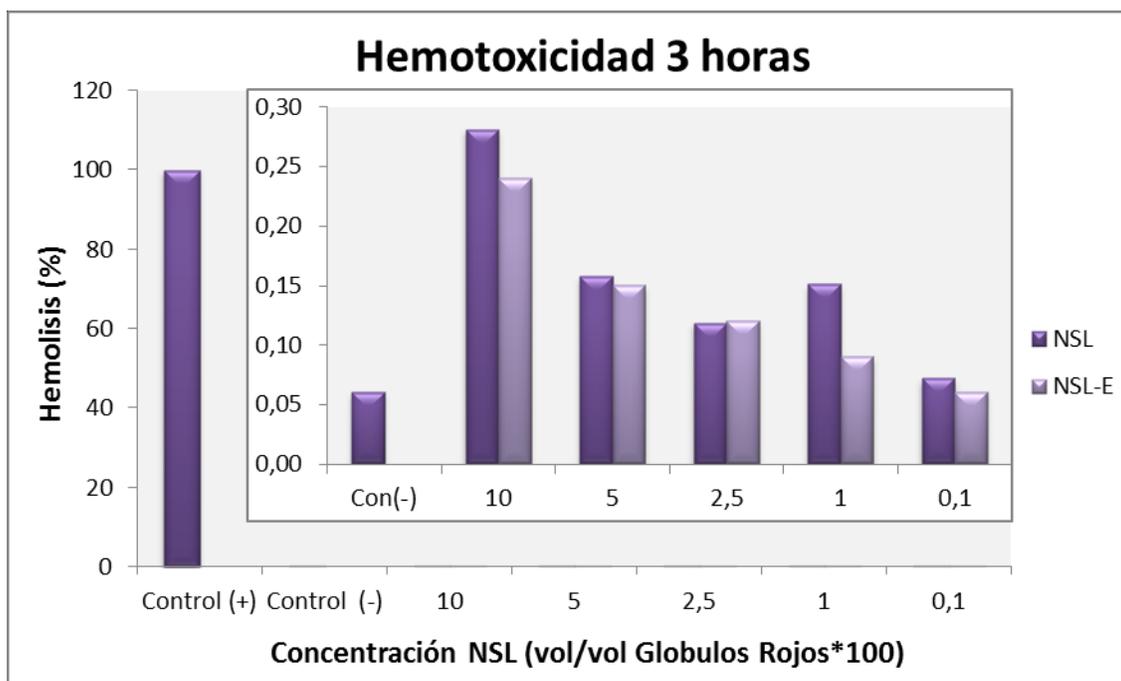


Figura 44. Ensayo hemotoxicidad. Nanopartícula sólida lipídica (NSL), Nanopartícula sólida lipídica vitamina E (NSL-E). Las diferencias entre los valores registrados para las tres horas resultaron estadísticamente significativas ( $p=0,020$ ). En el recuadro se observan los valores que no se ven por la escala de los resultados. Los valores se corresponden a los porcentajes.

En las Figuras 45 y 46 se comparan los resultados a 1 hora y a 3 horas para las NSL (Fig. 45) y para las NSL-E en todas las concentraciones (Fig. 46). En el caso de las nanopartículas control (NSL), en las dos primeras concentraciones (0,1 y 1) aumentó levemente la hemólisis a las 3 horas y en las concentraciones más altas, se observó una disminución de la misma (Tabla 32).

NSL	1HS	3HS
<b>Control (-)</b>	0,04 (0,001)	0,06 (0,0008)
<b>NSL 0,1</b>	0,08 (0,0021)	0,15 (0,002)
<b>NSL 1</b>	0,09 (0,0024)	0,15 (0,033)
<b>NSL 2,5</b>	0,13 (0,0025)	0,12 (0)
<b>NSL 5</b>	0,20 (0,0027)	0,16 (0,03)
<b>NSL 10</b>	0,33 (0,0005)	0,28 (0,017)

Tabla 32. Ensayo de Hemotoxicidad. Comparación de la hemólisis a diferentes tiempos de exposición a las nanopartículas sin vitamina E (NSL) (1 HORA ( $p = 0,019$ ) y 3 horas ( $p=0,020$ )). Corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

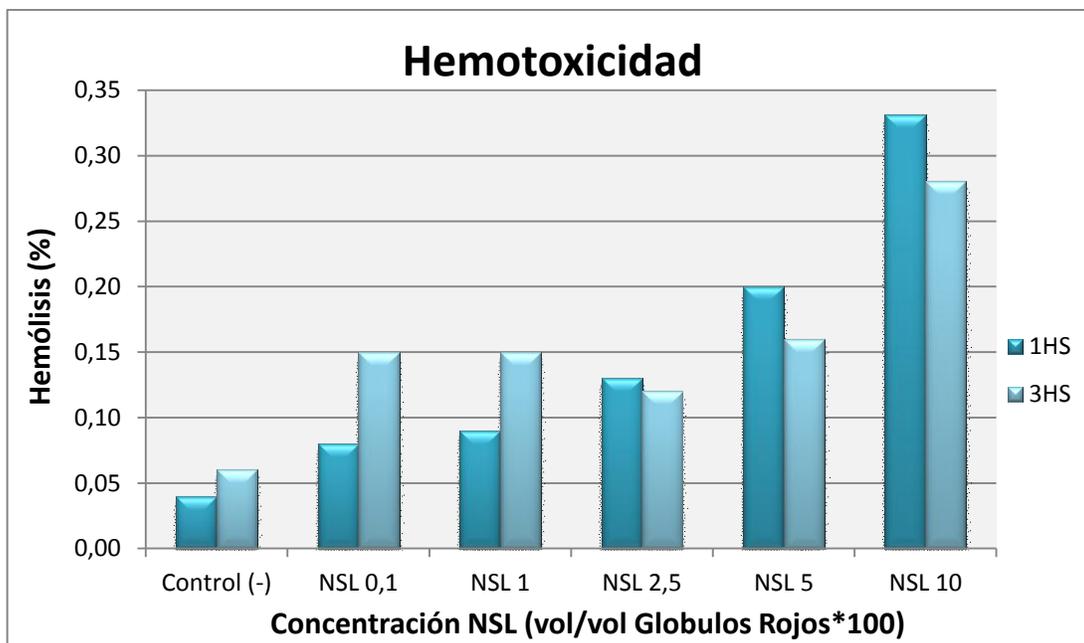


Figura 45. Ensayo de hemotoxicidad. Comparación de la hemólisis a diferentes tiempos de exposición a las nanopartículas sin vitamina E (NSL) (1 y 3 horas).

En el caso de las nanopartículas con la vitamina E encapsulada (NSL-E), en todas las concentraciones, la hemólisis disminuyó pasadas las 3 horas (Tabla 33, Fig. 46).

NSL-E	1HS	3HS
Control (-)	0,04 (0,001)	0,06 (0,0008)
NSL-E 0,1	0,08 (0,006)	0,06 (0,007)
NSL-E 1	0,09 (0,005)	0,09 (0,002)
NSL-E 2,5	0,14 (0,006)	0,12 (0,004)
NSL-E 5	0,19 (0,002)	0,15 (0,0003)
NSL-E 10	0,31 (0,002)	0,24 (0,0003)

Tabla 33. Ensayo de hemotoxicidad. Comparación de la hemólisis a diferentes tiempos de exposición a las nanopartículas con vitamina E (NSL-E) (1 y 3 horas). Corresponden al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis.

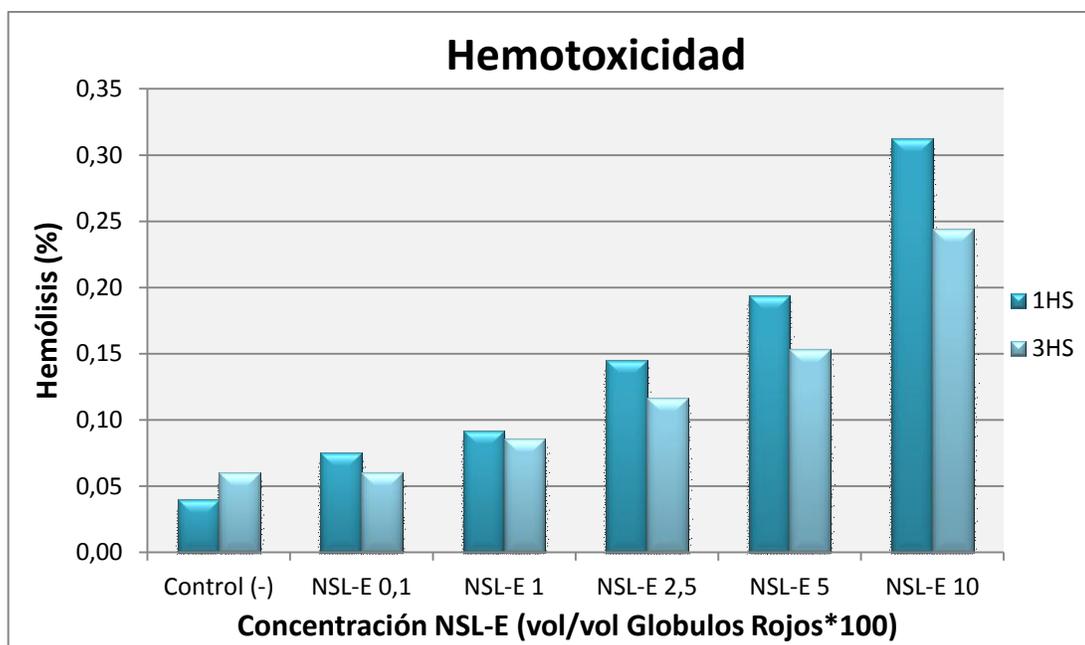


Figura 46. Ensayo de hemotoxicidad. Comparación de la hemólisis a diferentes tiempos de exposición a las nanopartículas con vitamina E (NSL-E) (1 y 3 horas).

Cabe destacar que en ambos casos las diferencias son despreciables, y que la hemólisis es prácticamente nula para ambas nanopartículas en todas las concentraciones. De hecho ninguna de las concentraciones supera el 1% de hemotoxicidad.

Una vez testeados los controles de nanopartículas y vitamina E, se procedió a evaluar la viabilidad celular en el diseño experimental propuesto, mediante el ensayo de MTT (Tabla 34, Fig. 47). Para comparar los valores obtenidos para los distintos puntos experimentales, se utilizó el ensayo de ANOVA simple. Las diferencias observadas, resultaron estadísticamente significativas ( $p= 0,0000$ ). Con la prueba de contraste de múltiples rangos, se detectaron seis grupos organizados de mayor a menor viabilidad: a) HS NSL-E 16,6 b) NSL-E 8,3; NSL-E 16,6; HS NSL-E 8,3 c) HD NSL-E 16,6 d) HD NSL-E 8,3 e) CN; NSL 16,6; NSL 33,2 f) CP. Como se pudo observar, la mayor viabilidad se presentó en la administración conjunta de hierro semanal con la dosis más alta de vitamina E encapsulada. Cabe destacar que todos los cultivos suplementados con vitamina E encapsulada presentaron porcentajes de viabilidad mayores incluso que el control negativo. Los controles de las NSL sin vitamina E arrojaron valores similares a los del

control negativo y la menor viabilidad observada se encuentra como es de esperarse en el control.

Técnica	CN	NSL-E 8,3	NSL-E 16,6	NSL 16,6	NSL 33,2	HS NSL- E 8,3	HS NSL- E 16,6	HD NSL- E 8,3	HD NSL- E 16,6	CP
MTT	57 (7,07)	85,51 (2,83)	87,54 (2,12)	58 (9,9)	58,5 (2,12)	83,04 (4,95)	100 (3,54)	71,39 (1,41)	80,38 (2,83)	11 (2,83)

Tabla 34. Ensayo MTT. Valores en porcentaje correspondientes al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis. El 100% corresponde al valor de mayor viabilidad.

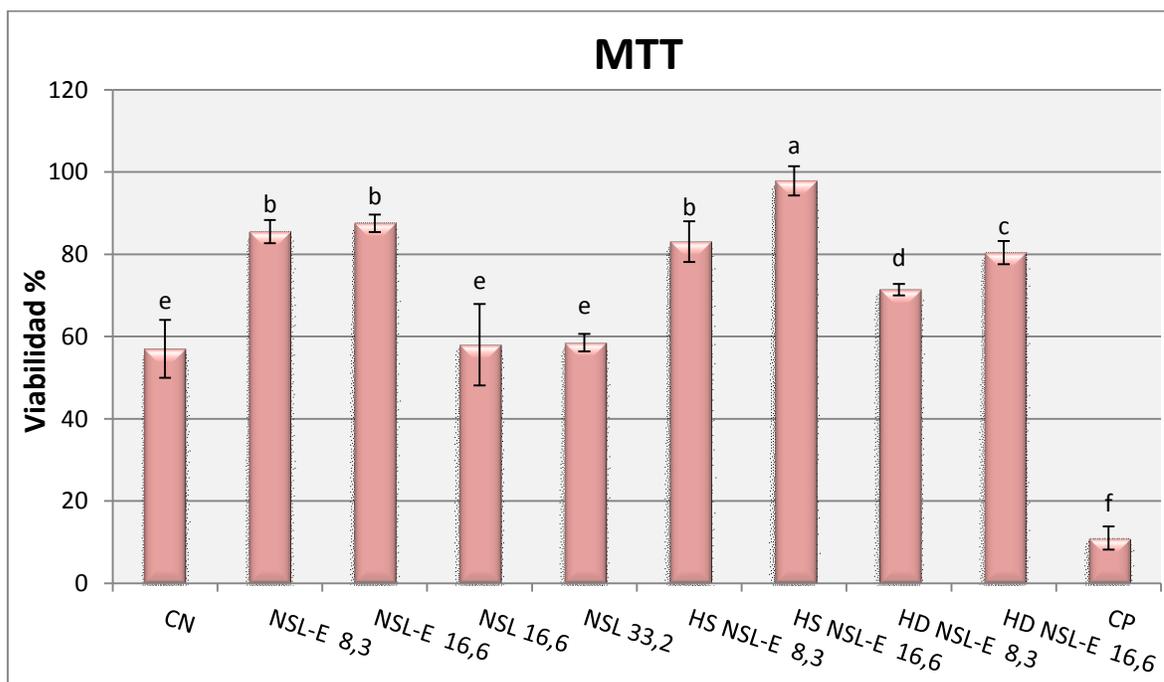


Figura 47. Ensayo MTT. Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (ANOVA simple  $p=0,0000$ ). Los valores se corresponden a los porcentajes y las barras al desvío estándar.

En la tabla 35 y la figura 48, se presenta la comparación de los resultados del MTT entre los cultivos con la vitamina E encapsulada y sin encapsular. Sólo se encontraron

diferencias para la suplementación diaria con 8,3 de vitamina E (HD NSL-E 8,3), la cual resultó significativamente superior para la administración encapsulada ( $p= 0,021$ ).

Cultivos	s/NSL-E	c/NSL-E
<b>CN</b>	53 (2,5)	57 (7,07)
<b>C 8,3</b>	72,95 (2,5)	85,51 (2,83)
<b>C 16,6</b>	80,27 (0,4)	87,54 (2,12)
<b>HS 8,3</b>	79,7 (0,3)	83,04 (4,95)
<b>HS 16,6</b>	100 (0,5)	97,04 (3,54)
<b>HD 8,3</b>	44,82 (0,4)	71,39 (1,41)
<b>HD 16,6</b>	73,09 (1,0)	80,38 (2,83)
<b>CP</b>	9 (1,0)	11 (2,83)

*Tabla 35. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular entre los cultivos con la vitamina E sin encapsular (suplementación clásica) vs. encapsulada. HD 8,3 s/NSL-E vs. HD 8,3 c/NSL-E ( $p= 0,021$ ) el resto no resultó estadísticamente significativo. Valores en porcentaje correspondientes al promedio de los 3 bloques experimentales, el DE se indica entre paréntesis. El 100% corresponde al valor de mayor viabilidad.*

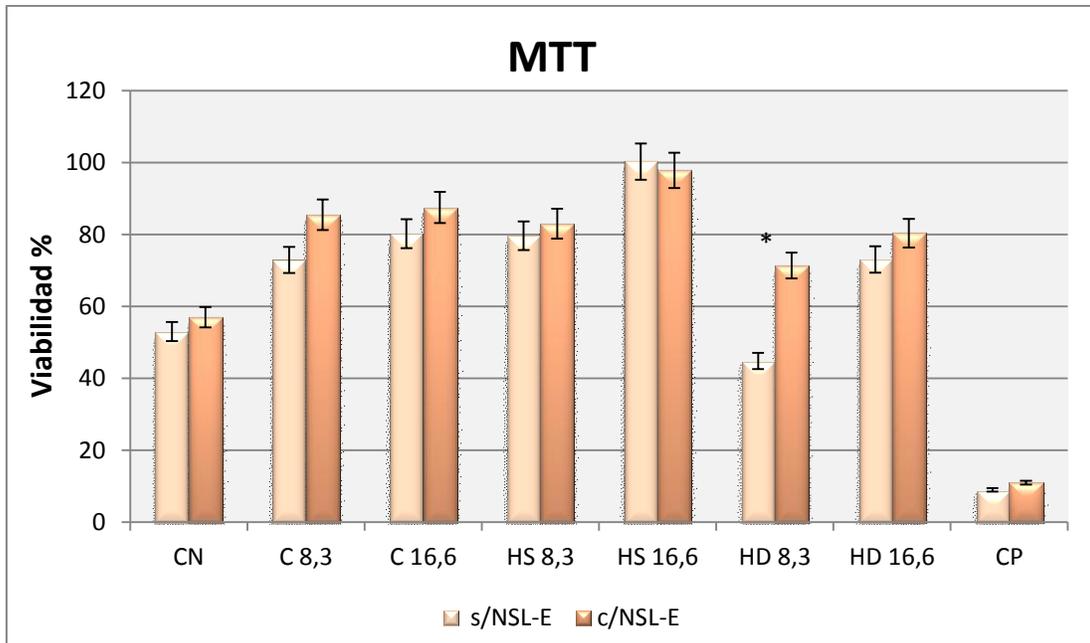


Figura 48. Ensayo MTT. Comparación de la viabilidad celular entre los cultivos con la vitamina E sin encapsular vs. encapsulada. Diferencias estadísticamente significativas (\*) ( $p=0,021$ ). Los valores se corresponden a los porcentajes y las barras al desvío estándar.

## 28. Discusión

En base a los estudios desarrollados, se pudo observar que las nanopartículas no generan ningún tipo de hemotoxicidad y que, a su vez, no comprometen la viabilidad celular de los linfocitos. Estos hallazgos resultan prometedores para su aplicación en sistemas biológicos. En las células suplementadas con las dosis más altas de vitamina E (16,6), se observa mayor viabilidad para ambas formas de administración del hierro. A su vez, ambos controles de las nanopartículas sin vitamina E presentan aproximadamente un 100% de viabilidad celular, al igual que el CN, lo que remarca el carácter no tóxico de la formulación de las nanopartículas. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas en la viabilidad celular en la comparación con los resultados de la vitamina E no encapsulada. Este hecho resulta importante para resaltar la ausencia de hemólisis en los cultivos a largo plazo. En los trabajos publicados hasta el momento respecto de esta temática, la mayoría realizados *in vitro*, se destaca principalmente la utilización de las nanopartículas con vitamina E encapsulada para usos cosméticos y de futura aplicación tópica. En general, la citotoxicidad reportada es baja (Saez y col., 2018). Ma y colaboradores, evidenciaron que las suspensiones concentradas de NSL-E (1: 50–1: 200) afectaron la actividad celular, mientras que las concentraciones más diluidas se comportan de manera más similar al control. La concentración de NSL-E (1: 600) no presentó ninguna citotoxicidad (Ma y col., 2007).

## **29. Consideraciones parciales**

En el presente capítulo se replicó el modelo desarrollado en sangre para evaluar los efectos de la co-suplementación de hierro con la vitamina E, a partir del uso de una técnica innovadora, tal como lo es la vehiculización por medio de nanopartículas. El propósito del mismo, fue evaluar si la adición de la vitamina E a través de un sistema de liberación controlada lograba mejores resultados que la suplementación clásica. En este sentido, no se observaron diferencias para la viabilidad celular según la forma de incorporación de la vitamina E.

A raíz de la pandemia COVID-19 y el consecuente aislamiento preventivo obligatorio, no fue posible realizar el resto de los ensayos correspondientes para aplicar la suplementación de la vitamina E encapsulada a los cultivos de sangre periférica entera. Por lo tanto, se espera que los resultados promisorios obtenidos con el presente desarrollo tengan una potencial aplicación, la cual pueda ser explorada en el futuro como herramienta novedosa para la suplementación preventiva de micronutrientes esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de la población infantil.

## CAPÍTULO IX. CONSIDERACIONES FINALES

### 30. Conclusiones

- A partir de la administración de suplementos de sulfato de hierro en dosis diarias, se puede observar cierta sobrecarga de dicho mineral que conllevaría a un leve aumento del estrés oxidativo. Si bien se evidencia un aumento en la respuesta antioxidante, se acompaña por un incremento en los indicadores de estrés oxidativo y de daño genético, lo que podría implicar un desequilibrio del sistema de óxido-reducción, en favor de un mayor estrés comparado con la suplementación semanal.
- En la suplementación semanal, los mecanismos de absorción, regulación, transporte y almacenaje del hierro parecerían estar optimizados, el hierro estaría neutralizado (no reactivo), dado que no conlleva una respuesta antioxidante enzimática y tampoco un aumento considerable de los indicadores de estrés oxidativo. A su vez, esto podría asociarse con el menor efecto sobre el material genético observado en comparación a la suplementación diaria.
- La vitamina E, por ser un antioxidante no enzimático, complementaría la respuesta de los enzimas antioxidantes y ayudaría a disminuir el estrés oxidativo y el efecto sobre el material genético ocasionado por el sulfato ferroso. Asimismo, la acción de la vitamina E se ve incrementada cuando se utiliza el doble de la dosis de ingesta diaria recomendada para lactantes.
- La administración de vitamina E a través de un sistema que implica la liberación controlada de nanopartículas sólidas lipídicas parecería constituirse como una herramienta novedosa y efectiva. Sin embargo, a causa de los sucesos de

público conocimiento relacionados con el virus del COVID-19 sólo se pudo evaluar la viabilidad celular. De todos modos, este desarrollo podrá tener una potencial aplicación a ser explorada en el futuro como herramienta innovadora para la suplementación de micronutrientes importantes para el normal crecimiento y desarrollo de los niños.

En función de los análisis de viabilidad celular, estrés oxidativo y de daño genético realizados *in vitro* en sangre periférica, la suplementación semanal se posiciona como una mejor alternativa para la prevención de la anemia ferropénica por sobre la administración diaria. La administración conjunta de vitamina E con sulfato ferroso en dosis semanales, podría ser una estrategia plausible para disminuir algunos de los efectos adversos que esta suplementación ocasiona. Quizá así se pueda lograr un mayor cumplimiento de la suplementación preventiva y disminuir de este modo la prevalencia de anemia en niños menores de 24 meses.

### **31. Perspectivas futuras**

Sería necesario poder complementar los resultados obtenidos en el presente plan de tesis con el desarrollo de modelos *in vivo* que permitan evaluar holísticamente las implicancias de ambas formas de administración de la suplementación preventiva de la anemia ferropénica y comparar los resultados con los aquí obtenidos.

En este apartado se considera importante recordar que todos los niños tienen derecho a la salud, a una nutrición adecuada y a que se combatan las enfermedades y la malnutrición en el marco de la atención primaria para la salud. A pesar de ello, la anemia por deficiencia de hierro en niños menores de 24 meses sigue siendo un problema que afecta a nivel mundial y que todavía continúa sin resolverse. Es en este contexto que resulta fundamental el diseño, a partir de una base científica, de políticas públicas que hagan hincapié en la educación nutricional. Es vital concientizar sobre el problema y generar un cuidado social que traspase los programas prediseñados y el clásico enfoque asistencialista que revela la desatención de la dimensión social del problema. Desde un enfoque antropológico, la alimentación constituye un proceso sumamente complejo, donde se deben considerar no sólo cuestiones de carácter biológico, sino también ideológicas, económicos y sociales.

Como se mencionó anteriormente, una nutrición inadecuada en la infancia tiene importantes repercusiones no sólo sobre el crecimiento y desarrollo de los niños sino también sobre la salud en la vida adulta. Consecuentemente, resulta clave la atención que se les brinde a los niños y las acciones que se emprendan en la primera infancia, ya que constituyen la base fundamental del proceso holístico que permitirá la integración y el desarrollo del adulto en la sociedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abtahi, M., Neyestani, T. R., Pouraram, H., Siassi, F., Dorosty, A. R., Elmadfa, I., y Doustmohammadian, A. (2014). Iron-fortified flour: Can it induce lipid peroxidation? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(5), 649-654.  
<https://doi.org/10.3109/09637486.2014.898254>
- Aebi, H. (1974). Catalase. En H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)* (pp. 673-684). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Agarwal, K. N., Gomber, S., Bisht, H., y Som, M. (2003). Anemia prophylaxis in adolescent school girls by weekly or daily iron-folate supplementation. *Indian Pediatrics*, 40(4), 296-301.
- Agmon, E., y Stockwell, B. R. (2017). Lipid homeostasis and regulated cell death. *Current Opinion in Chemical Biology*, 39, 83-89.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.06.002>
- Aguirre J, Donato MI, Buscio M, Ceballos V, Armeno M, Aizpurúa L, y Arpí L. (2019). [Serious neurological compromise due to vitamin B12 deficiency in infants of vegan and vegetarian mothers]. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 117(4), e420-e424.  
<https://doi.org/10.5546/aap.2019.e420>
- Aguirre, P. (2005). Contribución para el diseño de una política alimentaria. *Centro interdisciplinario para el estudio de las políticas públicas (CIEPP)*.

- Akarsu, S., Demir, H., Selek, S., y Oguzoncul, F. (2013). Iron deficiency anemia and levels of oxidative stress induced by treatment modality. *Pediatrics International*, 55(3), 289-295. <https://doi.org/10.1111/ped.12054>
- Aksu, B. Y., Hasbal, C., Himmetoglu, S., Dincer, Y., Koc, E. E., Hatipoglu, S., y Akcay, T. (2010). Leukocyte DNA damage in children with iron deficiency anemia: Effect of iron supplementation. *European Journal of Pediatrics*, 169(8), 951-956. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1147-1>
- Alcântara, D. D. F. A., Ribeiro, H. F., Matos, L. A., Sousa, J. M. C., Burbano, R. R., y Bahia, M. O. (2013). Cellular responses induced in vitro by iron (Fe) in a central nervous system cell line (U343MGa). *Genetics and Molecular Research*, 12(2), 1554-1560. <https://doi.org/10.4238/2013.May.13.9>
- Algarín, C., Peirano, P., Garrido, M., Pizarro, F., y Lozoff, B. (2003). Iron Deficiency Anemia in Infancy: Long-Lasting Effects on Auditory and Visual System Functioning. *Pediatric Research*, 53(2), 217-223. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000047657.23156.55>
- Altamura, S., Vegi, N. M., Hoppe, P. S., Schroeder, T., Aichler, M., Walch, A., Okreglicka, K., Hültner, L., Schneider, M., Ladinig, C., Kuklik-Roos, C., Mysliwietz, J., Janik, D., Neff, F., Rathkolb, B., de Angelis, M. T. H., Buske, C., Silva, A. R. da, Muedder, K., ... Bornkamm, G. W. (2020). Glutathione peroxidase 4 and vitamin E control reticulocyte maturation, stress erythropoiesis and iron homeostasis. *Haematologica*, 105(4), 937-950. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.212977>

- Altun, D., Kurekci, A. E., Gursel, O., Hacıhamdioglu, D. O., Kurt, I., Aydın, A., y Ozcan, O. (2014). Malondialdehyde, Antioxidant Enzymes, and Renal Tubular Functions in Children with Iron Deficiency or Iron-Deficiency Anemia. *Biological Trace Element Research*, 161(1), 48-56. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0084-7>
- Angeli, J. P. F., Shah, R., Pratt, D. A., y Conrad, M. (2017). Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(5), 489-498. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.02.005>
- Apezteguia, M. C., Varea, A., Disalvo, L., Malpeli, A., y González, H. F. (2008). *Deficiencia de micronutrientes en niños de 1 a 3 años de familias de bajos ingresos en dos regiones de la provincia de Buenos Aires (Argentina)*. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica . Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica, Cusco.
- Arnon, S., Regev, R. H., Bauer, S., Shainkin-Kestenbaum, R., Shiff, Y., Bental, Y., Dolfin, T., y Litmanovitz, I. (2009). Vitamin E levels during early iron supplementation in preterm infants. *American Journal of Perinatology*, 26(5), 387-392. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1214233>
- Aslan, M., Horoz, M., Kocyigit, A., Ozgonül, S., Celik, H., Celik, M., y Erel, O. (2006). Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 601(1-2), 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.06.013>

- Avula, C. P., y Fernandes, G. (2000). Effect of dietary vitamin E on apoptosis and proliferation of murine splenocytes. *Nutrition Research*, 20(2), 225-236.  
[https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(99\)00155-4](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00155-4)
- Aycicek, A., Koc, A., Oymak, Y., Selek, S., Kaya, C., y Guzel, B. (2014). Ferrous Sulfate (Fe<sup>2+</sup>) Had a Faster Effect Than Did Ferric Polymaltose (Fe<sup>3+</sup>) on Increased Oxidant Status in Children With Iron-deficiency Anemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 36(1), 57-61.  
<https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e318299c91a>
- Bartkova, J., Meyts, E. R.-D., Skakkebaek, N. E., Lukas, J., y Bartek, J. (2007). DNA damage response in human testes and testicular germ cell tumours: Biology and implications for therapy. *International Journal of Andrology*, 30(4), 282-291.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00772.x>
- Beard, J. L. (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *The Journal of Nutrition*, 131(2S-2), 568S-579S; discussion 580S.
- Bergel Sanchís, M. L., Cesani, M. F., y Oyhenart, E. E. (2017). Malnutrición infantil e inseguridad alimentaria como expresión de las condiciones socio-económicas familiares en Villaguay, Argentina (2010-2012). Un enfoque biocultural(). *Población y Salud en Mesoamérica*, 14(2), 60-85. <https://doi.org/10.15517/psm.v14i2.27305>
- Borenfreund, E., y Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2-3), 119-124.
- Cappellini, M. D., Musallam, K. M., y Taher, A. T. (2019). Iron deficiency anaemia revisited. *Journal of Internal Medicine*, 287(2), 153-170. <https://doi.org/10.1111/joim.13004>

- Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *The Journal of Experimental Medicine*, 15(5), 516-528.
- Carter, R. C., Jacobson, J. L., Burden, M. J., Armony-Sivan, R., Dodge, N. C., Angelilli, M. L., Lozoff, B., y Jacobson, S. W. (2010). Iron deficiency anemia and cognitive function in infancy. *Pediatrics*, 126(2), e427-434. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2097>
- Choucroun, P., Gillet, D., Dorange, G., Sawicki, B., y Dewitte, J. D. (2001). Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478(1), 89-96. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00123-3)
- Clark, S. F. (2008). Iron Deficiency Anemia. *Nutrition in Clinical Practice*, 23(2), 128-141. <https://doi.org/10.1177/0884533608314536>
- Claycombe, K. J., y Meydani, S. N. (2001). Vitamin E and genome stability. *Mutation Research*, 475(1-2), 37-44. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00077-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00077-x)
- Collins, A R, Dusinská, M., y Horská, A. (2001). Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 611-614. [https://doi.org/10.18388/abp.2001\\_3895](https://doi.org/10.18388/abp.2001_3895)
- Collins, Andrew R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Comité Nacional de Hematología. (2009). *Anemia ferropénica guía actual de diagnóstico y tratamiento.pdf*. <https://www.sap.org.ar/uploads/consensos/anemia-ferropénica-guía-actual-de-diagnóstico-y-tratamiento.pdf> Fecha de consulta: Nov. 2020

Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional y Comité Nacional de Nutrición. (2017). Deficiencia de hierro y anemia ferropénica. Guía para su prevención, diagnóstico y tratamiento. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 115(04).  
<https://doi.org/10.5546/aap.2017.s68>

Convención sobre los derechos del niño (1989). UNICEF COMITÉ ESPAÑOL (2006)  
<https://www.un.org/es/events/childrenday/pdf/derechos.pdf> Fecha de consulta:  
Nov.2020

Cook, J. D., y Reddy, M. B. (1995). Efficacy of weekly compared with daily iron supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(1), 117-120.

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., y Mozafari, M. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

de Camargo Jr, K. R., Campos, E. M. S., Bustamante-Teixeira, M. T., Mascarenhas, M. T. M., Mauad, N. M., Franco, T. B., Ribeiro, L. C., y Alves, M. J. M. (2008). Treatment and prevention of anemia with ferrous sulfate plus folic acid in children attending daycare centers in Goiânia, Goiás State, Brazil: A randomized controlled trial. *Cad. Saúde Pública*, 24(11), 2722.

De-Regil, L. M., Jefferds, M. E. D., Sylvetsky, A. C., y Dowswell, T. (2011). Intermittent iron supplementation for improving nutrition and development in children under 12 years of age. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD009085.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD009085.pub2>

- Desai, M. R., Dhar, R., Rosen, D. H., Kariuki, S. K., Shi, Y. P., Kager, P. A., y ter Kuile, F. O. (2004). Daily Iron Supplementation Is More Efficacious than Twice Weekly Iron Supplementation for the Treatment of Childhood Anemia in Western Kenya. *The Journal of Nutrition*, 134(5), 1167-1174. <https://doi.org/10.1093/jn/134.5.1167>
- Díaz, V., Peinado, A. B., Barba-Moreno, L., Altamura, S., Butragueño, J., González-Gross, M., Alteheld, B., Stehle, P., Zapico, A. G., Muckenthaler, M. U., y Gassmann, M. (2015). Elevated hepcidin serum level in response to inflammatory and iron signals in exercising athletes is independent of moderate supplementation with vitamin C and E. *Physiological Reports*, 3(8). <https://doi.org/10.14814/phy2.12475>
- Díaz-Castro, J., García, Y., López-Aliaga, I., Alférez, M. J. M., Hijano, S., Ramos, A., y Campos, M. S. (2013). Influence of Several Sources and Amounts of Iron on DNA, Lipid and Protein Oxidative Damage During Anaemia Recovery. *Biological Trace Element Research*, 155(3), 403-410. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9802-9>
- Dizdaroglu, M., y Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715762.2011.653969>
- Eickmann, S. H., Brito, C. M. M., Lira, P. I. C., y Lima, M. C. (2008). Efetividade da suplementação semanal com ferro sobre a concentração de hemoglobina, estado nutricional e o desenvolvimento de lactentes em creches do Recife, Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 24(suppl 2), s303-s311. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001400015>

- Engstrom, E. M., Castro, I. R. R. de, Portela, M., Cardoso, L. O., y Monteiro, C. A. (2008). Effectiveness of daily and weekly iron supplementation in the prevention of anemia in infants. *Revista de Saúde Pública*, 42(5), 786-795.  
<https://doi.org/10.1590/S0034-89102008005000043>
- ENNYS. (2019). *Encuesta-nacional-de-nutricion-y-salud*.  
[http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001602cnt-2019-10\\_encuesta-nacional-de-nutricion-y-salud.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001602cnt-2019-10_encuesta-nacional-de-nutricion-y-salud.pdf) Fecha de Consulta: Ago. 2020
- Fagali, N. S., Grillo, C. A., Puntarulo, S., y Fernández Lorenzo de Mele, M. A. (2015). Cytotoxicity of corrosion products of degradable Fe-based stents: Relevance of pH and insoluble products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 480-488.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.047>
- Falivene, M. A., y Fatore, G. (2016). Abordaje multidimensional de la anemia por de ciencia de hierro en niños menores de dos años de edad del Noreste Argentino. Años 2004-2005. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 114(1).  
<https://doi.org/10.5546/aap.2016.14>
- Fang, C.-L., A. Al-Suwayeh, S., y Fang, J.-Y. (2012). Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. *Recent Patents on Nanotechnology*, 7(1), 41-55.  
<https://doi.org/10.2174/18722105130105>
- Fenech, M. (2001). Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. *Mutation Research*, 480-481, 51-54.
- Fenech, M., Dreosti, I., y Aitken, C. (1997). Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood

lymphocytes. *Carcinogenesis*, 18(2), 359-364.

<https://doi.org/10.1093/carcin/18.2.359>

Fenech, M. (2005). The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: Diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*, 20(4), 255-269.

<https://doi.org/10.1093/mutage/pei040>

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>

Fenech, M. (2010). Nutriomes and nutrient arrays—The key to personalised nutrition for DNA damage prevention and cancer growth control. *Genome Integrity*, 1(1), 11.

<https://doi.org/10.1186/2041-9414-1-11>

Fenech, M. (2014). Nutriomes and Personalised Nutrition for DNA Damage Prevention, Telomere Integrity Maintenance and Cancer Growth Control. En V. Zappia, S. Panico, G. L. Russo, A. Budillon, y F. Della Ragione (Eds.), *Advances in Nutrition and Cancer* (Vol. 159, pp. 427-441). Springer Berlin Heidelberg.

[https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_24)

Fenech, M., y Morley, A. A. (1985a). The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 148(1), 99-105. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(85\)90212-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(85)90212-X)

Fenech, M., y Morley, A. A. (1985b). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1), 29-36. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9)

- Fernández Gaxiola, A. C., y De Regil, L. M. (2019). Intermittent iron supplementation for reducing anaemia and its associated impairments in adolescent and adult menstruating women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD009218.pub3>
- Ferro, E., Visalli, G., La Rosa, M. A., Piraino, B., Civa, R., Randazzo Papa, G., y Di Pietro, A. (2016). Genotoxic effect of iron overload and disease complications in transfused  $\beta$  thalassaemic patients. *Mutagenesis*, 275–281.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/gew062>
- Fishman, S. M., Christian, P., y West, K. P. (2000). The role of vitamins in the prevention and control of anaemia. *Public Health Nutrition*, 3(2), 125-150.  
<https://doi.org/10.1017/S1368980000000173>
- Fraga, C. G., y Oteiza, P. I. (2002). Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 180(1), 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00379-7)
- Franke, S. I. R., Prá, D., Silva, J. da, Erdtmann, B., y Henriques, J. A. P. (2005). Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 583(1), 75-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.03.001>
- Galaris, D., Barbouti, A., y Pantopoulos, K. (2019). Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(12), 118535. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118535>

- Gambaro, R. C., Seoane, A. I., y Padula, G. (2018a). Comparación del daño cromosómico provocado in vitro por dos formas de administración del tratamiento preventivo de la anemia ferropénica. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 20, n.º 1. <https://doi.org/10.17139/raab.2018.0020.01.02>
- Gambaro, R. C., Seoane, A., y Padula, G. (2018b). Oxidative Stress and Genomic Damage Induced In Vitro in Human Peripheral Blood by Two Preventive Treatments of Iron Deficiency Anemia. *Biological Trace Element Research*, 190(2), 318-326. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1576-7>
- García, O., Mandina, T., Lamadrid, A. I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., Piloto, J., Gonzalez, J. E., y Alvarez, A. (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556(1), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035>
- González, H. F., Malpeli, A., Etchegoyen, G., Lucero, L., Romero, F., Lagunas, C., Lailhacar, G., Olivares, M., y Uauy, R. (2007). Acquisition of Visuomotor Abilities and Intellectual Quotient in Children Aged 4–10 Years: Relationship with Micronutrient Nutritional Status. *Biological Trace Element Research*, 120(1-3), 92-101. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8023-5>
- González, H., Varea, A., y Malpeli, A. (2006). *Evaluación de Impacto del Programa Plan Más Vida. Componente Nutricional. Ministerio de Desarrollo Humano. CIC, PBA. La Plata.*

- Gross, R., Schultink, W., y Juliawati. (1994). Treatment of anaemia with weekly iron supplementation. *The Lancet*, 344(8925), 821. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92378-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92378-7)
- Hacıhamdioglu, D. Ö., Kurekci, A. E., Gursel, O., Atay, A. A., Balamtekin, N., Aydın, A., Haşimi, A., y Ozcan, O. (2013). Evaluation of lipid peroxidation and antioxidant system in healthy iron-replete infants receiving iron prophylaxis. *Nutrition*, 29(1), 138-142. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.05.009>
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Harrison, R. G. (1906). Observations on the living developing nerve fiber. *Experimental Biology and Medicine*, 4(1), 140-143. <https://doi.org/10.3181/00379727-4-98>
- Hawamdeh, H. M., Rawashdeh, M., y Aughsteen, A. A. (2013). Comparison Between Once Weekly, Twice Weekly, and Daily Oral Iron Therapy in Jordanian Children Suffering From Iron Deficiency Anemia. *Maternal and Child Health Journal*, 17(2), 368-373. <https://doi.org/10.1007/s10995-012-0981-3>
- Herbig, U., Ferreira, M., Condell, L., Carey, D., y Sedivy, J. M. (2006). Cellular Senescence in Aging Primates. *Science*, 311(5765), 1257-1257. <https://doi.org/10.1126/science.1122446>
- Hongsawong, N., Chawprang, N., Kittisakmontri, K., Vittayananan, P., Srisuwan, K., y Chartapisak, W. (2020). Vitamin C deficiency and impact of vitamin C administration among pediatric patients with advanced chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04662-9>

Inverso, A. (2019). Nutrición en Pediatría. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 29(1), 3.

Islan, G. A., Cacicedo, M. L., Rodenak-Kladniew, B., Duran, N., y Castro, G. R. (2018). Development and Tailoring of Hybrid Lipid Nanocarriers. *Current Pharmaceutical Design*, 23(43), 6643-6658.

<https://doi.org/10.2174/1381612823666171115110639>

Isler, M., Delibas, N., Guclu, M., Gultekin, F., Sutcu, R., Bahceci, M., y Kosar, A. (2002). Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Erythrocytes of Patients with Iron Deficiency Anemia: Effects of Different Treatment Modalities. *Croatian Medical Journal*, 43 (1), 16-19.

Jilani, T., Azam, I., Moiz, B., Mehboobali, N., y Perwaiz Iqbal, M. (2016). Positive Association of Vitamin E Supplementation with Hemoglobin Levels in Mildly Anemic Healthy Pakistani Adults. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*, 85(1-2), 39-49.

<https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000222>

Jilani, T., y Iqbal, M. P. (2018). Vitamin E deficiency in South Asian population and the therapeutic use of alpha-tocopherol (Vitamin E) for correction of anemia. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 34(6), 1571-1575.

<https://doi.org/10.12669/pjms.346.15880>

- Jomova, K., y Valko, M. (2011). *Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease* [Text].  
<https://doi.org/info:doi/10.2174/138161211798072463>
- Jover, R., Ponsoda, X., Castell, J. V., y Gómez-Lechón, M. J. (1992). Evaluation of the cytotoxicity of ten chemicals on human cultured hepatocytes: Predictability of human toxicity and comparison with rodent cell culture systems. *Toxicology in Vitro*, 6(1), 47-52. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(92\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0887-2333(92)90084-5)
- Kajarabille, N., y Latunde-Dada, G. O. (2019). Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4968. <https://doi.org/10.3390/ijms20194968>
- Kan, E., Ündeğer, Ü., Bali, M., y Başaran, N. (2002). Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of Vitamin E supplementation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 520(1), 151-159. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00205-X)
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., y Wakata, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research*, 540(2), 153-163.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.005>
- Kulkarni, A., y Wilson, D. M. (2008). The Involvement of DNA-Damage and -Repair Defects in Neurological Dysfunction. *The American Journal of Human Genetics*, 82(3), 539-566. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.01.009>

- Kurtoglu, E., Ugur, A., Baltaci, A. K., y Undar, L. (2003). Effect of iron supplementation on oxidative stress and antioxidant status in iron-deficiency anemia. *Biological Trace Element Research*, 96(1), 117-123. <https://doi.org/10.1385/BTER:96:1-3:117>
- Leal, M. M., Fanlo, E. R., y Suarez, M. J. (2017). *Deficiencia de micronutrientes en Argentina*. Universidad Maimónides. Departamento de investigación en nutrición. Buenos Aires, Argentina
- Lin, H., Li, L., Jia, X., Ward, D. M., y Kaplan, J. (2011). Genetic and Biochemical Analysis of High Iron Toxicity in Yeast iron toxicity is due to the accumulation of cytosolic iron and occurs under both aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3851-3862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190959>
- Lindberg, H. K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G. C.-M., Norppa, H., y Fenech, M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research*, 617(1-2), 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.12.002>
- Linetzky, B., Morello, P., Virgolini, M., y Ferrante, D. (2011). Resultados de la primera encuesta nacional de salud escolar: Argentina, 2007. *Archivos argentinos de pediatría*, 109(2), 111-116.
- Lohner, S., Fekete, K., Berti, C., Hermoso, M., Cetin, I., Koletzko, B., y Decsi, T. (2012). Effect of folate supplementation on folate status and health outcomes in infants, children and adolescents: A systematic review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(8), 1014-1020. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.683779>

- Lopez, A., Cacoub, P., Macdougall, I. C., y Peyrin-Biroulet, L. (2016). Iron deficiency anaemia. *Lancet (London, England)*, 387(10021), 907-916.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60865-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60865-0)
- Lozoff, B., Corapci, F., Burden, M. J., Kaciroti, N., Angulo-Barroso, R., Sazawal, S., y Black, M. (2007). Preschool-Aged Children with Iron Deficiency Anemia Show Altered Affect and Behavior. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 683-689.  
<https://doi.org/10.1093/jn/137.3.683>
- Lynch, S., Stoltzfus, R., y Rawat, R. (2007). Critical Review of Strategies to Prevent and Control Iron Deficiency in Children. *Food and Nutrition Bulletin*, 28(4\_suppl4), S610-S620. <https://doi.org/10.1177/15648265070284S413>
- Ma, Q. H., Wang, Y. W., Lin, X. F., Luo, D., y Gu, N. (2007). Preparation, Characterization and Photoprotection of Tocopherol Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *2007 IEEE/ICME International Conference on Complex Medical Engineering*, 203-208.  
<https://doi.org/10.1109/ICCME.2007.4381722>
- MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., y Wild, D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 103-112. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90016-4)
- Madhikarmi, N. L., y Murthy, K. R. S. (2014). Antioxidant enzymes and oxidative stress in the erythrocytes of iron deficiency anemic patients supplemented with vitamins. *Iranian Biomedical Journal*, 18(2), 82-87.

- Malpeli, A., Sala, M. E., Bettioli, M., Pattin, J., Lazarte, P., Tortarolo, A., Silberman, M., Etchegoyen, G., y González, H. (2006). Diagnóstico del estado nutricional de micronutrientes y evaluación antropométrica en una población infantil suburbana de la provincia de Buenos Aires. *Ludovica Pediátrica*, 8.
- Mansur, J. (2018). Vitamina D en pediatría, embarazo y lactancia. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 116(4). <https://doi.org/10.5546/aap.2018.286>
- Marar, T. (2011). Amelioration of glucose induced hemolysis of human erythrocytes by vitamin E. *Chemico-Biological Interactions*, 193(2), 149-153. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.06.004>
- Martinez, M., Mancuello, C., Pereira Sühsner, C., González, F., Prieto, R., Rolón, M., Álvarez, S., y Bertoni, B. (2013). Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos. *Steviana*, 5, 114-121.
- Martino-Roth, M. G., Viégas, J., y Roth, D. M. (2003). Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2(4), 410-417.
- Matos, T. A., Arcanjo, F. P. N., Santos, P. R., y Arcanjo, C. C. (2016). Prevention and Treatment of Anemia in Infants through Supplementation, Assessing the Effectiveness of Using Iron Once or Twice Weekly. *Journal of Tropical Pediatrics*, 62(2), 123-130. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmv085>

- Matzuk, M. M., y Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, 14(11), 1197-1213.  
<https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>
- McCord, J. M., y Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- McLean, E., de Benoist, B., y Allen, L. H. (2008). Review of the Magnitude of Folate and Vitamin B12 Deficiencies Worldwide. *Food and Nutrition Bulletin*, 29(2\_suppl1), S38-S51. <https://doi.org/10.1177/15648265080292S107>
- Mimić-Oka, J., Savić-Radojević, A., Plješa-Ercegovac, M., Opačić, M., Simić, T., Dimković, N., y Simić, D. V. (2005). Evaluation of Oxidative Stress after Repeated Intravenous Iron Supplementation. *Renal Failure*, 27(3), 345-351. <https://doi.org/10.1081/JDI-56599>
- Mitarotonda, R. (2018). “Desarrollo de nanopartículas de sílice con potencial uso terapéutico: Estudio de sus efectos sobre el tejido sanguíneo y células del sistema inmune” [Tesis Doctoral]. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Itaya, M., Nakagawa, K., y Miyazawa, T. (2019). Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*, 71(4), 430-441.  
<https://doi.org/10.1002/iub.2008>
- Molina, P. (2009). ¿Qué es la anemia? Hacia una necesaria construcción social de la anemia como una enfermedad. *Anthropía*, 7, 27-32.

- Mollet, I. G., Patel, D., Govani, F. S., Giess, A., Paschalaki, K., Periyasamy, M., Lidington, E. C., Mason, J. C., Jones, M. D., Game, L., Ali, S., y Shovlin, C. L. (2016). Low Dose Iron Treatments Induce a DNA Damage Response in Human Endothelial Cells within Minutes. *PLOS ONE*, 11(2), e0147990.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147990>
- Montalván, C. A. T., García, A. O., González, I. D., Mondaca, S. E., y Acosta, A. M. (2009). *Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica*. Vol. 40, Núm 4, oct-dic, 2009, pp 35-40. Asociación farmacéutica Mexicana. Distrito Federal México
- Mozaffari-Khosravi, H., Noori-Shadkam, M., Fatehi, F., y Naghiaee, Y. (2010). Once Weekly Low-dose Iron Supplementation Effectively Improved Iron Status in Adolescent Girls. *Biological Trace Element Research*, 135(1), 22-30.  
<https://doi.org/10.1007/s12011-009-8480-0>
- Ninh, N. X., Berger, J., Quyen, D. T., Khan, N. C., Traissac, P., y Khoi, H. H. (2002). Efficacité de la supplémentation en fer quotidienne et hebdomadaire pour le contrôle de l'anémie chez le nourrisson en milieu rural au Vietnam. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé*, 12(1), 31-37.
- Nogueira Arcanjo, F. P., Santos, P. R., Costa Arcanjo, C. P., Meira Magalhães, S. M., y Madeiro Leite, Á. J. (2013). Daily and Weekly Iron Supplementations are Effective in Increasing Hemoglobin and Reducing Anemia in Infants. *Journal of Tropical Pediatrics*, 59(3), 175-179. <https://doi.org/10.1093/tropej/fms071>

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (2014). Test No. 489:

In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Publishing

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2016). *¿Qué es la malnutrición?*

<http://www.who.int/features/qa/malnutrition/es/> Fecha de consulta: Jul. 2020

Orozco, M. N., Solomons, N. W., Schümann, K., y Friel, J. K. (2012). Response of Urinary Biomarkers of Systemic Oxidation to Oral Iron Supplementation in Healthy Men.

*Food and Nutrition Bulletin*, 33(1), 53-62.

<https://doi.org/10.1177/156482651203300105>

Ozdemir, Z. C., Koc, A., Aycicek, A., y Kocyigit, A. (2014). N-Acetylcysteine Supplementation Reduces Oxidative Stress and DNA Damage in Children with  $\beta$ -Thalassemia.

*Hemoglobin*, 38(5), 359-364. <https://doi.org/10.3109/03630269.2014.951890>

Padula, G., Ponzinibbio, M. V., Gambaro, R. C., y Seoane, A. I. (2017). Genomic instability related to zinc deficiency and excess in an in vitro model. *In Vitro Cellular y*

*Developmental Biology - Animal*, 53, n.º 7. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0146-1>

Padula, G. (2008). *Malnutrición infantil. Evaluación antropométrica y consecuencias cromosómicas. Ediciones al Margen.*

Paraidathathu, T., de Groot, H., y Kehrer, J. P. (1992). Production of reactive oxygen by

mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radical Biology and*

*Medicine*, 13(4), 289-297. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90176-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90176-H)

Pena-Rosas, J. P., Nesheim, M. C., Garcia-Casal, M. N., Crompton, D. W. T., Sanjur, D.,

Viteri, F. E., Frongillo, E. A., y Lorenzana, P. (2004). Intermittent Iron

Supplementation Regimens Are Able to Maintain Safe Maternal Hemoglobin Concentrations during Pregnancy in Venezuela. *The Journal of Nutrition*, 134(5), 1099-1104. <https://doi.org/10.1093/jn/134.5.1099>

Peña-Rosas, J. P., De-Regil, L. M., Dowswell, T., y Viteri, F. E. (2012). Intermittent oral iron supplementation during pregnancy. En The Cochrane Collaboration (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley y Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009997>

Peña-Rosas, J. P., De-Regil, L. M., Gomez Malave, H., Flores-Urrutia, M. C., y Dowswell, T. (2015). Intermittent oral iron supplementation during pregnancy. En The Cochrane Collaboration (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley y Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009997.pub2>

PHNIP (Population, Health and Nutrition Information Project). (2003). *Anemia Prevention and Control: What Works-Part I*. United States. Washington: USAID.

Prá, D., Bortoluzzi, A., Müller, L. L., Hermes, L., Horta, J. A., Maluf, S. W., Henriques, J. A. P., Fenech, M., y Franke, S. I. R. (2011). Iron intake, red cell indicators of iron status, and DNA damage in young subjects. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 27(3), 293-297. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.001>

Prá, D., Franke, S. I. R., Giulian, R., Yoneama, M. L., Dias, J. F., Erdtmann, B., y Henriques, J. A. P. (2008). Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *BioMetals*, 21(3), 289-297. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9118-3>

- Prá, D., Franke, S. I. R., Henriques, J. A. P., y Fenech, M. (2012). Iron and genome stability: An update. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.02.001>
- Premkumar, K., y Bowlus, C. L. (2003). Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 542(1-2), 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.09.002>
- Puche, R. C. (2015). Sobre la prevalencia de hipovitaminosis d en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 75 n° 3, 183-186.
- Record, I. R., y Jannes, M. (2000). Iron,  $\alpha$ -tocopherol, oxidative damage and micronucleus formation in rat splenocytes. *Redox Report*, 5(1), 43-44. <https://doi.org/10.1179/rer.2000.5.1.43>
- Riffel, A. P. K., Santos, M. C. Q., de Souza, J. A., Scheid, T., Horst, A., Kolberg, C., Belló-Klein, A., Partata, W. A., Riffel, A. P. K., Santos, M. C. Q., de Souza, J. A., Scheid, T., Horst, A., Kolberg, C., Belló-Klein, A., y Partata, W. A. (2018). Treatment with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(4). <https://doi.org/10.1590/1414-431x20177097>
- Rivera, J. A., Hotz, C., González-Cossío, T., Neufeld, L., y García-Guerra, A. (2003). The Effect of Micronutrient Deficiencies on Child Growth: A Review of Results from Community-Based Supplementation Trials. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 4010S-4020S.

- Rodenak-Kladniew, B., Montoto, S. S., Sbaraglini, M. L., Ianni, M. Di, Ruiz, M. E., Talevi, A., Alvarez, V. A., Durán, N., Castro, G. R., y Islan, G. A. (2019). Hybrid Ofloxacin/eugenol co-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced and targetable antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 569(March), 118575. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118575>
- Rodenak-Kladniew, B., Scioli Montoto, S., Sbaraglini, M. L., Di Ianni, M., Ruiz, M. E., Talevi, A., Alvarez, V. A., Durán, N., Castro, G. R., y Islan, G. A. (2019). Hybrid Ofloxacin/eugenol co-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced and targetable antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 569, 118575. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118575>
- Rodenak-Kladniew, Boris, Islan, G. A., de Bravo, M. G., Durán, N., y Castro, G. R. (2017). Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.021>
- Rodríguez-Ribera, L., Corredor, Z., Silva, I., Díaz, J. M., Ballarín, J., Marcos, R., Pastor, S., y Coll, E. (2017). Vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of oxidative genetic damage in hemodialysis patients. *Mutation Research*, 815, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.01.003>
- Saez, V., Souza, I. D. L., y Mansur, C. R. E. (2018). Lipid nanoparticles (SLN y NLC) for delivery of vitamin E: A comprehensive review. *International Journal of Cosmetic Science*, 40(2), 103-116. <https://doi.org/10.1111/ics.12452>

- Santacruz Reyes, L., Melo Jimenez, Á., Rodríguez Herrera, C., y Moscoso Gama, J. (2017). Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. *Biociencias*, 12(2). <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..2.2293>
- Schultink, W., Gross, R., Gliwitzki, M., Karyadi, D., y Matulesi, P. (1995). Effect of daily vs twice weekly iron supplementation in Indonesian preschool children with low iron status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(1), 111-115.
- Schumacher, B., Garinis, G. A., y Hoeijmakers, J. H. J. (2008). Age to survive: DNA damage and aging. *Trends in Genetics*, 24(2), 77-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.004>
- Sguassero, Y., Guerrero, M. M., y Romero, M. (2018). The perspective of primary health care pediatricians regarding childhood anemia and iron supplementation. *Archivos Argentinos De Pediatría*, 116(1), 21-27. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.eng.21>
- Şimşek Orhon, F., Öztürk, G., Erbaş, D., y Hasanoğlu, A. (2006). Antioxidant effect of vitamin E in the treatment of nutritional iron deficiency anemia. *Turkish Journal of Haematology: Official Journal of Turkish Society of Haematology*, 23(1), 15-24.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., y Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Sundaram, R. C., Selvaraj, N., Vijayan, G., Bobby, Z., Hamide, A., y Rattina Dasse, N. (2007). Increased plasma malondialdehyde and fructosamine in iron deficiency anemia: Effect of treatment. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 61(10), 682-685.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.06.013>

- Svarch Guerchicoff, E. (2015). Anemia por deficiencia de hierro en el lactante. *Revista cubana de pediatría*, 87(4), 395-398.
- Tang, M., Frank, D. N., Sherlock, L., Ir, D., Robertson, C. E., y Krebs, N. F. (2016). Effect of vitamin E with therapeutic iron supplementation on iron repletion and gut microbiome in U.S. iron deficient infants and toddlers: A randomized control trial. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 63(3), 379-385.  
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001154>
- Tee, E. S., Kandiah, M., Awini, N., Chong, S. M., Satgunasingam, N., Kamarudin, L., Milani, S., Dugdale, A. E., y Viteri, F. E. (1999). School-administered weekly iron-folate supplements improve hemoglobin and ferritin concentrations in Malaysian adolescent girls. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(6), 1249-1256.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Toxqui, L., De Piero, A., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., y Vaquero, M. P. (2010). Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutricion Hospitalaria*, 25(3), 350-365.
- Tuñón, I. (2016). *Infancias con derechos postergados: Avances, retrocesos e inequidades a finales del Bicentenario (2010-2015)* (Pontificia Universidad Católica Argentina Santa María de los Buenos Aires, Ed.; 1a edición). UCA.

- Umegaki, K., y Fenech, M. (2000). Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: A sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*, 15(3), 261-269.
- Varea, A., Disalvo, L., y González, H. (2006). Las deficiencias de micronutrientes y su repercusión en Salud Pública. *Ludovica Pediátrica*, 6.
- Viteri, F. E., Ali, F., y Tujague, J. (1999). Long-term weekly iron supplementation improves and sustains nonpregnant women's iron status as well or better than currently recommended short-term daily supplementation. *The Journal of Nutrition*, 129(11), 2013-2020.
- Wawrzyniak, A., Górnicka, M., Hamułka, J., Gajewska, M., Drywień, M., Pierzynowska, J., y Gronowska-Senger, A. (2013).  $\alpha$ -Tocopherol, ascorbic acid, and  $\beta$ -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 33(10), 868-875.  
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.07.001>
- World Health Organization. (2001). *Iron deficiency anaemia: Assessment, prevention and control*. World Health Organization.  
[http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia\\_iron\\_deficiency/WHO\\_NHD\\_01.3/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/) Fecha de consulta: Jul. 2020
- Young, T. A., Cunningham, C. C., y Bailey, S. M. (2002). Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: Studies using myxothiazol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405(1), 65-72. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00338-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00338-7)

Yurdakök, K., Temiz, F., Yalçın, S. S., y Gümrük, F. (2004). Efficacy of daily and weekly iron supplementation on iron status in exclusively breast-fed infants. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 26(5), 284-288.

<https://doi.org/10.1097/00043426-200405000-00005>

Zaka-Ur-Rab, Z., Adnan, M., Ahmad, S. M., y Islam, N. (2016). Effect of Oral Iron on Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Children with Iron Deficiency Anaemia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 10(10), SC13-SC19.

<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/23601.8761>

Zalles Cueto, L., Rojas Meneces, J., Rojas Soto, S., y Sejas, E. (2005). Eficacia de la suplementación semanal versus diaria con sulfato ferroso en niños escolares con anemia ferropénica. *Gaceta Médica Boliviana*, 28(2), 3-8.

## Anexo 1

---

### Cálculos de la concentración de hierro:

- ✓ Un bebe de entre 1 y 12 meses tienen aproximadamente 75 ml/kg de sangre y necesita 1 mg/kg/día (Suplementación diaria) y 4 mg/kg/día (Suplementación semanal) de sulfato ferroso.
  - Extrapolados para 10 ml (volumen final del cultivo) se necesitan 0,14 mg de sulfato ferroso para la suplementación diaria.
  - Extrapolados para 10 ml (volumen final del cultivo) se necesitan 0,55 mg de sulfato ferroso para la suplementación semanal.

### Solución de sulfato ferroso Ferdrómaco (125mg/ml):

- ✓ **Suplementación diaria:** 1 ml de  $\text{SO}_4\text{Fe}$  (1,3 mg) en 95 ml de solución fisiológica\*
- ✓ **Suplementación semanal:** 1 ml de  $\text{SO}_4\text{Fe}$  (5,5 mg) en 22 ml de solución fisiológica\*

\*Para poder adicionar 100  $\mu\text{l}$  de solución al cultivo

### Solución de vitamina E

- ✓ 44  $\mu\text{l}$  en 100  $\mu\text{l}$  de etanol  $\rightarrow$  solución de trabajo
  - 8,3  $\mu\text{g/ml}$   $\rightarrow$  2  $\mu\text{l}$  en 10 ml de cultivo
  - 16,6  $\mu\text{g/ml}$   $\rightarrow$  4  $\mu\text{l}$  e 10 ml de cultivo

### Soluciones de uso general:

- ✓ Solución de PBS (Phosphato Buffer Saline) libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ :
  - NaCl 0,14 M
  - KCl 0,004 M (0,2982 g)
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$  0,01 M
  - Llevar a 1000 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y ajustar a pH 7,0
- ✓ Solución fisiológica 0,9%: 9 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada

- ✓ Medio de cultivo utilizado para linfocitos de sangre periférica:
  - HAM F 12/DMEM 100 %
  - Penicilina 60 UI/ml
  - Estreptomicina 50 µg/ml
  
- ✓ Fitohemaglutinina: 100 µl en 9900 ml finales de cultivo
  
- ✓ 10 X ACK (Buffer para lisis de eritrocitos)
  - Mm 500 ml 1,5 M cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl)
  - 100 mM bicarbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>)
  - 100,12 g/mol 5g 10mM Triplex111 (EDTA-2Na)
  - Diluir en 400 ml de agua destilada
  - Ajustar el PH a 7, 2 según sea necesario
  - Agregar agua destilada hasta completar 500 ml
  - Para esterilizar filtrar y conservar el stock a 4°C
  - Previo al uso, diluir en 1x ACK

#### **Soluciones índice mitótico**

- ✓ 100 µg/ml de colchicina
- ✓ Solución hipotónica 0,075 molar: 1,39 g de KCl en 250 ml de agua destilada
- ✓ Fijador Carnoy (metanol-acético 3:1)

#### **Soluciones MTT**

- ✓ Solución stock MTT: 0,05 g en 10 ml en PBS
- ✓ Solvente de extracción: DMSO puro

#### **Soluciones rojo neutro (RN)**

- ✓ Solución de rojo neutro stock

- 0,033 g RN en 10 ml de agua destilada
- ✓ Solución de rojo neutro de trabajo
  - 100 µl de solución stock RN en 10 ml de PBS a 37°C
- ✓ Solución de extracción:
  - Ácido acético 1%
  - Etanol 50%
  - Agua destilada 49%

### Cuantificación de hierro total en células

- ✓ Batofenantrolina
  - Buffer NaAc (27 g en 200 ml de IFW). Llevar a pH 6 con ácido acético glacial
  - Agua libre de hierro (IFW) (3 g de resina Chelex cada 1000 ml de agua milli Q). Agitar con buzo magnético hasta pH=9.
  - Ácido tioglicólico 8% con IFW.
  - Batofenantrolina disódica 4 mM (32,19 mg en 15 ml de IFW) (PM= 536,5).
  - HNO 3 0,15%: 22,6 µl HNO 3,65% en 10 ml IFW
  - Estándar de Fe en ácido nítrico 0,15% (1,8 mM)
  - Blanco (mezcla de HClO 4 /HNO 3 1:1).
  
- ✓ Curva de calibrado con batofenantrolina

Std (ul)	Std (nmol)	Bco (ul)	IFW (ul)	TGA 8% (ul)	Buffer (ul)	Batof (ul)
0		50	200	50	900	200
1		50	199	50	900	200
2		50	198	50	900	200
4		50	196	50	900	200
6		50	194	50	900	200

8		50	192	50	900	200
---	--	----	-----	----	-----	-----

Muestra	IFW (ul)	TGA 8% (ul)	Buffer (ul)	Batof (ul)
50	200	50	900	200

\*\*\*Respetar el orden de agregado de cada reactivo, mezclando bien en cada paso\*\*\*

\*\*\*Si la aparición de color es lenta tal vez se deba a que el pH es muy bajo. Probar con menos muestra o agregar NaAc sin acético glacial\*\*\*

\*\*\*La pendiente de Abs vs nmoles debería dar 0,018-0,019)\*\*\*

### Cuantificación de hierro en medio de cultivo

- ✓ Curva de calibrado (desferal). Medir Abs430
- a) 0  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$  + 200  $\mu\text{l}$  HCl 0,2 N + 400  $\mu\text{l}$  desf + 400  $\mu\text{l}$  Tris
- b) 5  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$  + 195  $\mu\text{l}$  HCl 0,2 N + 400  $\mu\text{l}$  desf + 400  $\mu\text{l}$  Tris
- c) 10  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$  + 190  $\mu\text{l}$  HCl 0,2 N + 400  $\mu\text{l}$  desf + 400  $\mu\text{l}$  Tris
- d) 15  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$  + 185  $\mu\text{l}$  HCl 0,2 N + 400  $\mu\text{l}$  desf + 400  $\mu\text{l}$  Tris
- e) 20  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$  + 180  $\mu\text{l}$  HCl 0,2 N + 400  $\mu\text{l}$  desf + 400  $\mu\text{l}$  Tris

### Soluciones T-BARS

- ✓ Solución de ácido tiobarbitúrico 0,67%: 0,1675 g TBA en 25 ml de agua bidestilada
- ✓ TCA 5%: 2,5 g de ácido tricloroacético en 50 ml de agua bidestilada.

### Soluciones ROS

- ✓ Diclorofluoresceína 10  $\mu\text{M}$ : 2  $\mu\text{l}$  de DFC en 1998  $\mu\text{l}$  de PBS
- ✓ Nac 5 mM: 1,63 mg/ml en etanol al 70%

### Soluciones catalasa

- ✓ Buffer fosfato de sodio 50mM: a la solución básica agregar solución acida hasta llegar a pH 7.0.
  - Solución básica: 3,55 g de Fosfato de Sodio dibásico en 500 ml de agua destilada.
  - Solución ácida: 3,45 g de Fosfato de Sodio monobásico en 500 ml de agua destilada.
  
- ✓ Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) 150 mM: 100ul de  $H_2O_2$  30% en 5,9 ml de buffer fosfato.

**Soluciones ensayo cometa:**

- ✓ Agarosa de punto de fusión normal (APFN):

Solución al 0,5 % (GIBCO BRL) en PBS.

Calentar varias veces sin llegar al punto de ebullición para que se disuelva la agarosa. Alicuotar y mantener a 4°C hasta su uso.
  
- ✓ Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF):

Solución al 0,5 % (GIBCO BRL) en PBS.

Calentar varias veces sin llegar al punto de ebullición para que se disuelva la agarosa. Alicuotar y mantener a 4°C hasta su uso.
  
- ✓ Solución de lisis:

NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10 mM

Esta última solución debe ser ajustada a pH 10 con granallas de NaOH. En caso de superar este valor de pH, debe ser corregido con HCl hasta alcanzar el valor de 10.

La solución debe prepararse previamente a la realización de la técnica. Es aconsejable que no permanezca preparada por más de tres días

En el momento de ser utilizada, por cada 100ml de buffer de lisis debe agregarse: Tritón X- 100: 1ml; DMSO: 10 ml. Una vez que se agrega el Tritón X-100 y DMSO debe mezclarse suavemente por inmersión y finalmente el almacenaje debe realizarse a 4-8 C para evitar la cristalización.

- ✓ Solución de electroforesis:
  - Soluciones stock: - NaOH 10 M.  
- EDTA disódico 200mM
  
  - Solución de trabajo: 30 ml de Solución Stock de NaOH + 5 ml de Solución Stock de EDTA, llevar volumen a un litro, con lo que se obtiene una solución cuya concentración final es de 300mM de NaOH y EDTA disódico 1mM. El buffer de electroforesis debe prepararse fresco antes de cada corrida y luego se descarta.
  
- ✓ Tampón de neutralización:
  - Tris-HCl 0,4 M a pH 7,5
  
- ✓ Solución de tinción:
  - Syber Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) 1µl en 1 ml de agua destilada.

#### **Soluciones CBMN:**

- Solución de citocalasina-B (Sigma, St. Louis, MO, USA):
  - Solución stock: 1 mg de Cytocalasina B en 1mL de DMSO.
  - Solución de trabajo concentración final utilizada: 3 µg/mL.
  
- Solución de fijador:
  - fijador I (cloruro de sodio-metanol-acético 6:5:1).
  - fijador II (metanol-acético 5:1)
  
- Solución de tinción:
  - Giemsa al 5% en agua.

## Anexo 2

Tabla 36. Cuadro comparativo sobre los modelos experimentales citados en el capítulo VI.

Apartado 20. Discusión hierro.

Autores/Año	Modelo	Diseño	Técnica/s	Resultados
<b>Jover y col., 1992</b>	<i>In vitro</i> . Cultivo de hepatocitos humanos y de ratón. Línea celular 3T3 no hepática de roedor	24 hs. de exposición al sulfato ferroso. (IC <sub>50</sub> , 0.05-6 mM)	MTT	Aumento de la citotoxicidad inmediata
<b>Alcântara y col., 2013</b>	<i>In vitro</i> . Línea celular Astrocítica U343 MG	24 hs de exposición al sulfato de hierro	Kit de proliferación celular (XTT).  Micronúcleos	Reducción de viabilidad a partir de ≥40 µg/mL. Estadísticamente significativo a partir de 640 µg/mL. Aumento de la Fr. De micronúcleos al aumentar la dosis. Estadísticamente significativo a partir de 640 µg/mL
<b>Hacihamdioglu y col., 2013</b>	<i>In vivo</i> . Lactantes sanos	Suplementación preventiva. 10 mg/día durante 2 meses	Peroxidación Lipídica.  Enzimas Antioxidantes	No se encontraron diferencias significativas en comparación con los controles.
<b>Orozco y col., 2012</b>	<i>In vivo</i> . Hombres adultos sanos	Suplementación oral a corto plazo con hierro y antioxidantes	T-BARS  8-OHdG	La suplementación con Hierro no incremento los niveles de daño

<b>Kurtoglu y col 2003.</b>	<i>In vivo.</i> Pacientes con ADH	Tratamiento con sulfato ferroso diario (6 mg/kg/día) durante 6 semanas	T- BARS GSH-Px SOD Catalase	El tratamiento con Hierro favorece la disminución del estrés oxidativo previo
<b>Zaka-Ur-Rab y col., 2016</b>	<i>In vivo.</i> Niños (Aprox 3 años) con ADH	Estrés oxidativo basal Tratamiento con sulfato ferroso diario (6 mg/kg/día) después de 8 semanas	T-BARS SOD Catalasa GPx	La terapia con hierro mejora los niveles previos de estrés oxidativo
<b>Sundaram y col., 2007</b>	<i>In vivo.</i> Pacientes Anémicas (Aprox. 16 años)	1 mes de suplementación con hierro	Peroxidación lipídica	El tratamiento con hierro habría disminuido los valores de peroxidación lipídica
<b>Aycicek y col., 2014</b>	<i>In vivo.</i> Niños con ADH	Comparación de diferentes fármacos de hierro de administración oral	Tiol total sérico (SH) Capacidad antioxidante total (TAC) Estado oxidante total (TOS) Índice de estrés oxidativo (OSI)	El hierro fue efectivo en corregir el estado oxidativo elevado
<b>Mimić-Oka y col., 2005</b>	<i>In vivo.</i> Pacientes adultos con hemodiálisis	Terapia repetitiva intravenosa de hierro dosis total de 625 mg	Derivados reactivos con carbonilo Grupos tioles Tiol total sérico (SH) Malondialdehído SOD	El tratamiento con hierro produjo un aumento del estrés oxidativo en el plasma de los pacientes hemodializados

GPX				
<b>Akarsu y col., 2013</b>	<i>In vivo</i> . Pacientes con anemia por deficiencia de hierro (ADH)	Dosis terapéutica de hierro. Administración oral, intramuscular e intravenosa	Capacidad antioxidante total	la terapia oral con sulfato ferroso indujo un estrés oxidativo leve, mientras que las terapias intramuscular e intravenosa indujeron niveles más altos de estrés oxidativo
<b>Altun y col., 2014</b>	<i>In vivo</i> . Lactantes <2 años, niños de 3 a 9 años y adolescentes de 10 a 15 años con ADH	Administración diaria de Fe <sup>+2</sup> , a una dosis terapéutica de 4 mg/kg/día para el tratamiento de la anemia durante un período de 8 a 12 semanas	Malonaldeido (MDA) Catalasa (CAT) SOD Glutathione peroxidase (GSH-Px)	El sulfato ferroso utilizado en el tratamiento de DI o IDA podría provocar estrés oxidativo
<b>Abtahi y col., 2014</b>	<i>In vivo</i> . Adultos sanos	Efectos del consumo de pan fortificado con hierro	Capacidad antioxidante total MDA SOD	El enriquecimiento de la harina con hierro entre los adultos no anémicos a largo plazo podría conllevar a un incremento del estrés oxidativo
<b>Prá y col., 2008</b>	<i>In vivo</i> . Ratones	Sulfato ferroso diario (33.2 mg/kg )	MNi	Reportaron un aumento significativo de la frecuencia de MNi
<b>Prá y col., 2012</b>	<i>In vivo</i> . Niños sanos	Ingesta de 15 mg/d de hierro	MNi	Dicha ingesta no aumenta la frecuencia basal de micronúcleos

<b>Premkumar y Bowlus, 2003</b>	In vivo. Ratones	Dieta con alto contenido de sulfato ferroso (100 o 300 mg/kg de dieta en forma de FeSO <sub>4</sub> ) durante 3 semanas	MNi	Incrementa la frecuencia de MNi en células de médula ósea
<b>Aksu y col., 2010</b>	<i>In vivo</i> . Niños con IDA	Administración diaria de hierro (5-6 mg/kg/día)	Ensayo Cometa	Después de la administración de hierro aumentan los sitios sensibles a Fpg, que representan ADN dañado por oxidación
<b>Mollet y col., 2016</b>	<i>In vitro</i> . Células endoteliales humanas primarias	Dosis bajas de citrato de hierro (10µM)	Ensayo Cometa	Los tratamientos con bajas dosis de hierro son suficientes para modificar el endotelio vascular e inducir una respuesta al daño del ADN.
<b>Franke y col., 2005</b>	<i>In vivo</i> . Ratones	Dosis de sulfato de hierro FeSO <sub>4</sub> (33,23 mg Fe/kg w.b.) y dos dosis de VitC (1 y 30 mg / kg de peso corporal del ratón)	Ensayo Cometa	Sulfato de hierro aumentaba el daño en el ADN y que este daño se incrementaba con la vitamina C
<b>Díaz-Castro y col., 2013</b>	In vivo. Ratas anémicas después de la completar los reservorios de Fe	Tres fuentes diferentes (FeSO <sub>4</sub> , hem Fe y FeSO <sub>4</sub> + hem Fe) y cantidades (45, 12 y 31 mg Fe/kg dieta)	Ensayo Cometa  Peroxidación lipídica	La suplementación de Fe con dosis bajas de Fe hem o formas combinadas de Fe no hem y hem (FeSO <sub>4</sub> + hem) son eficaces para restaurar los parámetros hematológicos deteriorados y

prevenir el daño asociado con los suplementos de Fe

Tabla 37. Cuadro comparativo sobre los modelos experimentales citados en el capítulo VII.

Apartado 23. Discusión hierro y vitamina E.

Autores/Año	Modelo	Diseño	Técnica/s	Resultados
<b>Avula y Fernandes, 2000</b>	<i>In vivo</i> . Ratones machos de 2 meses de edad	Se alimentaron con una dieta durante tres meses con aceite de maíz al 10%, suplementado con vitamina E en niveles normales (75 UI / kg) o superiores (500 UI / kg), o sin Vit E como grupo control	Peroxidación lipídica (MDA)  Tinción con diclorofluoresceína	La suplementación con vitamina E en la dieta favorecería la proliferación celular de manera dosis dependiente , así como disminuía la muerte celular programada al reducir los peróxidos lipídicos (MDA)
<b>Marar, 2011</b>	<i>In vitro</i> . Modelo de hemólisis de glóbulos rojos inducida por glucosa 5, 10 y 20 mM.	Vitamin E (18 µg/ml) (nivel normal en suero).	T- BARS  Catalasa  superóxido dismutasa  Glutación	Efecto protector de la vitamina E al atenuar la hemólisis de los glóbulos rojos y mejora la respuesta antioxidante
<b>Jilani y col., 2016</b>	<i>In vivo</i> . Adultos sanos levemente anémicos	Vitamina E (400 mg) todos los días durante un período de tres meses	Parámetros bioquímicos  Estado-antioxidante-total	El estudio mostró una asociación positiva entre la suplementación con vitamina E y niveles de hemoglobina
<b>Wawrzyniak y col.,</b>	<i>In vivo</i> . Modelo de	Suplementación con	Peroxidación	Reducción de los

<b>2013</b>	ratones	$\alpha$ -tocoferol (2 mg), ácido ascórbico (12 mg) y $\beta$ -caroteno (1 mg), tanto individualmente como en combinación, durante 14 días	lipídica 8-oxo DG	niveles de peróxido de lípidos en el plasma de ratas sometidas a ejercicio y que recibieron 2 o 3 de los antioxidantes.
<b>Altamura y col., 2020</b>	<i>In vivo</i> . Células hematopoyéticas de ratón	La delección de Gpx4 en el sistema hematopoyético se indujo alimentando con citrato de tamoxifeno durante tres semanas  Ratones con dieta pobre en vitamina E que contenía 7 ppm de $\alpha$ -tocoferol.  La dieta repleta de vitamina E contenía 275 ppm de $\alpha$ -tocoferol	Parámetros Bioquímicos  Expresión genética	La delección de Gpx4 ocasiona en células hematopoyéticas causa una eritropoyesis ineficaz, y esto resulta parcialmente atenuado por la suplementación dietética de vitamina E
<b>Tang y col., 2016</b>	<i>In vivo</i> . Bebés y niños pequeños con deficiencia de hierro	Terapia con hierro (6 mg / kg / d) más placebo (n = 22) o hierro (6 mg / kg / d) más vitamina E (18 mg / d, n = 14) durante 8 semanas	Estado de hierro e inflamación  Microbioma intestinal	Adicionar vitamina E junto con el tratamiento terapéutico con hierro podría, al disminuir la inflamación y favorecer la absorción del hierro
<b>Arnon y col., 2009</b>	<i>In vivo</i> . Recién nacidos prematuros	Recibieron las 2 o 4 semanas de edad 5 mg/kg/d de complejo de hierro polimaltosa no	Niveles de Vitamina E  Parámetros bioquímicos	La combinación de hierro y vitamina E resultó ser eficaz y segura para mejorar la anemia en los

		iónico con una dosis diaria de 25 UI de vitamina E (como dl- acetato de $\alpha$ -tocoferol) a partir de las 2 semanas de edad		recién nacidos prematuros
<b>Madhikarmi y Murthy, 2014</b>	<i>In vivo</i> . Pacientes anémicos (30 años prox).	Los pacientes y sujetos sanos recibieron suplementos de vitamina C y E durante 15 días (400 mg una vez al día).	Peroxidación lipídica (MDA) CAT SOD GPx vitamina A vitamina C vitamina E Actividad antioxidante total	Con la suplementación se logró una menor peroxidación lipídica y un aumento de vitaminas antioxidantes
<b>Şimşek Orhon y col., 2006</b>	<i>In vivo</i> . Pacientes con IDA de nueve meses	Tratamiento con hierro, y hierro con vitamina E.	Malonaldehído (MDA) vitamina E SOD	Los niveles de malonaldehído del grupo tratado con vitamina E resultaron más bajos durante el tratamiento.
<b>Isler y colaboradores, 2002</b>	<i>In vivo</i> . Pacientes con ADH	Los pacientes recibieron hierro oral (567,7 mg) dos veces al día de sulfato de ferroglicina. Otro grupo hierro parenteral (polimaltosa de hidróxido de ferro III; 200 mg IM).  El tercer grupo	Superóxido dismutasa (SOD) glutación peroxidasa (GSH-Px)	La suplementación con vitamina E junto con el tratamiento con hierro Parental resultó ser eficaz para restaurar parcialmente el estado antioxidante en la anemia

		recibió hierro parenteral más vitamina oral.  E (300 mg/día oralmente)		
<b>Rodríguez-Ribera y col., 2017</b>	<i>In vivo.</i> Pacientes con hemodiálisis.	Uso de membranas de polisulfona recubiertas con vitamina E	MNi  Ensayo Cometa	Los pacientes con deficiencia de vitamina E mostraron niveles más altos de daño oxidativo en el ADN. Tras el uso de membranas recubiertas de vitamina E detectamos una disminución significativa en los niveles de daño oxidativo
<b>Record y Jannes, 2000</b>	<i>In vivo e In vitro.</i> Esplenocitos sometidos a desafíos oxidativos <i>ex vivo</i> .	El contenido final de hierro de las dietas fue de 45 mg de Fe/kg o de 205 mg de Fe/kg de dieta (hierro normal o alto), sin la adición de $\alpha$ -tocoferol o con la adición de 67 mg de $\alpha$ -tocoferolacetato / kg. dieta (baja o alta vitamina E)	MNi	A pesar de las concentraciones de $\alpha$ -tocoferol significativamente más altas en plasma e hígado en animales suplementados con esta vitamina, no hubo protección aparente contra la genotoxicidad oxidativa.
<b>Fenech y col., 1997</b>	<i>In vivo.</i> Voluntarios sanos varones de entre 50 y 70 años. Análisis realizado en sangre periférica	D-alpha-tocopherol (VITE) recomendación de ingesta diaria (10.0 mg or 14.9 IU VITE)	Vitamina E  MNi	El aumento de vitamina E no tuvo un impacto significativo en la tasa de daño genético basal y

				tampoco hubo correlación entre la frecuencia de daño genético basal y el estado de vitamina E
<b>Kan y col., 2002</b>	<i>In vivo.</i> Pacientes con diálisis	Suplementación con vitamina E (600 mg/día) en después de 14 semanas de tratamiento	Ensayo Cometa	Efecto genoprotector. Observaron que el índice de daño disminuye 6 veces su valor
<b>Ozdemir y col., 2014</b>	<i>In vivo.</i> Niños con talasemia	Suplementados con vitamina E (10 IU/kg/día) durante 3 meses	Ensayo Cometa	No encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes suplementados