

## EVENTOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS QUE EXPLICAN EL EFECTO ANTIANÉMICO DEL TRATAMIENTO QUE COMBINA EL HIERRO HEMÍNICO QUE APORTA EL TROFIN DESHIDRATADO, Y EL IÓNICO DE LAS SALES FERROSAS.

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro Nacional de Biopreparados (BioCen)

**AUTORES PRINCIPALES:** Yenela García Hernández<sup>1</sup>, Olimpia V. Carrillo Farnés<sup>2</sup>, Raúl González Hernández<sup>1</sup>.

**OTROS AUTORES:** Virgilio Bourg Llamo<sup>1</sup>, Alain Morejón Calderón<sup>1</sup>.

**OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:** <sup>2</sup> Facultad de Biología. Universidad de la Habana, <sup>3</sup>Facultad de Ciencias. Universidad autónoma de México (UNAM), México. <sup>4</sup> Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.

**COLABORADORES:** René Cárdenas Vázquez<sup>3</sup>, Javier Díaz Castro<sup>4</sup>, María I López Arteaga<sup>4</sup>, Margarita Sánchez Campos<sup>4</sup>, Elisa Aznar García<sup>1</sup>, Claudio Rodríguez Martínez<sup>1</sup>, Alexis Labrada Rosado<sup>1</sup>, Yenisleidys Revilla Fernández<sup>1</sup>, Lais Pérez Pérez<sup>1</sup>, Julio S. Pérez Marrero<sup>1</sup>, Sidelsi Suárez<sup>1</sup>, Maritza González<sup>1</sup>, María José Muñoz Alférez<sup>4</sup>, Agustín Carmona<sup>3</sup>, Aurora Ramos<sup>4</sup>, Silvia Hijano<sup>4</sup>, Sergio Angeles<sup>3</sup>, Águeda García Pérez<sup>3</sup>.

### AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA:

Yenela García Hernández. Dirección particular Calle 32 número 2504, entre 25 y 27. Municipio Quivicán. Provincia Mayabeque.

Email [yenela@biocen.cu](mailto:yenela@biocen.cu). Teléfono 047-425792.

### RESUMEN

Durante los últimos 20 años BioCen ha desarrollado una línea de antianémicos y suplementos nutricionales que contienen hierro (Fe) en forma hemínica, los cuales han demostrado una elevada eficacia en la prevención y el tratamiento de la anemia, sin que se reporten las reacciones adversas comúnmente observadas en los preparados que contienen Fe en forma iónica. El ingrediente farmacéutico activo que aporta el Fe en forma hemínica, en el caso de los productos que se utilizan como suplementos nutricionales en tabletas, es el Trofin deshidratado, el cual se obtiene de la hidrólisis enzimática de la sangre bovina en presencia de un extracto de pepsina obtenido del estómago del bovino, y al que finalmente se le adicionan miel de abejas y propóleos. Se conoce que la eficacia clínica de los suplementos antianémicos, donde se combinan ambas formas químicas del Fe, es superior a aquellos que solo contienen Fe en una u otra forma química. Sin embargo, no se tiene referencia de estudios en modelos experimentales, que

permitan una comprensión más completa y profunda del efecto antianémico de este tipo de preparados. La investigación incluyó el desarrollo de una metodología para obtener un modelo de anemia por deficiencia de Fe en ratas, mediante restricción del aporte de Fe en la dieta. Esta es la primera experiencia reportada en el país y es una herramienta valiosa que puede ser utilizada en el desarrollo y evaluación de suplementos nutricionales y medicamentos que permitan prevenir y tratar la anemia por deficiencia de Fe, la cual constituye un problema de salud pública en Cuba. En este trabajo se obtuvieron evidencias experimentales, acerca del efecto favorable de este tipo de abordaje farmacológico, cuando se produce anemia de origen nutricional por deficiencia de Fe. Estos resultados obtenidos en el modelo de ratas anémicas son congruentes con los resultados clínicos de los productos antianémicos y reconstituyentes de origen natural desarrollados por BioCen y contribuyen a sustentar científicamente la superioridad del efecto antianémico asociado a la combinación de ambos tipos de Fe. Los resultados que reúne la presente investigación están incluidos en seis artículos publicados en revistas nacionales (4) e internacionales (2). Además, han sido reconocidos como trabajos destacados del Fórum de Ciencia y Técnica a nivel de base en 2007, 2010 y 2013. También fueron reconocidos como resultados destacados en el Fórum de Ciencia y Técnica a nivel Provincial en 2015 y se han presentado en más de 10 eventos científicos con carácter internacional. Los resultados obtenidos en este trabajo forman parte de una tesis de maestría defendida en 2010 y de una tesis de doctorado defendida en 2014. Los resultados de la aplicación clínica de los productos de la línea Trofin han sido reconocidos con anterioridad como premio CITMA provincial, en el 2001 vinculado a la presentación como solución oral (Trofin<sup>®</sup>) y en el 2013 en relación al impacto de las tabletas de NeoTrofin<sup>®</sup>, NeoTrofinC<sup>®</sup> y NeoTrofinCF<sup>®</sup>.

## COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO.

### *Introducción.*

La anemia de origen nutricional por deficiencia del consumo de Fe en la dieta, es el problema de salud pública más extendido en el mundo y afecta mayoritariamente a las embarazadas y a los niños pequeños. La elevada frecuencia de anemia en Cuba la ha convertido en un importante problema de salud pública. Desde hace varios años, ha sido una preocupación constante de la dirección del país el desarrollo de preparaciones farmacéuticas más eficientes para combatir y minimizar en la población cubana los efectos de este padecimiento nutricional.

Las intervenciones nutricionales para prevenir y tratar la anemia ferropénica tradicionalmente se han enfocado en la administración de suplementos de Fe iónico en forma de sales ferrosas como el sulfato y el fumarato ferroso, indistintamente, ya que presentan la misma biodisponibilidad. Sin embargo, se ha descrito que estos preparados tienen una efectividad limitada, lo cual está vinculado en gran medida a la ocurrencia de reacciones adversas gastrointestinales que se producen entre un 30 y un 50 % de los pacientes. A partir de los inconvenientes que presenta la administración de preparados de Fe iónico, se han desarrollado también suplementos que contienen Fe hemínico aportado por la hemoglobina (Hb) de la sangre de diferentes especies animales. En este sentido se pueden mencionar diversos productos desarrollados por BioCen y aplicados clínicamente en Cuba en los últimos 20 años, entre los que se incluyen Trofin<sup>®</sup>, NeoTrofin<sup>®</sup>, NeoTrofin-C<sup>®</sup> y NeoTrofin-CF<sup>®</sup>, los cuales han demostrado alta eficacia en la prevención de la anemia en embarazadas, sin las reacciones adversas comúnmente observadas en los preparados de Fe iónico.

Por otra parte, en el año 2013 se desarrolló un nuevo suplemento nutricional, ComBiFer<sup>®</sup> que combina ambas fuentes de Fe en su formulación, es decir, el Fe hemínico aportado por el Trofin deshidratado y fumarato ferroso como fuente de Fe iónico. Este producto ha demostrado una eficacia clínica superior a aquellos que solo contienen hierro en forma hemínica o iónica, aplicado como suplemento nutricional en la prevención de la anemia en embarazadas. Además, internacionalmente, también se han reportado estudios de intervención nutricional donde combinan la suplementación con hidrolizados de sangre animal como fuentes de Fe hemínico, y diferentes sales de Fe para aportar el mineral en forma iónica. Sin embargo, no se tiene referencia de reportes de estudios en modelos experimentales, que permitan una mejor comprensión del efecto antianémico de este tipo de preparados. El objetivo de este trabajo fue dilucidar los eventos bioquímicos y fisiológicos, asociados al tratamiento combinado con Trofín deshidratado como fuente de Fe hemínico y sales ferrosas como fuente de Fe iónico, durante la recuperación de la situación fisiológica de la anemia por deficiencia de Fe, que se generó en ratas recién destetadas.

## **Resultados**

### *Obtención de un modelo de anemia por deficiencia de Fe en ratas*

El modelo de ratas anémicas, que se obtiene por restricción del aporte del Fe en la dieta administrada a ratas recién destetadas, es uno de los más utilizados internacionalmente para evaluar el efecto antianémico de diferentes preparados de Fe, así como de otros aspectos relacionados con la seguridad y el efecto fisiológico en general de estas preparaciones. En este trabajo se evaluaron tres metodologías diferentes para obtener el modelo de anemia en ratas. En todos los casos se utilizaron animales recién destetados y en el primer diseño experimental se evaluaron ratas de ambos sexos de la línea Sprague Dawley. La dieta utilizada tuvo un contenido de proteínas de 12 %, valor inferior a lo requerido para la especie durante el periodo de crecimiento, que es de 20 % de proteínas. El periodo experimental se extendió hasta 56 días y al finalizar se obtuvo una eficiencia de animales anémicos entre 60 y 70 %. Los animales del sexo femenino respondieron mejor al tratamiento.<sup>1</sup>

En un segundo diseño experimental se utilizó una dieta de caseína que contenía 20 % de proteínas, el tratamiento se extendió hasta 42 días, se utilizaron animales hembras recién destetados de la línea Sprague Dawley y se obtuvo que el 100 % de los animales desarrollaron la anemia. Un diseño similar al anterior se aplicó en ratas Wistar machos recién destetados y al término de los 45 días de tratamiento también se obtuvo que todos los animales resultaron anémicos.<sup>2</sup> En todos los diseños experimentales utilizados para obtener el modelo de ratas anémicas, esta condición patológica se verificó a partir del comportamiento de la concentración de Hb en sangre.

Sin embargo, en el trabajo desarrollado en ratas Wistar también se pudo profundizar en otros indicadores que demostraron el establecimiento de la condición fisiológica de anemia, como fue el contenido de Fe en el hígado como órgano principal de reserva en los animales, así como el efecto oxidativo que presentaban las proteínas y los lípidos a nivel de la mucosa intestinal y el hígado (Tabla 1). Los resultados obtenidos demostraron que en los animales anémicos, con respecto a los controles sin anemia se produjo un incremento del daño oxidativo a las proteínas y a los lípidos del hígado, evidenciándose otro de los efectos adversos asociados a la condición de anemia ferropénica severa.<sup>2</sup>

Tabla 1. Parámetros que caracterizan el modelo de anemia en ratas Wistar machos recién destetadas.

Parámetros	Anémico (n=7)	Control sin anemia (n=7)
Hb (g.L <sup>-1</sup> ) inicio	91,11 ± 2,28 <sup>a</sup>	91,26 ± 2,59 <sup>a</sup>
Hb (g.L <sup>-1</sup> ) final ( 45d)	142,71 ± 2,43 <sup>a</sup>	30,08 ± 2,12 <sup>b</sup>
Peso corporal (g) inicio	43,99 ± 2,80 <sup>a</sup>	44,43 ± 2,34 <sup>a</sup>
Peso corporal (g) inicio ( 45d)	178,17 ± 2,48 <sup>a</sup>	249,67 ± 2,68 <sup>b</sup>
Fe en hígado (µg/g peso seco)	190,80 ± 80,71 <sup>a</sup>	278,89 ± 62,53 <sup>b</sup>
Daño a lípidos en mucosa duodeno (nM MDA/mg proteínas)	68,70 ± 9,79 <sup>a</sup>	105,83 ± 10,44 <sup>b</sup>
Daño a proteínas en mucosa duodeno (nM/mg proteína)	3,39 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,85±0,36 <sup>b</sup>
Daño a lípidos en hígado (nM MDA/mg proteínas)	35,35 ± 4,16 <sup>a</sup>	26,07 ± 3,68 <sup>b</sup>
Daño a proteínas en hígado (nM/mg	42,32±4,10 <sup>a</sup>	28,33±3,71 <sup>b</sup>

La importancia científica de este resultado en el campo de la bioquímica de la nutrición para el país, así como su impacto social está relacionada con el hecho de que es la primera experiencia reportada donde se obtiene un modelo de anemia en ratas por deficiencia de Fe de origen nutricional, donde se logran reproducir varios de los eventos fisiológicos y bioquímicos que caracterizan a esta condición patológica, de alta prevalencia en la población cubana. En conclusión, el modelo animal de anemia desarrollado en este trabajo, tiene la posibilidad de ser reproducido en la institución, así como en otros laboratorios del país, para aplicarlo en el desarrollo y la evaluación de diferentes preparados de Fe, los cuales tienen alta demanda en la población cubana. *Aplicación del modelo de anemia en ratas para dilucidar los eventos bioquímicos y fisiológicos que explican el efecto antianémico del tratamiento*

En el modelo de ratas anémicas desarrollado se verificó el efecto antianémico del tratamiento aportado por el Trofin deshidratado y una sal ferrosa como fuente de Fe iónico. Además, se logró determinar la fracción del mineral utilizado, a partir de la cantidad ingerida, lo que se conoce como biodisponibilidad. Los estudios de biodisponibilidad mineral para el Fe se abordaron por dos metodologías diferentes, las cuales son muy utilizadas internacionalmente en estudios con objetivos similares al de este trabajo. Una de estas metodologías fue la de la Eficiencia de Regeneración de la Hb (ERH), ya que esta proteína contiene la mayor cantidad del Fe circulante en el organismo, y que en situación de anemia, el principal destino del Fe ingerido en la dieta, es la síntesis de Hb.

Este experimento evidenció una mayor eficiencia en la utilización del Fe en la generación de Hb de la combinación de ambas fuentes de Fe (hemínico e iónico) con respecto a la administración solamente de Fe iónico. Aunque en el experimento la concentración de Hb al finalizar el

tratamiento fue similar entre los grupos tratados con ambas fuentes de Fe (128,7 y 133,14 g. L<sup>-1</sup>) y el grupo que recibió tratamiento solo con la sal ferrosa (125,63 g. L<sup>-1</sup>), la ERH en los grupos que recibieron el tratamiento combinado fue de 150,84 y 90,27 %, mientras que en el grupo anémico tratado con la sal ferrosa solamente fue de 42,27 %. Estos resultados se explican ya que en los grupos tratados con ambas fuentes de Fe, la cantidad de Fe ingerido fue menor, así como también fue menor la cantidad de Fe total que recibieron los animales para recuperarse de la situación fisiológica que estableció la situación anémica. La misma correspondió en los dos grupos que recibieron Trofin deshidratado y sulfato ferroso, únicamente al 31 y 60 % de la dosis efectiva media determinada en este tipo de modelo animal para recuperarse de la anemia, que es de 35 mg de Fe por kilogramo de dieta.

Para esclarecer las interrogantes planteadas en el experimento anterior, se utilizó el método de balance nutricional, el cual permitió medir la cantidad de Fe absorbida a nivel intestinal. Este aspecto no se conocía como se comportaba en este tipo de tratamiento combinado. Se demostró que en el grupo anémico tratado con la combinación de Trofin deshidratado y sal ferrosa, la cantidad de Fe absorbido fue menor que en el grupo anémico que recibió el tratamiento de sal ferrosa solamente.<sup>4</sup> Apartir de estos resultados se pudo conocer, por primera vez, que durante el tratamiento con la combinación de Trofin deshidratado y sal ferrosa, el incremento en el efecto antianémico no se producía debido al aumento del Fe absorbido (Tabla 2).

Tabla 2. Biodisponibilidad del Fe por el método de balance nutricional en ratas anémicas y normales tratadas durante 14 días con diferentes fuentes del mineral.

Grupo n=10	Fe			
	Ingerido ( $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ )	Fecal ( $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ )	Abs ( $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ )	CDA (%)
CNA- FeSO <sub>4</sub>	582,46 ± 19,72 <sup>a</sup>	284,44 ± 8,72 <sup>a</sup>	293,74 ± 20,79 <sup>a</sup>	51,17 ± 2,33 <sup>a</sup>
CA-FeSO <sub>4</sub>	572,92 ± 20,88 <sup>a</sup>	127,80 ± 6,73 <sup>b</sup>	453,57 ± 25,25 <sup>b</sup>	77,89 ± 2,78 <sup>b</sup>
A-Trofin + FeSO <sub>4</sub> -20	358,93 ± 21,42 <sup>b</sup>	84,04 ± 5,97 <sup>c</sup>	264,57 ± 27,14 <sup>a</sup>	76,45 ± 3,13 <sup>b</sup>

d: día. CNA- FeSO<sub>4</sub>: Grupo control sin anemia. CA- FeSO<sub>4</sub>: Grupo anémico tratado con FeSO<sub>4</sub>. A-Trofin+ FeSO<sub>4</sub>-20: Grupo anémico tratado con 1 mg de Fe Trofin y 20 mg de Fe de FeSO<sub>4</sub>. Valores de Media ± DE por grupos. r: rata. Para analizar las diferencias entre todos los grupos se realizó un ANOVA de una sola vía y para las diferencias por pares de grupos se utilizó una prueba de Tukey (p <0,05). <sup>a,b,c</sup> Diferencias significativas entre grupos para cada columna (p <0,05).

A partir de los elementos básicos conocidos del metabolismo del Fe hemínico que se han estado dilucidando recientemente, donde se ha demostrado en la línea celular CaCo-2 en mamíferos, que el Fe en forma hemínica se podía absorber íntegramente a nivel de la membrana vasolateral del enterocito y trasladarse hasta los tejidos eritroides donde también existían transportadores específicos para su internalización, se pudo proponer en este trabajo que el incremento en efecto antianémico de esta intervención nutricional se debe a que la molécula que contiene el Fe en forma hemínica, puede ser utilizada íntegramente en la síntesis de Hb.

Por otra parte, en el modelo animal de ratas anémicas, se pudieron estudiar otros elementos de la seguridad y la eficacia de este tipo de tratamiento que combina Trofin deshidratado y Fe en forma de sal ferrosa, de los cuales no se tenía referencia con anterioridad. Entre los resultados se encuentra que se demostró por primera vez que el tratamiento combinado con ambas fuentes de Fe, no ocasionó efectos adversos gastrointestinales, vinculados con la generación de daño oxidativo a las proteínas y los lípidos de la región intestinal donde se produce la absorción del mineral, el duodeno. También se verificó la ausencia de eventos adversos en preparaciones histológicas de la mucosa gástrica.<sup>5</sup>

Otro grupo de experimentos abordó con mayor profundidad efecto oxidativo de este tipo de tratamiento en varios tejidos y órganos, como el cerebro, el hígado, la mucosa intestinal y la sangre, donde se analizó el comportamiento de tres sistemas antioxidantes endógenos: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD),<sup>4</sup> así como el daño a los lípidos, las proteínas y el ADN.<sup>6</sup> En resumen, ambos estudios demostraron la mayor seguridad de este tipo de tratamiento, con respecto a los suplementos nutricionales más utilizados que solo contienen Fe en forma iónica.

Se estudió por primera vez el comportamiento de la biodisponibilidad del Cu y el Zn durante el tratamiento con formulaciones de Trofin deshidratado y sales ferrosas durante la recuperación de los animales anémicos. Se demostró que las formulaciones combinadas de Fe no afectaron la utilización de estos dos minerales,<sup>4</sup> que comparten el mismo transportador intestinal que el Fe de origen iónico.<sup>3</sup>

A su vez, el comportamiento de estos indicadores de daño oxidativo a nivel intestinal, aportó elementos a la hipótesis planteada anteriormente para explicar cómo se utiliza más eficientemente la molécula de Fe en forma hemínica aportada por el Trofin deshidratado, durante el tratamiento de los animales anémicos. El hecho de que se produjo un menor daño oxidativo a nivel intestinal en los animales que recibieron tratamiento combinado con Trofin deshidratado y Fe iónico, es una condición que favorece la conservación de la molécula de Fe hemínico a través de su paso por el enterocito, para posteriormente ser absorbida íntegramente a nivel de la membrana basolateral. Cuando la estructura química completa de la molécula de Fe en forma hemínica logra atravesar la membrana basolateral del enterocito, bajo las condiciones fisiológicas de anemia por deficiencia del aporte de Fe en la dieta, se incrementa la posibilidad de que la misma no sea degradada en el hígado, sino que se transporte directamente hasta la médula ósea, para que se incorpore íntegramente a la síntesis de Hb durante la producción de los eritrocitos.

En este trabajo se concatenan de manera integral una serie de metodologías novedosas que permitieron reunir nuevas evidencias experimentales, acerca del efecto favorable de este tipo de abordaje farmacológico, cuando se produce anemia de origen nutricional por deficiencia de Fe. Estos resultados que se obtuvieron en el modelo de ratas anémicas pueden contribuir a sustentar científicamente los resultados positivos evidenciados en la práctica clínica, de los productos antianémicos de origen natural desarrollados por BioCen, específicamente el producto ComBiFer<sup>®</sup> que combina ambas fuentes de Fe en su formulación, es decir, el Fe hemínico aportado por el Trofin deshidratado y el fumarato ferroso como fuente de Fe iónico.

## REFERENCIAS

1. García Y, García-Pérez A, Ángeles-Campos S, Carmona-Castro A, Cárdenas-Vázquez R. Evaluación de dieta purificada para la obtención de biomodelo de ratas anémicas. *Rev Cub Inv Biom* 2013; 32(3). Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002013000300007&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002013000300007&script=sci_arttext).

(Consultado: Marzo 7, 2014).

2. García Y, Morejón A, Bourg V (2015) Efecto oxidativo de la anemia ferropénica severa en ratas Wistar machos recién destetadas. *Rev Cub Inv Biom*. 34 (1): 1-10.

3. García Y, González R, García A, Ángeles S, Carmona A, Cárdenas R. Efecto de la suplementación con diferentes fuentes de hierro durante la recuperación de ratas anémicas. *Rev CNIC Cienc Biol* 2013; 44(3): 14-22.

4. García Y, Díaz-Castro J, López-Aliaga I, Alférez MJM, Ramos A, Campos MS. Bioavailability of Fe, Cu and Zn and antioxidant defense in anemic rat supplemented with a mixture of heme/non heme Fe. *J Food Nutr Res* 2013; 52(2): 128-138.

5. García Y, González R, Espinosa G, Carmona A y Cárdenas R. Efecto antianémico y daño gastrointestinal en ratas suplementadas con diferentes formas de hierro. *Rev Cub Alim Nutr* 2011; 21(2): 186-196.

6. Díaz-Castro J, García Y, López-Aliaga I, Alférez JM, Hijano S, Ramos A, Campos MS. Influence of Several Sources and Amounts of Iron on DNA, Lipid and Protein Oxidative Damage During Anaemia Recovery. *Biol Trace Elem Res* 2013; DOI 10.1007/s12011-013-9802-9.