



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN HUMANA

**ESTUDIO DE LA HOJA DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* COMO ALTERNATIVA
DE HIERRO BIODISPONIBLE**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN NUTRICIÓN HUMANA

PRESENTA:
MAURICIO MARTÍNEZ ZAVALA

Co-dirigido por:

Dra. Teresa García Gasca
Dra. María Alejandra Mora A.

SINODALES

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Dra. María Alejandra Mora Avilés
Secretario

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado
Vocal

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola
Suplente

Dra. Juana Isela Rojas Molina
Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2012
México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE
LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO Y EN LA UNIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA DEL INIFAP-GUANAJUATO BAJO LA CO-DIRECCIÓN DE
LAS DRAS. TERESA GARCÍA GASCA Y ALEJANDRA MORA AVILÉS**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios la sabiduría que me dio para iniciar esta etapa de mi vida, la fortaleza para poder saltar cada obstáculo que se me presentó, la luz que nunca dejó de mandarme en las madrugadas cuando sentía que ya no podía mas y que el sueño y la tensión parecía que me ganarían, la oportunidad de concretar esta meta y de poner en mi camino personas tan adecuadas para ayudarme a que este camino tan pesado pero tan gratificante y hermoso fuera mas fácil. Gracias Dios.

Agradezco a mis padres Ángel Martínez y Josefina Zavala por su incondicional apoyo en todos los sentidos, si yo logré concretar una etapa mas en mi vida es porque de ustedes siempre recibí el ejemplo de luchar, el consejo de seguir lo que uno quiere --y quizá cuando este segundo camino de la nutrición se inició no fue de su total agrado pero me ayudaron como siempre lo han hecho—y me empujaron, motivaron y escucharon mis tristezas, apoyaron mis locuras, acallaron mis lamentos y brincaron de alegría con mis triunfos. Gracias por todo y vamos por mas, juntos como siempre!

A mis hermanos Juan Ángel, Alejandro, Marina, Juan y Darío por su apoyo cada vez que se me dificultaba el camino, cuando necesitaba una sonrisa o que me hicieran reír, gracias. Mis dos hermosas sobrinas Diana y Fanny también han sido una motivación.

A la Dra. Ma. Laura Ruiz Paloalto, Directora de la División de Ciencias de la Salud e Ingenierías del Campus Celaya-Salvatierra de la Universidad de Guanajuato por el apoyo brindado para la realización de este Proyecto, sin su apoyo esto hubiera sido más difícil. Gracias por la confianza depositada, el apoyo y su amistad.

A la Lic. Graciela Gutiérrez Sámano porque usted fue la primera que me impulsó a estudiar una maestría y me brindó su apoyo como directora de la UNESS para proyectar mi desarrollo profesional, gracias por su amistad.

A los Doctores Carlos Hernán Herrera Méndez y Lorena Vargas Rodríguez, miembros del Cuerpo Académico de Ing. Agroindustrial de la Universidad de Guanajuato, porque cuando el comité de admisión a la maestría me solicitó la firma de apoyo de dos investigadores prestigiosos ustedes no dudaron en apoyarme y recomendarme. En pocas palabras ustedes fueron los que me dieron la patadita de buena suerte en este camino. La recomendación de dos personas con un curriculum impresionante ayudó mucho a que me aceptaran! Gracias

Alma Delia Trujillo Santoyo “amiguirri” como no agradecerte si en estos tres años escuchabas detenidamente mis avances, mis presentaciones, me ayudaste a ensayar para mis tutorales, opinabas y me dabas ánimos para seguir adelante.

A mi amiga Mónica Fernández Vargas por tenderme la mano y su apoyo siempre que ha estado en sus manos. Por su amistad incondicional y por ser la persona que me ayudó a entender todo el proceso de trabajo en la Universidad de Guanajuato.

A mis amigos Emmanuel, Luzma, Mónica, Paloma, Elvia, Priscila, Mayra, Laura, Berenice, Susana, Paty, Rafa, Gil, Botello, Tere, Katy, Fabiola, Norma Victoria, Cristian Uriel, Pepe, Daniel, René, Estefanía, Dianelli, Karem, Paola y Fer. Gracias por sus palabras de aliento, por esos “ya merito” y “tu puedes” y perdón si alguna vez me alejé un poco de ustedes y nos les brindé el tiempo que ustedes se

merecen, todo fue buscando una superación y miren aquí esta este trabajo concluido.

A mis asesoras las Doctoras Teresa García Gasca y María Alejandra Mora Avilés, he aprendido tanto de ustedes, pero sí en el ámbito profesional aprendí mucho de ustedes, en el personal fue lo máximo, aparte de un curriculum tan sorprendente ustedes dos son personas con una calidad humana única, gracias por su paciencia y apoyo al 100%.

A mis sinodales Dr. Horacio Salvador Guzmán Maldonado, Miriam Aracely Anaya Loyola y Juana Isela Rojas Molina por sus sabios consejos en la realización de este trabajo, el apoyo en la práctica, las horas dedicadas a pulir esta tesis y por siempre estar dispuestos. Gracias.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Forestales y Pecuarias de Celaya por el apoyo total en la realización de este proyecto.

Al Dr. Alejandro Blanco, José Luis y Tere del Laboratorio de Defensa de Plantas de la Unidad de Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Irapuato por su apoyo en la realización de las pruebas de inhibidores de proteasas. Gracias.

A mis compañeros de generación en la Maestría en Nutrición Humana por pasar tan buenos fines de semana juntos, chicos lo hemos logrado!!!

Mis compañeros de laboratorio Ulises, Roberto, Jos, Ricardo, Alejandra, Chikis, Juanita y Mijail por los buenos ratos y por el apoyo en cada una de las etapas en que necesité mas de 10 manos para realizar las pruebas y experimentos.

A Verito Andrade por apoyarme con sus consejos, conocimientos y empuje en el manejo del Bioterio, gracias Verito porque siempre con una sonrisa dijiste “claro, te apoyo”.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, hermanos y sobrinas, gracias por ser la mejor familia del mundo, por siempre estar unidos, por los buenos ratos que son casi siempre, porque ante cualquier problema siempre he sabido que no estoy solo, que me respaldan, ayudan, guían, cuidan, alientan y motivan.

RESUMEN

Las necesidades nutricionales del hierro en los seres vivos derivan del papel fundamental que ejerce dicho metal en la función celular. La falta de hierro en el organismo ocasiona anemia, una de las deficiencias nutricionales más comunes en el mundo. El frijol se ha considerado uno de los alimentos más nutritivos en la dieta, entre otras por su contenido de hierro. Recientes investigaciones han demostrado que el contenido total de hierro en hojas de frijol liofilizadas (HFL) es, en promedio, diez veces mayor que el hierro total en el grano. No existen estudios previos que muestren la biodisponibilidad de hierro en las HFL, por lo que esta investigación buscó determinar el efecto del consumo de hojas de frijol sobre los marcadores sanguíneos hemoglobina y ferritina en ratas Wistar. Se provocó deficiencia de hierro en ratas de 8 semanas de edad y posteriormente se reintegró hierro como dieta convencional, HFL o sulfato ferroso. Los resultados mostraron que la reincorporación de hierro con HFL provocó una alta recuperación de hemoglobina (118%) mientras que la ferritina no se recuperó y alcanzó únicamente un 20% por arriba del valor observado para el grupo deficiente. Adicionalmente, el número de glóbulos rojos superó al control en un 24%, los glóbulos blancos se incrementaron en un 80% y se observó un aumento importante en granulocitos. Lo anterior sugiere que la HFL contiene hierro biodisponible de rápida asimilación y estimula al sistema inmune.

Palabras clave: Hoja de frijol, *Phaseolus vulgaris*, hierro, sistema inmune

ABSTRACT

The nutritional needs of iron in living organisms derive on the fundamental role exerted by the metal in cellular function. The lack of iron in the body causes anemia, one of the most common nutritional deficiencies worldwide. The bean is considered one of the most nutritious foods in the diet, including for its iron content. Recent investigations have shown that the total iron content in lyophilized bean leaves (LBL) is, on average, ten times greater than the total iron in the grain. There are no previous studies that show the bioavailability of iron in the LBL, so this study sought to determine the effect of consumption of bean leaves on blood hemoglobin and ferritin markers in Wistar rats. Iron deficiency was induced in rats of 8 weeks old and subsequently rejoined as conventional diet iron, LBL or ferrous sulfate. The results showed that the reincorporation of iron with LBL provoked a high recovery in hemoglobin (118%) while ferritin was not recovered and reached only 20% above the value observed for the deficient group. Additionally, the number of red cells exceeded the control by 24%, white blood cells increased by 80% and there was a significant increase in granulocytes. This suggests that LBL contains bioavailable iron, of fast assimilation and stimulates the immune system.

Key words: Bean leaves, *Phaseolus vulgaris*, iron, immune system

INDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract	ii
Índice general	iii
Índice de cuadros	v
Índice de figuras	vi
Introducción	1
Antecedentes	3
El hierro como elemento químico	3
Historia clínica del hierro	3
Función biológica del hierro	6
Absorción de hierro	7
Hierro funcional	10
Hierro de depósito	14
Anemia por deficiencia de hierro	20
Prevalencia de anemia en México	23
Problemas metabólicos asociados a los excesos de hierro	26
Ingesta diaria recomendada de hierro	29
Contenido de hierro en algunos alimentos	30
El frijol como alimento	31
Contenido de hierro en el frijol	32
Justificación	36
Hipótesis	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37
Materiales y métodos	38
Origen de la hoja de frijol	38
Análisis químico proximal	38
Determinación de humedad y materia seca	38

Determinación de cenizas	39
Determinación de proteína cruda	40
Obtención de extracto etéreo	41
Determinación de proteínas	42
Ánálisis de hierro	43
Determinación de compuestos fenólicos totales y solubles en agua	43
Determinaciones bioquímicas de factores antinutríctios	45
Determinación de taninos	45
Determinación de fitatos	46
Cuantificación de proteína	47
Cuantificación de inhibidores de proteasas	48
Determinación de la presencia de lectinas	49
Ensayo biológico	49
Animales	49
Dietas	50
Grupos de estudio	50
Determinación de los biomarcadores hematológicos	51
Determinación de la ferritina	52
Ánálisis estadístico	53
Resultados	55
Ánálisis químico proximal y contenido de hierro de la hoja de frijol liofilizada	55
Contenido de compuestos fenólicos totales y solubles en agua	56
Contenido de factores antinutríctios	56
Estudio Biológico	60
Conclusiones	71
Perspectivas	72
Referencias bibliográficas	73
Anexos	92

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1 Puntos de corte para diagnosticar anemia	23
CUADRO 2 Ingesta diaria recomendada de hierro	29
CUADRO 3 Contenido de hierro en alimentos presentes generalmente en la dieta del mexicano	30
CUADRO 4 Contenido de factores antinutricios en el grano de frijol	33
CUADRO 5 Contenido de hierro en diversas partes de la planta de frijol	34
CUADRO 6 Contenido de hierro en diferentes partes y estadios de crecimiento de la planta de frijol	34
CUADRO 7 Análisis químico proximal de la Hoja de Frijol liofilizado	55
CUADRO 8 Contenido de compuestos fenólicos totales y solubles	56
CUADRO 9 Contenido de factores antinutricios en la hoja de frijol liofilizada	56
CUADRO 10 Comparación del peso del corazón, bazo e hígado de las ratas entre los periodos de disminución y recuperación de hierro	62
CUADRO 11 Resultados obtenidos para biomarcadores hematológicos	65

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Mecanismos de absorción de hierro	8
FIGURA 2 Estructura de la hemoglobina y el grupo hemo	11
FIGURA 3 Estructura de la mioglobina	12
FIGURA 4 Estructura de la ferritina	16
FIGURA 5 Estructura de la transferrina	19
FIGURA 6 Prevalencia nacional de anemia en niños mexicanos prescolares	24
FIGURA 7 Prevalencia de anemia en adolescentes mexicanos	24
FIGURA 8 Prevalencia de anemia en mujeres mexicanas	25
FIGURA 9 Prevalencia de anemia en hombres y mujeres mexicanos adultos	25
FIGURA 10 Comparación de la ganancia de peso entre grupos	61
FIGURA 11 Comparación del consumo de alimentos entre grupos	61
FIGURA 12 Comparación del peso de los órganos en el periodo de deficiencia	64
FIGURA 13 Comparación del peso de los órganos en el periodo de recuperación	64
FIGURA 14 Comparación de la población de las células sanguíneas en el periodo de deficiencia	66
FIGURA 15 Comparación de marcadores sanguíneos en el periodo de deficiencia	66
FIGURA 16 16 Comparación de la población de las células sanguíneas en el periodo de recuperación	67
FIGURA 17 Comparación de los marcadores sanguíneos en el periodo de recuperación	67
FIGURA 18 Comparación de hemoglobina y ferritina en el periodo de disminución	70
FIGURA 19 Comparación de hemoglobina y ferritina en el periodo de recuperación	70

1. INTRODUCCIÓN

Las necesidades nutricionales del hierro en los seres vivos derivan del papel fundamental que ejerce el metal en la función energética celular. Se encuentra distribuido en la naturaleza en dos formas, la forma química oxidada (Fe III) posee una baja solubilidad, comparado con la forma ferrosa (Fe II) que es la más asimilable. Como el hierro pasa fácilmente entre la forma férrica y ferrosa, se requiere de únicamente de necesarias para llevar a cabo las reacciones catalíticas en las que participa el metal y evitar la ruptura del equilibrio redox celular (Galaris y Pantopoulos, 2008; Kell, 2009). Este mineral se encuentra en los alimentos en dos formas diferentes conocidas como hierro *hem* y *hierro no hem*, las cuales siguen distintas rutas de absorción con diferente eficiencia y dependen de diversos factores, tanto fisiológicos como dietéticos (Bothwell y col., 1979; Andrews, 2008; De Domenico y col., 2008; Hentze y col., 2010). Los factores dietéticos actúan aumentando o disminuyendo la proporción del hierro absorbido y utilizado en el metabolismo es decir, afectan la biodisponibilidad de hierro en los alimentos (Hallberg, 1981). La falta de hierro en el organismo ocasiona, en último extremo, anemia, una de las deficiencias nutricionales más comunes en el mundo y que afecta tanto a países en vías de desarrollo como a países desarrollados (Looker y col., 1997; WHO, 2012).

Las dietas ricas en fibra pueden ser un factor de riesgo que incrementa la posibilidad de deficiencias de hierro en plasma debido a la presencia de fitatos y oxalatos que impiden su absorción (López y col., 2002), lo que ocasiona que del hierro presente en los vegetales tan solo el 5% aproximadamente sea biodisponible (Hidvegi y Lasztityi, 2002). No existe una población en el mundo que no se vea afectada por la deficiencia de hierro y por las graves consecuencias fisiológicas de ésta. Las costumbres, religión, economía, platillos típicos, formas de preparación de los alimentos, estilos de vida, salud mental, disponibilidad y seguridad alimentaria son factores que influyen fuertemente en la predisposición a las deficiencias de hierro y de otros nutrimentos (Skikine y Baynes, 1994; WHO, 2012).

El frijol forma parte de la canasta básica de muchos pueblos, incluyendo México, y se ha considerado uno de los alimentos más nutritivos en la dieta ya que es una buena fuente de proteínas de alta calidad (rico en triptófano), una buena fuente de carbohidratos complejos y un aporte significativo de fibra (Iniestra y col., 2005), pero su contenido de hierro promedia los 50 mg/kg de frijol (Ayala-Vela y col., 2008). Por tradición, en nuestro continente sólo se consume la semilla de frijol sin embargo, en zonas del continente Africano y Asiático la gente consume tanto la semilla como sus hojas y vainas frescas en ensaladas, cocidas, guisadas, en puré o molidas como condimento para otros alimentos (<http://www.nap.edu/catalog>).

Recientes investigaciones han mostrado que el contenido total de hierro en hojas de frijol es en promedio diez veces mayor que el hierro total en el grano de frijol (Ayala-Vela y col., 2008). Esto hace suponer que, debido a su importante contenido de hierro, el consumo de la hoja de frijol de forma típica pudiera ayudar a mantener los niveles adecuados de biomarcadores de hierro como hemoglobina y ferritina y también evitar los estados de deficiencia de hierro en aquellas personas que la consuman. No existen estudios que muestren la calidad nutricia de las hojas de frijol, por lo que la presente investigación se enfocó en determinar si el consumo de hoja de frijol es capaz de recuperar los niveles de marcadores plasmáticos relacionados con hierro después de provocar deficiencia a ratas.

2. ANTECEDENTES

2.1 El hierro como elemento químico

El hierro es un elemento químico distribuido ampliamente en la naturaleza. Es un metal pesado es decir, aunque no hay una definición química para este término, se considera pesado a todo elemento cuya gravedad específica sea mayor de cinco o supere significativamente a la de metales como el sodio, calcio y otros metales ligeros; pertenezcan a los elementos de transición y post-transición; se presenten en diferente estado de oxidación en agua, aire y suelo y presenten diversos grados de reactividad, carga iónica y solubilidad en agua (INE, 2009). Su símbolo químico es Fe que proviene del latín *ferrum*. Pertenece al grupo VIIIB y al cuarto periodo de la tabla periódica de los elementos químicos, su número atómico es 26 y tiene una masa atómica de 55.85 una. Es el cuarto elemento más abundante en la naturaleza después del oxígeno, silicio y aluminio. En la naturaleza se le encuentra formando varias sales minerales principalmente óxidos, muy rara vez se le encuentra puro, para lograr esto hay que reducir las sales minerales de hierro con carbono y posteriormente hay que refinarlo para eliminar impurezas (Bothwell y col., 1979; Mortimer, 1999).

2.2 Historia clínica del hierro

En la actualidad el hierro es el micronutriente más estudiado y por lo tanto el más comprendido metabólicamente hablando (Brock y col., 1994). La facilidad para obtener muestras de sangre y tejidos que permitan evaluar los biomarcadores metabólicos del hierro son la causa de la facilidad de su estudio. Sin embargo, ha sido un largo proceso para comprender su papel en los seres vivos y entender los desórdenes relacionados con las deficiencias y excesos de hierro los cuales, están presentes en todos los países del mundo sin importar su economía y desarrollo (WHO, 2012).

Desde tiempos remotos, el hierro fue utilizado por las civilizaciones antiguas con fines medicinales. Los egipcios lo utilizaban para prevenir la calvicie, los griegos lo

mezclaban con el vino para restaurar el vigor sexual en los hombres. Durante el siglo XVII, la anemia por deficiencia de hierro era conocida como la “enfermedad verde” o “clorosis” la cual se creía estaba relacionada con aspectos del amor pues se presentaba principalmente en mujeres jóvenes en edad de romance; el tratamiento típico para esta enfermedad era tomar vino al cual se le habían añadido limaduras de hierro. En el siglo XVIII fue aplicado por primera vez el Método Científico a los estudios nutricios con hierro cuando Menghini descubrió que éste es un componente importante de la sangre, cuando de una muestra de sangre seca logra levantar pequeñas partículas con ayuda de un imán (Mc Collum, 1957). El tratamiento terapéutico con el hierro inició en el año de 1832 cuando Blaud comprobó la eficacia del tratamiento de las deficiencias de hierro en mujeres “sin color” en la sangre pero fue hasta un siglo después cuando Heath y sus colaboradores se convencieron de que el hierro inorgánico puede ser usado metabólicamente para sintetizar hemoglobina al correlacionar que la cantidad de hierro suministrado parenteralmente a pacientes anémicos era proporcional al aumento de hemoglobina circulante en sangre (Heath y col., 1932).

En 1892, Bunge descubrió que los infantes eran especialmente susceptibles a las deficiencias de hierro al encontrar que la leche es una fuente pobre de hierro y que la alimentación exclusiva con leche era causa de anemia al disminuirse las reservas corporales de hierro. Fue hasta 1928 que se demostró que la prevalencia de anemia en niños del Este de Inglaterra disminuía considerablemente cuando la leche era fortificada con hierro (Mackay, 1928), pero el uso de leche fortificada en los Estados Unidos se aprobó hasta 1970. Fue en el año de 1920 cuando varios estudios sugirieron por primera vez la relación entre el consumo de algunos alimentos y el incremento de la hemoglobina, así como la relación entre la deficiencia en el consumo de éstos y la presencia de anemia. El alimento que mayor relación favorable presentó fue el hígado y los estudios arrojaron un resultado favorable entre su consumo y el incremento de los glóbulos rojos en la sangre (Mc Collum, 1957).

Hasta hace poco tiempo las deficiencias de hierro y anemia eran el enfoque principal del papel nutricio del hierro sin embargo, ahora se sabe que eso es solo una parte del espectro de desórdenes relacionados con el metabolismo de hierro. Actualmente, se presta atención también a los desórdenes por sobrecarga de hierro causados por elevadas ingestas o desórdenes metabólicos, debidos a desórdenes genéticos conocidos como hemocromatosis hereditaria que provoca un exceso de absorción de hierro de la dieta a nivel intestinal (Sheldon, 1935) y su consecuente depósito en los tejidos musculares como lo observó en 1847 Virchow por primera vez. Fue en el año de 1871 que Perls analizó tejidos de personas con este padecimiento y encontró que daban positivo a análisis cualitativos de hierro (Barton, 2003). En 1996 Feder y col. encontraron dos mutaciones causantes de este padecimiento en el gen HFE del cromosoma 6p.

Actualmente se considera que aproximadamente un 15% de la población mundial presenta anemia y que un 30% más tiene deficiencia de hierro. Aunque en los países en vías de desarrollo el hierro es la principal deficiencia nutrimental, los países desarrollados no se encuentran libres de esta deficiencia pues está relacionada con múltiples factores que van desde el factor económico, religioso, ideológico, social, político y geográfico (WHO, 2012). Además, existen grupos de riesgo a presentar deficiencia de hierro o anemia como pueden ser los recién nacidos, niños preescolares y escolares, adolescentes jóvenes, mujeres en edad reproductiva o embarazadas y adultos mayores. Las principales causas son el bajo consumo de hierro, una absorción y utilización inadecuada, un aumento en los requerimientos diarios, aumento en las pérdidas de sangre (por partos, hemorragias, accidentes, entre otros) y defectos en el almacenamiento (ENSANUT 2006).

Los gobiernos en muchos países así como la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) prestan gran atención a disminuir los porcentajes de personas con deficiencias de hierro debido a que se sabe la relación directa entre éstas y sus repercusiones en la salud. Actualmente se lanzan campañas nacionales y mundiales en educación alimentaria, seguridad

alimentaria, apoyo a los alimentos básicos, apoyo monetario a los más necesitados, distribución de alimentos fortificados y servicios de salud básicos que ayuden a mejorar las condiciones de salud y nutrición que presentan los grupos sociales más vulnerables y desprotegidos de cada país (WHO, 2012). Aunque el esfuerzo es grande, el trabajo es arduo y aún falta mucho camino por recorrer, estrategias que implementar, dinero que invertir antes de ver disminuidos los porcentajes de personas con deficiencia de hierro o anemia (ENSANUT, 2006).

2.3 Función biológica del hierro

El hierro es muy importante para los seres vivos pues, aunque se encuentra en muy pequeñas cantidades en el organismo, ha asumido un papel fundamental en el crecimiento y supervivencia de los seres vivos. Es necesario para lograr una adecuada oxigenación tisular, para la síntesis celular de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Orino y col., 2001) y para el metabolismo de la mayor parte de las células que lo utilizan por su flexibilidad química y su potencial redox los cuales permiten la unión del oxígeno a proteínas, la transferencia de electrones o mediar reacciones catalíticas (Aisen y col., 2001). El hierro se encuentra en el medio ambiente principalmente en forma férrica u oxidada (Fe III) que es una forma poco utilizable biológicamente debido a su limitada solubilidad a pesar de su alta abundancia. Tiene una capacidad muy grande de pasar de la forma reducida (Fe II o forma ferrosa) a la forma oxidada a nivel biológico lo que ayuda a mantener el equilibrio de las cantidades y formas de hierro que catalíticamente se requieren para mantener el equilibrio metabólico (Andrews, 2008; De Domenico y col., 2008; Hentze y col., 2010).

En los adultos sanos el hierro corporal total es de 4 g en hombres y 2.5 g en mujeres aproximadamente, es decir 35 mg/Kg en las mujeres y 50 mg/Kg en los hombres. En el cuerpo humano el hierro se encuentra distribuido de dos maneras: hierro funcional y hierro de depósito (Hallberg, 1981). La gran mayoría de este hierro (aproximadamente 2.1 g en humanos) está distribuido en la hemoglobina de los glóbulos rojos de la sangre, desarrollando células eritroides y ayudando en el

transporte de oxígeno a todas las células del cuerpo. También hay cantidades significativas de hierro en los macrófagos (por encima de los 600 mg), en la mioglobina de los músculos (aproximadamente 300 mg) mientras que el exceso de hierro (aproximadamente 1 g) es almacenado en el hígado (Andrews, 1999; Olsson y Norrby, 2008). El hierro también es potencialmente tóxico ya que bajo condiciones aerobias cataliza la propagación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de radicales altamente reactivos como el radical hidroxilo por medio de la Reacción de Fenton (Koppenol, 1993; Haidari y col., 2001). Esto ocasiona estrés oxidativo que se asocia con daños a biomoléculas, células, tejidos y consecuentemente a enfermedad (Galaris y Pantopoulos, 2008; Kell, 2009). De esta forma se ha descubierto que los mecanismos para adquisición, uso y destoxicificación del hierro plantean desafíos a células y organismos que desarrollaron sofisticados mecanismos para satisfacer sus necesidades metabólicas y al mismo tiempo minimizar los riesgos de toxicidad (Andrews, 2008; De Domenico y col., 2008; Hentze y col., 2010). Aunque hasta el momento no se conocen mecanismos para destoxicificar hierro, se sabe que las pérdidas de hierro se deben principalmente a la descamación de las células de la piel y la mucosa del tracto digestivo o a las pérdidas de sangre por menstruación o hemorragias. El balance de hierro a nivel corporal es controlado por los enterocitos en el duodeno que absorben el hierro proveniente de la dieta (Yeh y col., 2009).

2.3.1 Absorción de Hierro

El proceso de absorción del hierro se inicia con el hierro ingerido en los alimentos de la dieta, éste se puede encontrar en forma férrica o ferrosa (Figura 1). El hierro férrico es reducido por reductasas férricas como el Dcytb (citocromo b duodenal) y transportado en forma ferrosa a través de la membrana apical del enterocito por la DMT1 (transportadora de metales divalentes 1). El grupo hemo de la dieta puede ser también transportado a través de la membrana apical por un mecanismo aun desconocido y subsecuentemente metabolizado en el enterocito por la HO-1 (hemo oxigenasa 1) para liberar hierro ferroso. El hierro ferroso pasado directamente o el derivado del grupo hemo es procesado por el enterocito y eventualmente exportado a través de la membrana basolateral al torrente

sanguíneo por acarreadores de soluto y ferroportina que es una proteína transportadora de hierro ferroso también conocida como SLC11A3. El flujo del interior del enterocito al torrente sanguíneo es mediado por la ferroportina y su consecuente conversión a hierro férrico es catalizada por una ferroxidasa asociada a membrana llamada hefaestina que típicamente interactúa con la ferroportina y posiblemente con su homóloga ceruloplasmina que es una ferroxidasa plasmática. El hierro transportado a torrente sanguíneo y convertido a la forma férrica es recolectado por la transferrina y mantenido en forma férrica, en un estado redox inerte para ser liberado al interior de los tejidos (Yeh y col. 2009).

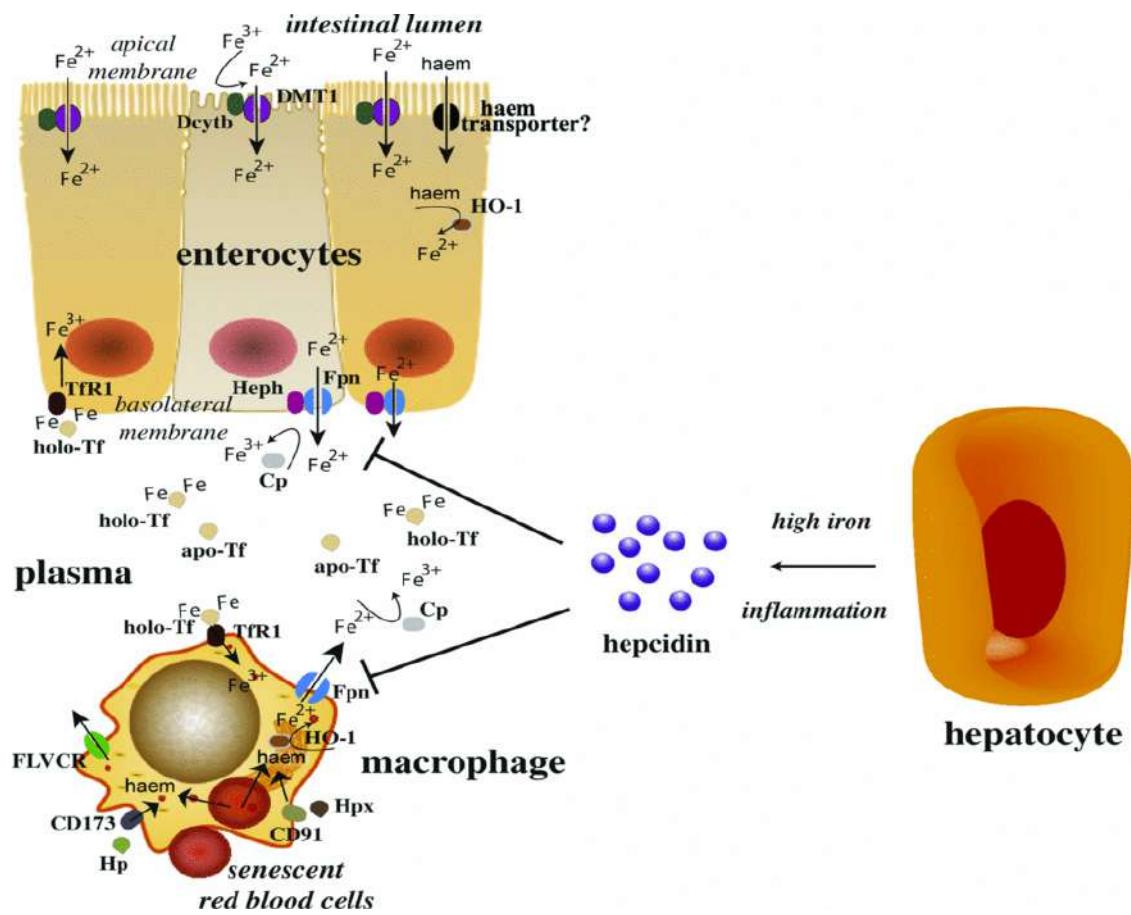


Figura 1. Mecanismo de absorción de hierro (Wang y Pantopoulos, 2011)

La reserva de hierro en la transferrina es mantenida mayoritariamente por el hierro reciclado de glóbulos rojos senescentes y minoritariamente por el hierro absorbido de la dieta. Los glóbulos rojos senescentes son tomados por macrófagos reticuloendoteliales, los cuales metabolizan la hemoglobina y el grupo hemo para liberar hierro ferroso al torrente sanguíneo. Los macrófagos también exportan el hierro ferroso de su membrana plasmática al torrente sanguíneo con la ayuda de la ferroportina y re-oxidado a su forma férrica con la ayuda de la ceruloplasmina y almacenada a transferrina. La ferroportina es muy importante en la regulación homeostática del hierro al mediar el hierro ferroso de los eritrocitos y enterocitos hacia el plasma, este proceso es regulado negativamente por la hepcidina, una hormona peptídica hepática que se une a la ferroportina y promueve su fosforilación y su entrada y consecuente degradación en el lisosoma (Nemeth y Ganz, 2009; Hentze y col., 2010). La hepcidina se expresa en el hepatocito como pro-hepcidina que después de una proteólisis se obtiene una molécula bioactiva de 25 aminoácidos que es secretada al torrente sanguíneo (Lee y Beutler 2009).

Se sabe que un individuo sano (sin anemia) solamente absorbe un 5-10% del hierro ingerido en la dieta, mientras que un individuo con anemia ferropénica absorbe entre el 20 y el 30% del hierro presente en la dieta (Zlotkin, 2001). Esto depende también del tipo de hierro aunque se sabe que la absorción del hierro hemo no está afectado por otros componentes de la dieta con excepción del calcio (Alférez y col., 2006) y que el cocinado prolongado puede conducir a la ruptura de la estructura porfirínica convirtiendo el hierro hemo en no hemo (Lombardi-Boccia, y col., 2002). La absorción del hierro no hemo se puede ver afectada por minerales presentes en la dieta que tienen propiedades fisicoquímicas similares al hierro no hemo como por ejemplo el zinc, magnesio, cobre y calcio (Reedy y Cook, 1997). Se sabe también que la presencia de la carne también estimula la absorción de hierro hemo a través de “un factor carne” cuya naturaleza sigue sin estar completamente clara (Swain y col., 2002). Finalmente, también se ha descubierto que la presencia de algunas sustancias químicas presentes en los alimentos como el ácido fítico (5-10 mg) puede inhibir hasta en un 50% la absorción del hierro no hemo, los polifenoles presentes en frutas, verduras, café,

té y especias también afectan la absorción del hierro no hemo y algunas proteínas como las de soya pueden disminuir notablemente la absorción del hierro no hemo (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

2.3.2 Hierro funcional

El hierro funcional forma parte de biomoléculas, células y tejidos, tiene una función metabólica o enzimática. Constituye un 70% del hierro presente en el cuerpo, dos tercios del hierro del cual forma parte de la hemoglobina circulante en los eritrocitos. En mioglobinas y enzimas dependientes del hierro se encuentra aproximadamente un 15% del hierro funcional (Hallberg, 1981; Andrews, 1999).

a) Hierro en los eritrocitos

Los eritrocitos, también llamados células rojas, glóbulos rojos o hematíes son las células cuantitativamente más numerosas en la sangre. En ellos, el hierro se encuentra formando parte de la hemoglobina (Figura 2) cuya función es transportar el oxígeno hacia los distintos tejidos presentes en todo el cuerpo (Robins y Cotran, 1990). Los eritrocitos tienen en su estructura a la hemoglobina permitiendo que, gracias a la rápida capacidad de ésta para oxigenarse durante el corto tiempo en que el eritrocito transita en los pulmones, pueda llevar el oxígeno a todos los tejidos corporales donde se requiera gracias a su lenta capacidad de desoxigenación, lo que juega un importante papel en la transferencia del oxígeno de los pulmones a todos los tejidos corporales. La hemoglobina es la molécula más conocida que contiene al grupo hemo, mejor conocido como ferroprotoporfirina tipo IX, el cual consiste en una molécula de protoporfirina tipo IX con un átomo de hierro en el centro. Su peso molecular es de aproximadamente 68,000 daltones y tiene cuatro grupos hemo en su estructura, cada uno de ellos unido a una cadena polipeptídica de globina, lo que permite la rápida combinación con el oxígeno de manera reversible sin sufrir daños por oxidación (Finch y Lenfant, 1972; Andrews, 1999). El color rojo característico de la sangre se debe a la presencia del grupo hemo presente en la hemoglobina que al interaccionar con el oxígeno, toma un color rojo escarlata, que es el color de la sangre arterial y se

denomina oxihemoglobina o hemoglobina oxigenada. Al perder el oxígeno se denomina hemoglobina reducida y toma el color rojo oscuro, que es el color característico de la sangre venosa (Finch y Lenfant 1972; Robins y Cotran, 1990).

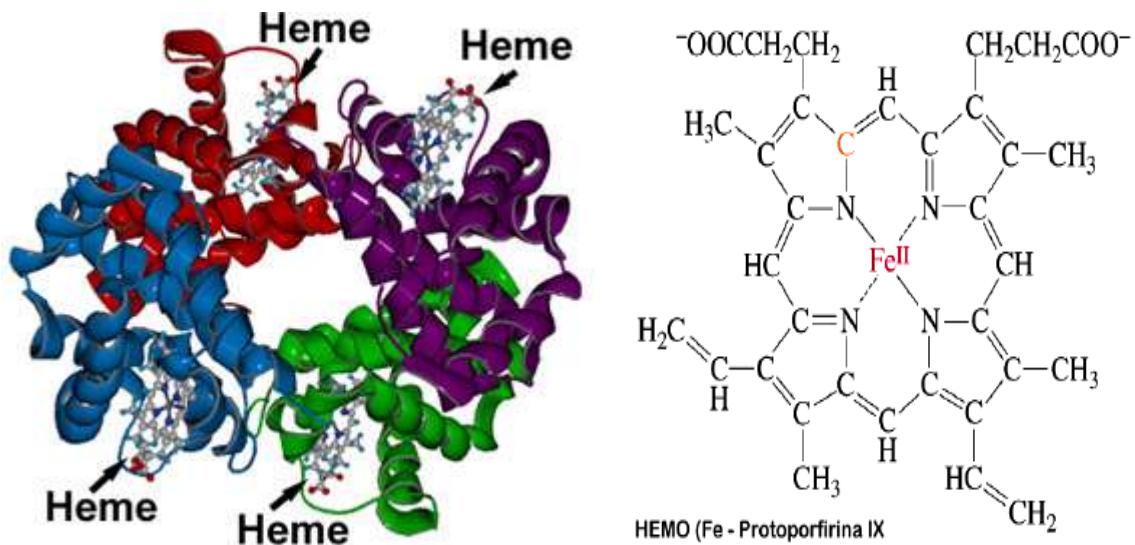


Figura 2. Estructura de la hemoglobina y el grupo hemo.

(<http://ciencia.medtropoli.net/>, <http://www.oocities.org/pelabzen/hemoglob.html>)

b) Mioglobinas

La mioglobina (Figura 3) es un pigmento proteínico parecido a la hemoglobina, que se encuentra en los músculos. Transporta el oxígeno hasta la mitocondria donde participará en la oxidación de ácidos grasos y azúcares para la obtención de ATP necesario durante los procesos de contracción muscular. Está compuesta por una cadena polipeptídica de 153 aminoácidos en donde está unida una ferroporfirina (grupo hemo) quien le da la capacidad de transportar oxígeno (Dallman, 1974; Robins y Cotran, 1990). Estas proteínas del tipo globular abundan en el tejido muscular de mamíferos buceadores aproximadamente en 5 mg/g de tejido muscular que contiene aproximadamente 300 mg de Fe, lo cual representa aproximadamente el 10% del hierro total corporal. La mioglobina del músculo esquelético decrece con las deficiencias de hierro en la infancia (Hargreaves y col., 1981; Andrews, 1999; Olsson y Norrby 2008).

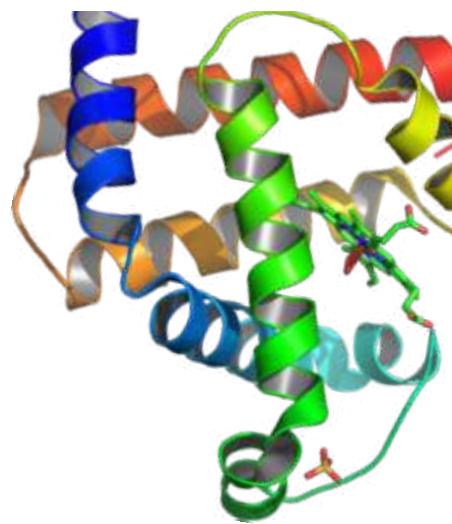


Figura 3. Estructura de la Mioglobina (<http://www.enotes.com/topic/Myoglobin>)

c) *Enzimas dependientes del hierro*

Las enzimas dependientes del hierro son de importancia para la oxidación celular, actúan a nivel mitocondrial y entre ellas se encuentran los citocromos, oxidasa del citocromo, catalasas y peroxidasa. Los citocromos desempeñan un papel fundamental en la respiración y el transporte de energía química en los seres vivos. Son metaloporfirinas del tipo hemo, es decir tienen un grupo prostético formado por un átomo de hierro en un estado de oxidación que varía entre Fe II y Fe III permitiendo de esta manera el transporte de electrones a nivel mitocondrial y un anillo de porfirina. Los citocromos están integrados en las membranas internas de las mitocondrias y los cloroplastos. Durante la respiración y la fotosíntesis, las moléculas de hierro liberan y aceptan alternativamente electrones que pasan a otro citocromo en una cadena de reacciones químicas llamada transferencia de electrones que funciona con liberación de energía en forma de ATP. Los citocromos a, b y c son esenciales en la producción de energía celular por la ruta metabólica de la fosforilación oxidativa, son transportadores de electrones en la transformación del adenosín difosfato (ADP) a adenosin trifosfato (ATP), el principal compuesto almacenador de energía (Dallman, 1974; Voet y Voet, 2006; Halliwell y Gutteridge, 1990).

Los animales con fuertes deficiencias de hierro presentan disminución en los niveles de los citocromos b y c, consiguiendo limitados rangos de oxidación por la cadena transportadora de electrones. El citocromo c es el mejor caracterizado de estas proteínas, al igual que las mioglobinas están formadas por una cadena polipeptídica y un grupo hemo con un átomo de hierro, su concentración es de 5 a 100 mg/g de tejido y su concentración es alta en músculos con altos requerimientos de energía como el músculo cardiaco. Otra función de los citocromos es la de destruir compuestos endógenos, químicos y toxinas provenientes de fuentes externas por degradación oxidativa como el citocromo P450 presente en las membranas microsómicas de las células hepáticas y mucosa intestinal (Dallman, 1974).

Las oxidases del citocromo son enzimas que catalizan reacciones de óxido reducción empleando oxígeno molecular como receptor de electrones. En estas reacciones, el oxígeno se reduce a agua o a peróxido de hidrógeno. La oxidasa del citocromo permite usar al oxígeno para la generación de energía y es el receptor final en la cadena transportadora de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Las catalasas son homotetrámeros ubicados en los peroxisomas y son metaloproteínas del tipo hem cuyo cofactor es un átomo de hierro que es el aceptor o donador de electrones para la reducción del peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua. El peróxido de hidrógeno es el residuo del metabolismo celular de muchos seres vivos y su función principalmente es protectora contra algunos agentes patógenos, particularmente anaerobios pero, dada su toxicidad, debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos. Estudios en ratas y humanos han mostrado un gran aumento en la peroxidación de lípidos en eritrocitos cuando los estados de deficiencia de hierro se incrementan (Yip y col., 1982; Halliwell y Gutteridge, 1990).

Las peroxidases son enzimas oxidoreductasas del tipo hem muy extendidas en la naturaleza cuya función es catalizar reacciones bisustrato usando al peróxido de

hidrógeno como agente oxidante, protegiendo a su vez al organismo de su acumulación ya que esta molécula es altamente reactiva, especialmente en su forma iónica (H_2O_2^-) y puede alterar peligrosamente la actividad biológica de muchas moléculas (Halliwell y Gutteridge, 1990).

La lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) es una enzima que protege la peroxidación de lípidos y también se ve disminuida en los estados de deficiencia de hierro en ratas (Jain y col., 1982).

Todas las oxidasa son hemoproteínas con excepción de la glutatión peroxidasa que es una selenoproteína. Algunas otras enzimas dependientes de hierro son la aconitasa una enzima del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y enzima limitante en la gluconeogénesis y también la ribonucleótido reductasa, una enzima requerida para la síntesis de DNA por lo que las deficiencias de hierro también merman esta capacidad celular (Voet y Voet, 2006).

Existen algunas enzimas que contienen hierro no hem, como el complejo hierro-sulfuro de la nicotinamín adenin dinucleotido reducida (NADH) deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, también involucradas en la obtención de energía metabólica. Estas enzimas son requeridas para la primera reacción en la cadena transportadora de electrones y cuentan con más hierro que el presente en los citocromos. También se ha observado una fuerte disminución de estas enzimas en los estados de deficiencia de hierro (Dallman, 1986).

2.3.2 Hierro de depósito

El hierro de depósito constituye aproximadamente el 30% del hierro presente en el cuerpo (1 g aproximadamente) y existen dos formas principales: la hemosiderina y la ferritina (Halliday y col., 1994). Otra forma de depósito se da en células que contienen una reserva citosólica transitoria de Fe con potencial redox activo, quelando intracelularmente a moléculas de bajo peso molecular como citrato, varios péptidos, ATP, AMP o pirofosfato y se puede comprobar su presencia con el uso de sensores fluorescentes tales como calceína, Phen Green SK (Emerit y

col., 2001; Petrat y col., 2002; Breuer y col., 2008) y otros sensores fluorescentes específicos para mitocondria sugieren la existencia de quelatos de Fe en este organelo (Rauen y col., 2007). El Phen Green SK es un método de microscopia de fluorescencia que utiliza una microplaca con indicadores individuales para la presencia de iones de mercurio, cobre, plomo, hierro, zinc, níquel y cadmio, el indicador es el acetato verde fluorescente y tiene la capacidad de penetrar al interior de las células y colorear las zonas intracelulares donde tengamos depósitos de estos metales de acuerdo a la coloración (Manual para Phen Green™ SK, Diacetate, Life Technologies Corporation, 2012). Es importante la existencia de los depósitos de Fe en forma de ferritina, hemosiderina o quelatos ya que estos ayudan a evitar el daño causado por el Fe libre en la célula a nivel citosólico en cultivos de células (Epsztejn y col., 1999) y en animales (Kaur y col., 2003)

a) *Hemosiderina*

La hemosiderina es una forma de depósito intracelular de Fe consistente de productos de degradación de la ferritina y reservas internas de óxidos de Fe (Zhang y col., 2010). Es un pigmento de color amarillo-dorado o pardo de aspecto cristalino o granuloso, derivado de la hemoglobina cuando hay más hierro del necesario en el cuerpo. Se forma cuando hay exceso de hierro por agregados micelares de ferritina al descomponerse en globina y el grupo hemo y, posteriormente, en biliverdina y hemosiderina, respectivamente. Normalmente existen depósitos de hemosiderina en las células fagocíticas del bazo, hígado, medula ósea y ganglios linfáticos en pequeñas cantidades, su exceso indica una patología llamada hemosiderosis. La biliverdina es un pigmento de color verde o azul asociado a la bilis, procede del catabolismo de la hemoglobina en las células del sistema retículo endotelial. Al reducirse inmediatamente da lugar a la bilirrubina, un pigmento biliar de suma importancia en el metabolismo de lípidos, la biliverdina y la bilirrubina tienen importancia en el color que toman los hematomas (Robins y Cotran, 1990, Halliday y col., 1994).

b) Ferritina

La ferritina (Figura 4) es una estructura supramolecular que ayuda al almacenamiento y consecuente destoxicificación de Fe libre intracelular. Está formada por una parte llamada apoferritina que es la fracción proteica de la ferritina, consiste de 24 subunidades polipeptídicas H (*heavy*) y L (*light*), codificadas por diferentes genes que al ensamblarse forman un conglomerado esférico similar a una frambuesa con una cavidad de aproximadamente 80 Å alrededor de una masa de fosfato férrico hidratado, que en conjunto forman a la holoferritina (Arosio y col., 2009). Existen dos formas de ferritina: isoferritina cardiaca con un peso aproximado de 21,000 Da e isoferritina hepática con un peso de 19,000 Da. La ferritina contiene aproximadamente un 25% de su peso en hierro, pero esto varía ya que puede contener hasta 4,500 átomos de Fe III en forma de oxi-hidróxido fosfato férrico en su interior. El hierro puede entrar al interior de la ferritina con la ayuda de una proteína con función de chaperona de Fe llamada PCBP1 (*poly(rC)-binding protein 1*) (Shi y col., 2008). La incorporación del Fe en el interior de la holoferritina requiere la actividad ferroxidasa de la H-ferritina, mientras que las cadenas de L-ferritina provee un centro de nucleación, los niveles de H y L-ferritina difieren considerablemente en varios tejidos (Zhang y col., 2010).

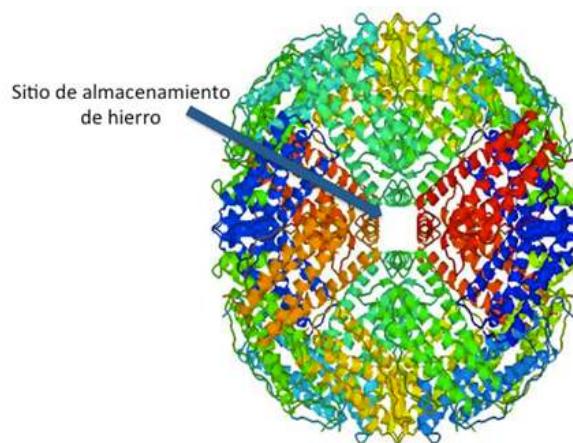


Figura 4. Estructura de la ferritina (<http://www2.potsdam.edu>)

La ferritina es la principal biomolécula almacenadora de hierro en los vertebrados, se encuentra en el hígado, en el bazo, en la medula ósea y mucosa intestinal. Su vida media es de 50 a 75 h. Su importancia radica en su capacidad para almacenar al hierro en los depósitos pues el hierro iónico no unido es tóxico. Cuando la ferritina está totalmente saturada con hierro permite su inmediata incorporación y se considera una forma soluble y móvil de almacenamiento de hierro. Su cuantificación en sangre y fluidos se utiliza para el diagnóstico de las anemias ferropénicas. Se sabe que por cada μg de ferritina plasmática por litro de sangre existen de 8 a 10 mg de depósitos de hierro (Robins y Cotran, 1990; Halliday y col., 1994; Alférez y col., 2010). Los niveles bajos de ferritina están directamente relacionados con bajas concentraciones de hierro. Cuando los niveles de ferritina se elevan indican otras patologías como hemosiderosis, intoxicación por hierro, hemocromatosis, anemias megaloblásticas y hemolíticas que implican rutas metabólicas de transporte de hierro predominantes en estados patológicos donde las altas concentraciones de ferritina indica alta concentración de Fe intracelular relacionado con daño a los tejidos (Chen y col., 2005). El hierro almacenado en ferritina es considerado altamente biodisponible y puede ser movilizado del interior de esta para fines metabólicos celulares (Zhang y col., 2010) y posiblemente siguiendo cambios estructurales dinámicos de las subunidades de ferritina (Takagi y col., 1998).

La inducción de ferroportina promueve la movilización de Fe derivado de la ferritina seguido de una mono-ubiquitinación y degradación de la apo-ferritina por el proteosoma (De Domenico y col., 2006). La ferritina puede ser degradada de dos diferentes formas, la forma lisosomal y la forma proteosomal las cuales requieren primero la disminución de sus reservas de hierro (De Domenico, 2009). Se ha descubierto que la ablación del gen que codifica para la H-ferritina lleva a letalidad temprana en el embrión (Ferreira y col., 2000) o la ruptura condicional de este gen puede ocasionar daño hepático a causa de estrés oxidativo (Darshan y col., 2009). Se ha descubierto que la ruptura intestinal de la H-ferritina tiene efectos que causan deficiencia en la absorción de hierro de la dieta (Vanoaica y col., 2010), por otro lado la mutación en el gen que codifica para la L-ferritina se

asocia con neuroferritinopatía, un raro desorden hereditario por parte del parente con una transmisión dominante autosómica caracterizada por la acumulación de Fe en forma activa en el cerebro (Levi y col., 2005).

c) Transferrina

La transferrina (Figura 5) es una betaglobulina de forma helicoidal, su peso molecular oscila entre los 70,000 y los 90,000 Da. Es una glicoproteína formada por una cadena simple de polipéptidos que tiene dos sitios activos de unión por el hierro. Transporta al hierro proveniente de la hemoglobina y del intestino delgado a los tejidos que requieren hierro por medio de unos receptores específicos de la membrana celular, que unen al complejo transferrina-hierro con la superficie celular y transportan al hierro al interior de la célula cuando éste es liberado (Huebers y Finch, 1987; Alférez y col., 2010). Dentro de la transferrina se mantiene el hierro en forma química inerte, es decir en forma Fe III y representa a menos del 0.1% del hierro corporal (aproximadamente 3 mg) y forma parte del pool de transporte altamente dinámico entre la membrana intestinal o las células retículo endoteliales a tejidos con alta demanda de hierro como la médula ósea donde los eritrocitos son producidos y se mantiene la eritropoyesis (Donovan y col., 2005).

El hierro que la transferrina provee a estos tejidos se relaciona con la saturación de la ferritina, a poca saturación la cantidad de hierro suministrado es menor, a mayor saturación de ferritina el hierro suministrado por la transferrina es mayor. La cantidad de los receptores de transferrina en la superficie membranal parece estar relacionada con las demandas de hierro del tejido en cuestión, así las membranas de las células de tejidos que tienen altas demandas de hierro como los de la medula ósea, la placenta y el hígado tienen gran cantidad de receptores de transferrina (Huebers y Finch, 1987; Alférez y col., 2010). El hierro presente en el pool de transferrina es restablecido mayoritariamente de hierro reciclado de las células rojas senescentes y en menor grado del hierro absorbido en la dieta, las células rojas senescentes son tomadas por macrófagos reticuloendoteliales que metabolizan la hemoglobina y el grupo hemo y libera Fe II de su membrana

plasmática al torrente sanguíneo con ayuda de la ferroportina, sufriendo después un proceso de oxidación a Fe III con ayuda de la ceruloplasmina y cargado posteriormente de esta forma en la transferrina (Donovan y col., 2005).

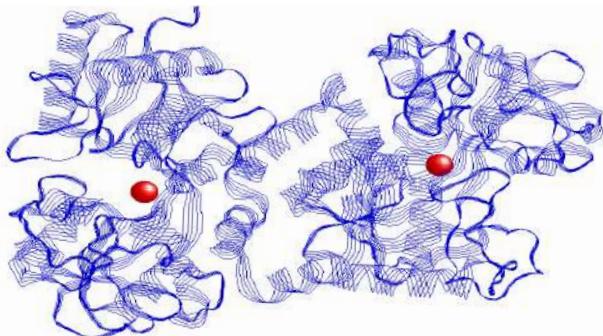


Figura 5. Estructura de la transferrina (<http://pubpages.unh.edu/~ndc/>)

Los genes reguladores de la transferrina y receptores de la transferrina se encuentran en el gen 3 y los receptores son altamente regulados de acuerdo a la cantidad de hierro presente en el hierro funcional y de reserva (Casey y col., 1988). Cuando las células se encuentran en un ambiente rico en hierro el número de receptores disminuye, cuando se encuentran en un estado deficiente de hierro los receptores aumentan. Debido a que la cantidad de receptores de transferrina en plasma son proporcionales a los presentes en las superficies celulares, la cantidad de receptores de transferrina en plasma es un buen indicador bioquímico de los estados de deficiencias de hierro (Skikne y col., 1994).

Existen tres depósitos de hierro plasmático, uno de ellos formado por la transferrina diférrica que suele ser mucho más efectiva para donar el hierro a los tejidos que la otra forma conocida como la trasferrina monoférrica. La tercera forma de almacenamiento es la apotransferrina o también llamada transferrina apoférrica que es una molécula de transferrina sin hierro. La función de la transferrina es la de fijar el hierro en forma férrica y unir a otros metales y transportarlo por el torrente sanguíneo. La transferrina se sintetiza en el retículo endotelial en hígado principalmente, su vida media es de 8 a 10 días y se

encuentra en plasma saturada con hierro en una tercera parte generalmente (Robins y Cotran, 1990). El paso del complejo transferrina-hierro a las células ocurre en cuatro etapas (Huebers y Finch, 1987):

- Adsorción: unión del complejo transferrina-hierro a sus receptores celulares de superficie, principalmente el receptor de transferrina 1 (TfR1) (Ponka y col., 1998).
- Fijación: paso en el cual el complejo penetra al interior por el mecanismo de endocitosis a través de depresiones revestidas de clatrina, que es una proteína que recubre las vesículas durante el proceso de transporte entre membranas (Ponka y col., 1998).
- Una bomba de protones promueve la acidificación del endosoma a un pH de 5.5 activando la liberación de Fe III de la transferrina que aún sigue unida a TfR1 y finalmente la ferrirreductasa reduce el Fe III a Fe II (Ohgami y col., 2005) el cual es transportado por la membrana endosomal por el transportador de metales divalentes 1 (DMT1, por sus siglas en inglés) al citosol o posiblemente a la mitocondria en las células eritroides (Richardson y col., 2010).
- Despues de la liberación del hierro al interior de la célula la afinidad de la transferrina por TfR1 se disocia por ataque al sitio de fijación aniónica y la apotransferrina se libera al plasma para seguir capturando Fe III (Levy y col., 1999). De esta manera queda libre el hierro intracelular el cual luego se dirige a las mitocondrias, posiblemente ayudado por intermediarios intracelulares y allí es utilizado en la síntesis de la hemoglobina (Ponka y col., 1998).

2.4 Anemia por deficiencia de hierro

La palabra anemia viene del griego *an*, no y *haima*, sangre (“no sangre) siendo por tanto un estado cuantitativo o cualitativo de “deficiencia sanguínea”, es decir puede haber una disminución de la cantidad de hemoglobina (Mataix Verdú, 2009). El cuerpo necesita hierro para producir hemoglobina. Si no hay suficiente

hierro disponible, la producción de hemoglobina es limitada lo cual afecta la producción de las células rojas de la sangre. Una disminución en la cantidad normal de hemoglobina y células rojas en el torrente sanguíneo se conoce como anemia. Debido que a las células rojas de la sangre son necesarias para llevar oxígeno a través del cuerpo, la anemia hace que las células y los tejidos reciban menos oxígeno, afectando así su funcionamiento (Robins y Cotran, 1990; Roach y Benyon, 2004; Harrison, 2008).

La anemia no es una enfermedad sino un signo o síntoma y antes de tratar el síntoma, debe identificarse la causa e intervenirla. Frente a un paciente con anemia, el médico debe tener como principal objetivo establecer el diagnóstico, incluido el tipo de anemia y su causa con el menor número posible de estudios de laboratorio, en el tiempo más corto, con la menor molestia para el paciente, idealmente ambulatorio y al menor costo posible (Campuzano-Maya, 1996). Su definición tiene dos enfoques, el clínico que la define como una oxigenación insuficiente de los órganos y tejidos y el enfoque del laboratorio clínico que la define como una masa insuficiente de eritrocitos o de hemoglobina que afectan el transporte adecuado del oxígeno a los órganos y tejidos (Campuzano-Maya, 2007).

De forma general, se dice que una persona tiene anemia cuando un hombre adulto posee cifras menores de 13 g/dL de hemoglobina; si es mujer menos de 12 g/dL y valores inferiores a 11 g/dL en niños y mujeres gestantes (http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin_es.pdf). Estos parámetros no son exactos para distinguir adecuadamente entre personas parcialmente anémicas y no anémicas ya que estas cifras límites están basadas en parámetros de normalidad estadística y no siempre concuerdan con la realidad. Para ser más precisos en cada caso, la OMS estableció como anemia a la pérdida de 2 g/dL de hemoglobina de los valores habituales que un individuo tenga (WHO, 2001; Miwa y col., 2010).

La anemia es un problema mundial de salud pública que afecta principalmente a niños y a mujeres en edad fértil. En la mayoría de los casos, la anemia es causada por deficiencia de hierro, aunque una proporción menor se produce por deficiencias de otros micronutrientos como cobre y vitaminas como el folato, las vitaminas C, E, A, tiamina y B12 (Iyengar y Nair, 2000). La anemia en niños menores de cinco años es particularmente importante por el impacto negativo que tiene sobre su desarrollo mental y su futuro desempeño social en etapas posteriores. Los niños que padecen anemia durante los primeros dos años de vida tienen un desarrollo cognitivo más lento, menor desarrollo psicomotor y, cuando ocurre en la edad adulta, menor capacidad de trabajo (Sayed y col., 1999).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la anemia, tiene una prevalencia global de 30%, es la manifestación clínica más frecuente en la especie humana. Los grupos más afectados son los jóvenes y las mujeres embarazadas con una prevalencia de 43% y 51% respectivamente, seguidos por los niños en edad escolar con 37%, las mujeres, incluyendo las embarazadas, con 35% y los hombres adultos con 18% y para agravar el problema; la prevalencia de la anemia en los países en vía de desarrollo es de 36%, en los países desarrollados es tan sólo el 8% (DeMayer y Adiels-Tegman, 1985; Campuzano-Maya 2010).

Aunque por mucho tiempo la deficiencia de hierro ha sido considerada como la mayor causa de anemia en la niñez, se ha vuelto menos común en México en los últimos 30 años debido, principalmente, a la existencia de fórmulas y cereales para bebés e infantes enriquecidos con hierro, la presencia de los alimentos fortificados con hierro y los programas nacionales de nutrición buscan disminuir la incidencia de anemia por deficiencia de hierro (ENSANUT, 2006). Las causas de las deficiencias de hierro y la anemia son multifactoriales y pueden ser a causa de un bajo consumo de hierro, factores genéticos y fisiológicos. Otras anemias se deben al bajo consumo de folato y/o cianocobalamina (B12) (Iyengar y Nair, 2000) y en algunos otros casos debido a enfermedades que involucran pérdidas de sangre junto con infecciones parasitarias como la filariasis y la diarrea crónica (Commission on the Nutrition Challenges of the 21st Century Ending, 2000).

La anemia por deficiencia de hierro no se desarrolla inmediatamente. La persona va progresando por varias etapas de deficiencia, comenzando con una reducción de hierro en el cuerpo, aunque la cantidad de hierro en las células rojas de la sangre se mantiene igual. Si la reducción de hierro no se corrige, la próxima etapa es la reducción en el tamaño y número de células rojas, lo cual eventualmente se convierte en anemia por deficiencia de hierro (Robins y Cotran, 1990).

2.4.1 Prevalencia de anemia en México

En nuestro país, la prevalencia de anemia es elevada. Los puntos de corte para determinar si un mexicano es anémico están los dados por la Organización Mundial de la Salud de acuerdo a edad y el género (Cuadro 1). Los resultados obtenidos para niños mexicanos con anemia se muestran en la Figura 6, en donde se observa que el hecho de pertenecer a una etapa de crecimiento puede predisponer a anemia. En el 2006 la prevalencia de anemia fue menor a la reportada en 1999 para la población de 12 a 35 años, lo que indica que las estrategias seguidas por el gobierno federal en la prevención de la anemia han dado resultados (ENSANUT, 2006).

Cuadro 1. Puntos de corte para diagnosticar anemia

Grupo de población	Grupo de edad	Punto de corte para diagnóstico de anemia (g/L)
Preescolares (ambos sexos)	6 a 11 meses	<95.0
	12 a 59 meses	<110.0
Escolares (ambos sexos)	5 años	<110.0
	6 a 11 años	<120.0
Mujeres en edad reproductiva (no embarazadas)	12 a 49 años	<120.0
Mujeres en edad reproductiva (embarazadas)	12 a 49 años	<110.0
Hombres	12 a 14 años	<120.0
	15 o más	<130.0
Mujeres adultas	50 años o más	<120.0

ENSANUT, 2006

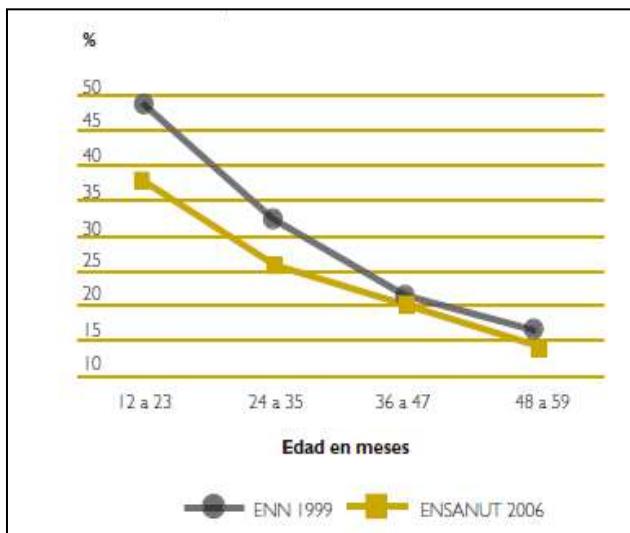


Figura 6. Prevalencia nacional de anemia en niños mexicanos preescolares

En la Figura 7 se observan los resultados sobre la prevalencia de anemia en adolescentes mexicanos. Se puede observar que a edades de 12 y 13 años la prevalencia de anemia en adolescentes hombres mexicanos fue más alta que en adolescentes mujeres. Mientras que la prevalencia en adolescentes mujeres de 14 a 18 años fue mayor que en adolescentes hombres. Esto quizás por la fuerte influencia sobre estereotipos a seguir lo que ha provocado un mayor índice de trastornos alimentarios y mala alimentación (ENSANUT, 2006).

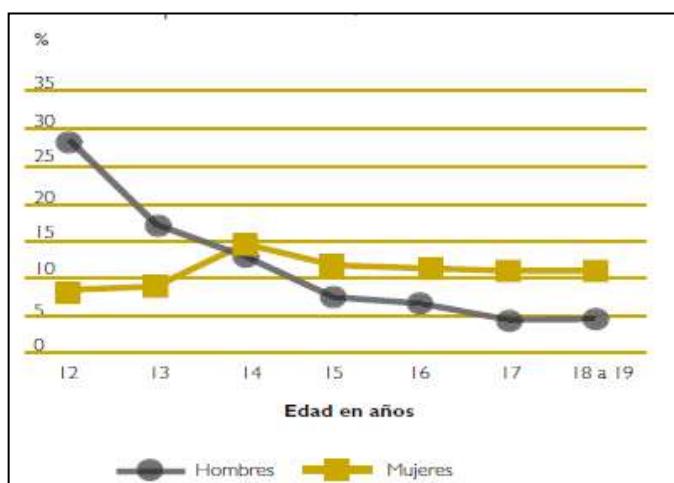


Figura 7. Prevalencia nacional de anemia en adolescentes mexicanos.

La Figura 8 muestra la prevalencia de anemia en mujeres mexicanas, un grupo de gran riesgo debido a la menstruación, embarazos y partos. La comparación entre 1999 y 2006 muestra también una disminución en la prevalencia de anemia en dicha población, probablemente también por el esfuerzo de los programas de apoyo a mujeres embarazadas como es el monitoreo del embarazo, el cuidado de la nutrición y el apoyo a las madres solteras. La Figura 9 muestra la prevalencia de mexicanos y mexicanas de 20 a 49 años que presentan anemia. Se observa que, al incrementarse la edad, la prevalencia aumenta debido quizá a la presencia de enfermedades crónico-degenerativas, mala alimentación e inseguridad alimentaria. La prevalencia de anemia en mujeres fue casi un 400% superior a la de hombres (ENSANUT, 2006).

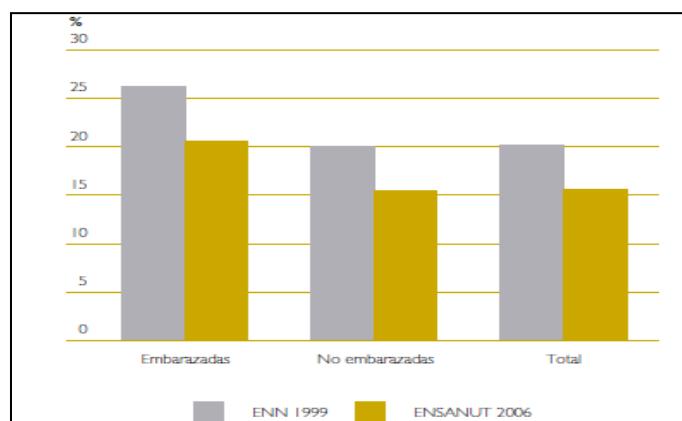


Figura 8. Prevalencia nacional de anemia en mujeres mexicanas

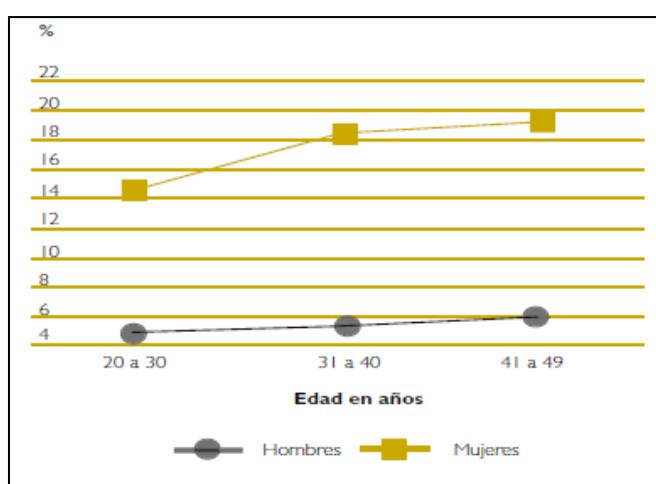


Figura 9. Prevalencia nacional de anemia en hombres y mujeres de edad adulta

2.4.2 Problemas metabólicos asociados a los excesos de hierro

Al estudiar las deficiencias de hierro se puede encontrar su contraparte, los problemas metabólicos asociados a una sobrecarga de hierro, los cuales están asociados generalmente a una gran gama de trastornos metabólicos. La ingesta excesiva de hierro en forma de suplemento puede favorecer excesos de hierro en el organismo, pero muy rara vez los excesos de hierro vienen por una sobrecarga en los alimentos (Powell y col., 1994). Existen dos causas principales de las enfermedades causadas por los excesos de hierro en el organismo: la causa primaria que se da por genética y se observa una absorción muy elevada de hierro en las células del intestino produciendo una recarga en el hierro corporal que se refleja por incrementos en los niveles y la saturación de la ferritina. Lo anterior produce acumulación de hierro en los tejidos corporales, lo que se conoce como hemocromatosis, una enfermedad donde de 4/1000 habitantes europeos tienen defectos genéticos que los hacen portadores. Esto también puede causar otras enfermedades debido a que los problemas se detectan cuando la carga corporal de hierro total es de 20-40 g, hasta 10 veces más de lo normal (Edwards y col., 1988; Pippard, 1994).

Las sobrecargas de hierro causadas por ingestas excesivas de hierro son menos comunes pero no dejan de ser peligrosas, principalmente cuando hay gran consumo de hierro para tratar anemias muy fuertes o en casos como en la tribu Bantú del sureste de África, donde sus integrantes consumen grandes cantidades de cerveza de maíz, la cual es rica en hierro conteniendo de 40 a 80 g por litro y su acidez incrementa la biodisponibilidad del hierro (Bothwell y col., 1964). Las transfusiones sanguíneas muy continuas pueden causar sobrecargas de hierro ya que una unidad de sangre puede contener de 200 a 250 mg de hierro por hemoglobina, lo equivalente al hierro ingerido en 150 a 200 días (Bottomley, 1982).

Su sobrecarga no sería tan mala de no ser por el potencial que tiene el hierro de pasar de estado ferroso a férrico y viceversa. Cuando la catálisis en las reacciones

redox no están bien moduladas por antioxidantes o proteínas fijadoras de hierro pueden dañar las estructuras celulares, llevando a apoptosis temprana y causando daños a nivel órganos y tejidos (Yip, 1995). Se puede presentar envenenamiento o toxicidad aguda cuando se ingieren dosis muy grandes de hierro por auto suplementación principalmente en niños que accidentalmente ingieren tabletas por descuido de los padres, aunque su dosis letal es muy grande en comparación con la dosis de ingesta diaria recomendada (de 200-250 mg/kg vs 2-5 mg/kg/día, respectivamente). Los daños más comunes en situaciones de envenenamiento son necrosis hemorrágica del tracto gastrointestinal, náuseas, vómito, diarrea sanguinolenta, afecciones locales por la interacción del hierro con el ácido clorhídrico del estómago. También se da acidosis metabólica por acumulación de ácido láctico y cítrico por el daño mitocondrial inducido por hierro (Banner y Tong, 1986). Finalmente, también puede causar anemia hemolítica principalmente en niños con niveles bajos de vitamina E, lo que lleva a que las células se queden desprotegidas frente al efecto oxidativo del hierro sobre ellas causando hemólisis de eritrocitos, este daño se puede revertir con la suministración de vitaminas antioxidantes (Melhorn y Gross, 1979).

El estrés oxidativo es caracterizado por un incremento en las concentraciones de productos derivados del oxígeno que provocan daños críticos y algunas veces irreversibles en las células, la reducción de oxígeno lleva a la síntesis de compuestos intermediarios altamente reactivos como el anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y derivados peroxidativos de ácidos grasos polinsaturados (AGPI) tales como dienos conjugados, hidroxiperóxidos de lípidos y malonildialdehido (MDA) (Caimi y col., 2003). La oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la circulación ha sido vinculada con el inicio y patogénesis de aterosclerosis y últimamente a la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Nuttall y col., 1999). En estados saludables, el hierro libre nunca se encuentra en cantidades apreciables en la célula o torrente sanguíneo, normalmente se encuentra asociado a proteínas almacenadoras o transportadoras o quelado a moléculas de bajo peso molecular como el citrato (Emerit y col., 2001).

A valores normales de pH, la transferrina no libera su hierro, pero a valores bajos de pH como es el caso de la pared arterial puede liberarse el hierro de la transferrina e inducir oxidación de la lipoproteína de baja densidad (Krajcovicová-Kudlackova y col., 2004). Los radicales libres generados por la transición del Fe tienen un alto potencial de causar daño en células y tejidos los cuales son protegidos por una variedad de sistemas antioxidantes. Bajo condiciones patológicas el hierro, aún en pequeñas cantidades, genera radicales libres por medio de la reacción de Fenton y de Haber-Weiss (Koppenol, 1993; Haidari y col., 2001). Principalmente, el radical hidroxilo generado por la transición del metal catalizado por la reacción Haber-Weiss (Durackova y col., 1993; De Valk y Marx, 1999) resulta en peroxidación de organelos membranosos. Lo anterior produce estrés oxidativo que, en sujetos saludables, puede ser despreciable pero en sujetos sensibles puede desencadenar daño en órganos (Hayashi y Yano, 2002).

Lo anterior se debe a que el radical hidroxilo es capaz de unirse al átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado iniciando así la peroxidación lipídica (Emerit y col., 2001) la cual es normalmente limitada por una variedad de mecanismos antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y algunas vitaminas tales como el α -tocoferol, ácido ascórbico y retinol (Sozmen y col., 1999). Una vez acumulados los hidroxiperóxidos lipídicos, el Fe libre podrá iniciar directamente la peroxidación de lípidos adicionales. Lo anterior tiene como resultado la destrucción de la estructura membranal de las células y organelos y por ende de su función. Esta situación explica el riesgo del Fe libre, Fe lábil o Fe quelable en la vida, produciendo estrés oxidativo relacionado con muchas patologías como arterioesclerosis, diabetes y envejecimiento (Emerit y col., 2001), altera el perfil de lipoproteína plasmática especialmente la LDL, también los parámetros de coagulación produciendo un mayor riesgo a embolias, altera el endotelio disminuyendo la síntesis de prostaciclinas y aumentando la producción e tromboxanos (Caimi y col., 2003) y está involucrado con la aterosclerosis (Antoniades y col., 2003).

2.4.3 Ingesta diaria recomendada de hierro

El Cuadro 2 muestra la ingesta diaria recomendada (IDR) en el consumo de hierro para la población mundial tomando en cuenta sexo, edad y peso adecuado para la edad. Valores de ingesta por debajo de los mencionados pudieran ocasionar anemia dependiendo si la deficiencia es aguda o crónica ya que la anemia aparece solamente bajo ingestas deficientes de hierro crónicas (WHO, 2001).

Cuadro 2. Ingesta diaria recomendada de hierro.

Ingesta Diaria recomendada de Hierro		
Sexo/Edad	Peso (Kg)	Hierro (mg)
Ambos sexos		
0-6 meses	6.0	0
6-11 meses	8.9	9
1-3 años	12.1	6
4-6 años	18.2	6
7-9 años	25.2	9
Niñas		
10-18 años	46.7	14-32
Niños		
10-18 años	49.7	17
Mujeres		
19-65 años	55.0	29
Embarazadas	-	Alto (30)
Lactantes	-	15
65 años o mas	-	11
Hombres		
19-65 años	65	14
65 años o mas	-	14

-No reportado (WHO, 2001)

2.5 Contenido de hierro en algunos alimentos

El hierro está presente en los alimentos de origen animal y vegetal. El Cuadro 3 muestra el contenido de hierro en algunos de los productos de la canasta básica mexicana. Los valores reportados corresponden a la cantidad total de hierro presente en los alimentos sin diferenciar hierro hemo y no hemo. La cantidad total no corresponde a la cantidad absorbida ya que el contenido de hierro no representa los valores biodisponibles de hierro, la cual representa un valor muy pequeño en comparación con el valor reportado (Mataix Verdú, 2009).

Cuadro 3. Contenido de hierro en alimentos presentes en la dieta mexicana

Alimento	Cantidad	Hierro (mg)
Semilla de soya cocinada	1 taza	8.8
Lentejas cocidas	1 taza	6.2
Alubias cocidas	1 taza	5.2
Garbanzos Cocidos	1 taza	4.7
Frijol pinto cocido	1 taza	4.5
Habas cocidas	1 taza	4.2
Acelgas cocinadas	1 taza	4.0
Frijol negro cocinado	1 taza	3.6
Espinacas cocinadas	1 taza	2.9
Acelga cocinada	1 taza	2.7
Papa	1 pieza grande	1.4
Almendras	¼ de taza	1.3
Carne de cerdo	100 g	1.5
Jamón	100 g	1.8
Salchicha	100 g	2.2
Huevo de Gallina	100 g	2.2
Carne de res	100 g	2.0
Sesos	100 g	2.8
Sardina	100 g	3.2
Charales	100 g	5.8
Tortilla	100 g	1.2
Pan de caja enriquecido	100 g	4.2
Sopa de pasta enriquecida	100 g	7.2
Carne de pollo	100 g	1.8
Arroz	100 g	0.68
Avena	100 g	0.68
Plátano	100 g	0.37
Hígado de pollo	100 g	9.2
Hígado de res	100 g	11
Leche descremada	100 g	0.7

(Silva-Trejos, 2009)

2.6 El frijol como alimento

El frijol es uno de los alimentos de la canasta básica mexicana. El grano de frijol tiene de 16 a 33% de proteína dependiendo la variedad (Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993) y un nivel energético de 52.4% de carbohidratos (Bressani y Blanco, 1991). La testa de frijol tiene diversos componentes, incluyendo la fibra y varios compuestos fenólicos (Bolívar y Luis, 2010). Es un alimento de primera necesidad en México con propiedades nutricias excelentes lo que ha llevado a que sea investigado muy extensamente. Se ha encontrado que en el frijol así como en la mayoría de los alimentos de origen vegetal se encuentran presentes sustancias que afectan en cierta medida la calidad nutricia del frijol como por ejemplo en los carbohidratos totales se encuentran oligosacáridos como la rafinosa (trisacárido), la estaquiosa (tetrasacárido) y la verbascosa (pentasacárido) que son los principales causantes de la formación de flatos a nivel intestinal (Whistler y Daniel, 1985).

La fibra contribuye a reducir la concentración del colesterol en la sangre y facilita el tránsito de los alimentos en el intestino (Bourdon y col., 2001) mientras que a muchos compuestos fenólicos se les atribuye propiedades antioxidantes (Beninger y Hosfield, 2003) que son capaces de reducir el riesgo de cáncer, enfermedades del corazón, diabetes, otras enfermedades crónicas degenerativas (Maritim y col., 2003; Jin y col., 2008) y presentan actividad antibacteriana, antiviral y antiinflamatoria (Randhir y Shetty, 2007). La capacidad antioxidante ayuda a reducir la actividad de los radicales libres, los cuales pueden regular los niveles de mRNA de la tirosinasa e incrementar la producción de melanina lo cual está directamente relacionado con serios problemas en la piel humana (Jiménez-Cervantes y col., 2001), la inhibición de la tirosinasa ha sido empleada para tratar algunos problemas de hiperpigmentación de la piel (Shiino y col., 2001; Huang y col., 2007).

Por sus propiedades, el frijol es considerado como un alimento funcional (Yao y col., 2008; Fang y col., 2010) ya que contiene proteínas de interés metabólico (Li y col., 2006) y saponinas (Gao y Chen, 2006). Su consumo actúa como una llave

enzimática para la digestión de los carbohidratos ya que bloquea la actividad de la α -glicosidasa una proteína que se localiza en el epitelio del intestino delgado y que es la responsable de la absorción intestinal de los carbohidratos, al reducir su actividad se reducen los niveles de glucosa postprandial en la sangre, algo muy importante en los diabéticos (Lebovitz, 1998). De esta forma se reduce la formación de los productos de glicosilación avanzada (AGEs) (Puls y col., 1977), fuertemente relacionados con procesos patogénicos en las complicaciones por diabetes como la neuropatía, la nefropatía, retinopatía, aterosclerosis y cataratas (Peng y col., 2008).

El frijol tiene otras sustancias químicas que impiden una óptima absorción de hierro en el organismo (Cuadro 4) como son los fitatos, taninos, lectinas e inhibidores de tripsina que reducen el valor nutricio de la semilla. Iniestra González y col., (2005) analizaron 16 especies diferentes de frijol *Phaseolus vulgaris* y encontraron que en promedio la concentración de oligosacáridos fluctuó entre un 3.83 y 5.60% en el cotiledón, los fitatos entre 0.10 y 0.22%. Las unidades de tripsina inhibida (UTI) por el extracto de harina del cotiledón oscilaron entre 4.78 y 12.22 UTI/mg y el contenido de taninos representado como equivalente de catequina fue el que más variación presentó en las distintas especies oscilando entre los 3.5 a los 115.6 mg/g.

2.7 Contenido de hierro en el frijol

Ayala-Vela y colaboradores (2008) determinaron el contenido de hierro en tallos, vainas, hojas y semillas de cuatro variedades de frijol Azufrado Higuera, Flor de Junio Marcela, Pinto Villa y Negro Jamapa. Se observó que el contenido de hierro en tallo y vainas de frijol respecto a la semilla no presentó diferencias muy importantes pero el contenido de hierro en las hojas de la planta de frijol fue de nueve a doce veces superior (Cuadro 5). Al comparar el contenido de hierro en diferentes estadios de crecimiento de la planta de frijol se observó que la mayor cantidad se observa a partir de la etapa 2 que es cuando la vaina empieza a crecer, estos valores se reportaron como promedio de las cuatro variedades (Cuadro 6).

Cuadro 4. Contenido de factores antinutricios en el grano de frijol *Phaseolus vulgaris*

Variedad De frijol	Peso (g)	Testa (%)	Oligosacáridos (mg g ⁻¹)	Ácido fítico (mg g ⁻¹)	Inhibidores de tripsina (UTI mg ⁻¹)	Taninos (mg g ⁻¹)
N. Durango	36.3 [±] 3.38 abcd	10.2 [±] 0.9 bc	52.3 [±] 0.66 efgh	1.84 [±] 0.06 efghi	9.94 [±] 1.48 abdefg	47.01 [±] 11.52 a
N. Sahuatoba	23.6 [±] 2.72 bcde	11.8 [±] 1.35 c	51.9 [±] 0.52 efgh	1.87 [±] 0.02 fghi	11.27 [±] 0.57 abefg	72.6 [±] 2.30 ab
N. Altiplano	25.8 [±] 3.68 bcde	11.9 [±] 1.69 c	56.0 [±] 0.87 ghij	1.39 [±] 0.07 efghi	9.73 [±] 0.06 abdefg	65.3 [±] 1.52 b
P. Mestizo	40.5 [±] 4.49 abc	9.2 [±] 1.02 b	47.0 [±] 0.76 cd	1.18 [±] 0.12 bc	5.15 [±] 0.12 cd	112.9 [±] 1.93 f
P. Bayacora	38.4 [±] 0.75 abc	8.7 [±] 0.17 b	47.2 [±] 0.77 cd	1.75 [±] 0.00 bcd	7.7 [±] 0.13 bcdeg	85.4 [±] 2.35 de
P. Villa	34.0 [±] 1.04 bcde	9.5 [±] 0.29 b	48.3 [±] 0.61 cde	1.18 [±] 1.08 ab	9.25 [±] 0.05 abdeg	94.6 [±] 6.5 e
B. Durango	47.1 [±] 2.76 a	10.3 [±] 0.60 bc	52.3 [±] 0.77 efgh	0.98 [±] 0.13 a	9.74 [±] 0.35 abdefg	60.0 [±] 1.08 d
B. Victoria	38.2 [±] 2.17 abcd	11.7 [±] 0.66 c	54.3 [±] 0.20 efghi	1.54 [±] 0.10 a	8.82 [±] 0.80 abdeg	115.6 [±] 12.80 c
B. Madero	42.3 [±] 3.08 abc	11.6 [±] 0.84 c	51.5 [±] 0.08 efgh	1.76 [±] 0.15 a	9.24 [±] 0.36 abdefg	77.3 [±] 0.93 c
FM Bajío	27.8 [±] 0.46 bcde	10.0 [±] 0.17 bc	39.0 [±] 1.34 a	1.59 [±] 0.04 fghij	7.76 [±] 1.60 bcdeg	105.0 [±] 4.33 ij
FM M38	26.9 [±] 0.36 bcde	9.6 [±] 0.13 bc	57.6 [±] 1.13 hijk	1.06 [±] 0.02 fghi	12.22 [±] 0.02 abfg	110.0 [±] 4.03 jk
Mayacoba	35.1 [±] 4.38 abcde	9.5 [±] 1.19 bc	51.5 [±] 2.48 defgh	2.16 [±] 0.03 fghij	4.94 [±] 0.91 cd	12.7 [±] 0.72 k
Az. Regional87	32.8 [±] 1.22 bcde	8.0 [±] 0.30 ab	55.1 [±] 1.56 efghi	1.87 [±] 0.06 defgh	7.56 [±] 1.54 bcdeg	13.5 [±] 1.39 h
Az. Peruano87	37.2 [±] 3.74 abcd	8.6 [±] 0.86 b	54.3 [±] 1.38 efghi	1.83 [±] 0.09 cdefg	4.78 [±] 0.09 cd	8.7 [±] 1.84 g
Az. Namiquipa	36.5 [±] 4.37 abcd	8.2 [±] 0.98 ab	43.1 [±] 0.05 b	1.04 [±] 0.19 cdef	9.22 [±] 0.79 abdefg	5.9 [±] 2.41 i
Perry Marrow	51.2 [±] 2.09 abc	5.8 [±] 0.24 ab	48.1 [±] 0.48 cd	1.5 [±] 0.19 ij	9.54 [±] 0.91 abdef	3.5 [±] 0.00 jk

*Diferente letra en una columna indica diferencia estadística (p≤0.05)
N= Negro, P= Pinto, B= Bayo, FM= Flor de mayo,
Az= Azufrado (Iniestra-Gonzalez y col., 2005).

Cuadro 5. Contenido de hierro en diferentes partes de la planta de frijol (mg/kg de peso seco)

Variedad	Hojas	Tallos	Raíces	Vainas	Semillas
Azufrado Higuera	490 ± 31	39±5	155±18	57±7	52±3
Flor de Junio Marcela	516±31	44±5	166±18	44±4	53±3
Pinto Villa	643±31	58±5	186±19	58±4	51±3
Negro Jamapa	439±31	47±5	156±18	61±4	52±3

(Ayala-Vela y col., 2008)

Cuadro 6. Contenido de hierro en diferentes partes y estadios de crecimiento de la planta de frijol (mg/kg de peso seco)

Etapa de crecimiento	Hojas	Tallos	Raíces	Vainas	Semillas
Etapa 1	89 ± 31	44±5	124±19	68±5	NA
Etapa 2	516±31	49±5	154±18	51±4	-
Etapa 3	510±31	46±5	169±18	46±4	-
Etapa 4	573±31	49±5	216±18	NA	52±3

(Ayala-Vela y col., 2008)

Estos estudios muestran evidencia suficiente que sustenta el estudio de la biodisponibilidad de hierro en la hoja de frijol. En algunos lugares en el mundo la hoja de frijol es consumida de manera habitual en ensaladas, guisadas, como purés, sopas o usadas como condimentos como son algunas regiones de África como Tanzania y Uganda donde se le consume. Se han establecido técnicas para

cortar las hojas jóvenes a partir de la séptima semana de la siembra, sin afectar el rendimiento de la semilla. Los consumidores de estas zonas recomiendan su consumo cuando la hoja es joven pues su sabor es mejor (<http://www.nap.edu>). Existen numerosos estudios sobre la cantidad de hierro, macronutrientes y factores antinutricios presentes en la semilla de frijol sin embargo, no existen antecedentes de este estudio en las hojas de frijol.

3. JUSTIFICACIÓN

La deficiencia de hierro es un problema que afecta a la mayoría de las poblaciones, independientemente del nivel socioeconómico del país, por lo que México no está exento de esta problemática, en todos sus estratos sociales y grupos poblacionales. La semilla de frijol es rica en hierro sin embargo, estudios recientes han mostrado que la hoja de frijol contiene mayor cantidad de hierro. En África se reporta el consumo de la hoja de frijol en diversas preparaciones.

Por lo anterior, resulta importante determinar la biodisponibilidad de hierro presente en hojas de frijol de consumo mexicano y contar con evidencia que permita proponer su consumo como una alternativa de alimento rico en hierro. Con lo anterior se podría no solo fomentar el consumo de la semilla, la cual por tradición forma parte básica de la dieta mexicana, sino también la utilización de las hojas, lo cual incrementaría por un lado los beneficios económicos para los productores y por otro ayudaría a tener alternativas para la reducción de anemia en el país.

4. HIPÓTESIS

El hierro presente en la hoja de frijol es una buena alternativa dietaria que ayuda a restablecer las concentraciones de hierro en sangre de ratas Wistar.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el consumo de hoja de frijol permite la recuperación de niveles normales de biomarcadores de hierro en sangre de ratas Wistar deficientes en hierro.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar los niveles de hierro hem y hierro no hem en la hoja de frijol de la variedad Pinto Villa.
2. Realizar el análisis bromatológico de la hoja de frijol de la variedad Pinto Villa.
3. Determinar los factores antinutricios: fenoles totales, taninos condensados, fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas presentes en la hoja de frijol liofilizada.
4. Comparar los niveles de hemoglobina y ferritina en sangre en ratas deficientes en hierro suplementadas con hoja de frijol liofilizada.
5. Comparar el efecto sistémico del consumo de la hoja de frijol en sangre en ratas deficientes en hierro suplementadas con hoja de frijol liofilizada.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de la hoja de frijol.

Se utilizó hoja de frijol común de la variedad Pinto Villa (PV, Reg. Núm. FRI-052-140890) (Acosta-Gallegos y col., 1995). El frijol se cultivó en condiciones de invernadero en el INIFAP Campus Experimental Celaya, las semillas fueron germinadas en macetas con sustrato Sunshine-3® (5 semillas/ maceta) y cada maceta fue fertilizada con 00-46-00 (10 g/maceta) (Super Triple®) sin adición de hierro. Las condiciones de germinación y crecimiento fueron de 22-25°C y una intensidad de luz de 170-285 mol m²/seg. Las hojas fueron recolectadas cuando la planta estaba fisiológicamente madura (Ayala-Vela y col., 2008) en primavera del 2011. Posteriormente a su recolección las hojas fueron liofilizadas para ayudar a su manipulación, conservación y evitar la pérdida de nutrientes. La hoja liofilizada fue molida con una malla de 0.2 mm en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y finalmente fue conservada en refrigeración a -20°C hasta su utilización.

6.2 Análisis Químico Proximal

El análisis químico de la composición de la hoja de frijol, se llevó a cabo de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC International (Association of Official Agricultural Chemists International) y las Normas Oficiales Mexicanas. Se incluyeron los análisis de humedad, ceniza, fibra cruda, extracto etéreo, proteína y hierro.

6.2.1 Determinación de humedad y materia seca.

Esta determinación se realizó siguiendo el método AOAC 930.15. Después de pesar las muestras (20 g) se colocaron en una charola de aluminio y se secaron por 24 h en la estufa de desecación con aire forzado a una temperatura constante de 65° C. Pasado el tiempo se retiraron de la estufa y se colocaron en un

desecador durante 1 h. Posteriormente se registraron los pesos y se obtuvo el % de humedad mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \left(\frac{\text{Peso de la muestra seca} \times 100}{\text{Peso de la muestra inicial, g}} \right)$$

$$\% \text{ H} = \frac{(A-B) \times 100}{M}$$

$$\% \text{ MS} = 100 - \% \text{ H}$$

Dónde:

A= peso charola + muestra húmeda, (g).

B= peso charola + muestra seca, (g).

M= peso muestra inicial, (g)

MS = Materia Seca.

Los resultados se calcularon y se presentan como porcentaje de humedad y materia seca.

6.2.2 Determinación de cenizas.

Para la determinación de cenizas se siguió el método AOAC 942.05. Brevemente, se pesaron 3 g de muestra para cada repetición, posteriormente se colocaron en crisoles de porcelana previamente puestos a peso contante. Las muestras fueron calcinadas en la mufla a una temperatura de 550° C por 12 h hasta tener cenizas grises. Transcurrido el tiempo, los crisoles se sacaron de la mufla y se colocaron en la estufa de secado para enfriarlos durante 30 min. Después se colocaron en el desecador alrededor de 2 h y se registraron los pesos. El porcentaje de cenizas se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(A - B) \times 100}{M}$$

Dónde:

A= peso del crisol + cenizas, (g).

B= peso del crisol a peso contante, (g).

M= peso de la muestra inicial, (g)

6.2.3 Determinación de fibra cruda

La determinación de fibra cruda se determinó por el método 962.09 de la AOAC. 1990. La fibra cruda está constituida por la fracción de materia orgánica que queda después de digerir la muestra con ácido sulfúrico y e hidróxido de sodio bajo condiciones controladas. Esta fracción está formada principalmente por celulosa, cutina y parte de la lignina presentes en la muestra. La fibra se pierde en la ignición del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra.

Se pesaron 2 g de hoja de frijol liofilizada, con una exactitud de 0.1 mg y se transfirió en un matraz para calentamiento a reflujo, en otro matraz para blanco se agregaron 2.0 g de fibra cerámica, a ambos matraces se les puso 200 mL de H_2SO_4 0.255 N hirviendo, gotas de antiespumante y perlas de vidrio, se conectó el aparato de calentamiento a reflujo y se dejó hervir rotando el matraz periódicamente durante 30 min, después de esto se desmontó el equipo y se filtró a través de un embudo Büchner. El filtrado se lavó con 75 mL de agua hirviendo. Se retornó el residuo al aparato de calentamiento a reflujo y se hirvió nuevamente por 30 min, rotando el matraz periódicamente, posteriormente se lavó con 25 mL de H_2SO_4 0.255 N hirviendo y 3 porciones de 50 mL de agua hirviendo y con 25 mL de etanol al 95%. El residuo se removió y se transfirió a un crisol previamente pesado. Se secó en la estufa a 130 + 2 °C por 2 h, se enfrió en el desecador y se peso. Posteriormente se incineró por 30 min a 600 + 15 °C, se enfrió en el desecador y se pesó. Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

% Fibra cruda en muestra molida = C = $\frac{(\text{Pérdida de peso en la incineración} - \text{pérdida de peso del blanco de fibra cerámica})}{\text{peso de la muestra}} \times 100$

%Fibra cruda (base húmeda) = $\frac{C \times 100 - \% \text{ Humedad muestra original}}{100}$

Se realizó la prueba por duplicado, se promediaron los valores obtenidos y se expresaron los resultados con dos decimales, se cuido que la variación entre los valores obtenidos en las dos pruebas no fuera superior al 5%.

6.2.4 Obtención del extracto etéreo (contenido de grasa)

La determinación del extracto etéreo se realizó siguiendo el método de la AOAC 920.39. Esta determinación usa el método Soxhlet que utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el alimento.

Una vez pesadas las muestras (3 g), se transfirieron a los cartuchos y se colocaron en el extractor Soxhlet. En la parte inferior se ajustaron los vasos recolectores del extractor previamente llevados a peso constante. Se puso en calentamiento la parrilla y se colocó el refrigerante para condensar el éter. Se añadieron 80 mL de éter por el extremo superior para obtener las descargas, la extracción se efectuó por 4 h. Al transcurrir este tiempo se retiraron los vasos y se dejaron en una campana de extracción hasta que se evaporó el éter restante, posteriormente se metieron en la estufa por 3 h a 100° C. Finalmente se colocaron en el desecador para después registrar el peso. Los resultados fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \frac{(A - B) \times 100}{M}$$

Dónde:

A = peso del vaso con residuo lipídico, (g).

B = peso constante del vaso, (g).

M= peso de la muestra, (g).

Los resultados se presentan como porcentaje de extracto etéreo.

6.2.5 Determinación de proteína (N x6.25)

La proteína se determinó con el método AOAC 2001.11. El método también es llamado Kjeldahl. Esta técnica se basa en que las proteínas y demás materia orgánica, son oxidados por el ácido sulfúrico, añadiéndose sulfato de sodio como catalizador y aumentar la temperatura de la mezcla y de esta manera acelerar la reacción, fijándose el nitrógeno, en forma de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Esta sal se hace reaccionar con una base fuerte desprendiéndose amoniaco (NH_3) , que se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido bórico (H_3BO_3) . Por titulación del ácido se calcula la cantidad de NH_3 , conociéndose de esta manera la cantidad de nitrógeno contenido en la muestra que multiplicado por el factor de conversión (6.25) resulta en la cantidad de proteína cruda o bruta.

Se tomaron por triplicado 2.0 g de muestra y se colocaron en tubos Kjeldahl agregándose 25 mL de ácido sulfúrico al 97% y 2 pastillas de la mezcla digestora (1000 Kjeltabs Cu/3.5) para iniciar la digestión (líquido oscuro). Los matraces se colocaron sobre las parrillas de calentamiento y después de 45 min cuando el líquido tomó una coloración verde claro se retiró de la parrilla y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Para realizar la destilación se midieron 50 mL de ácido bórico al 2% con 3 gotas de rojo de metilo en un matraz Erlenmeyer y éste se colocó en la terminal del refrigerante de la unidad de destilación, para recibir el amoniaco. En este punto se agregó hidróxido de sodio al 50% al tubo Kjeldahl y se colocó inmediatamente en la unidad de destilación hasta destilar aproximadamente 150 mL. Se tituló con una solución de ácido sulfúrico 0.1N hasta que se produjo el cambio de color amarillo a rosa tenue. Los cálculos para obtener el porcentaje de nitrógeno se realizaron aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{A} - \text{B}) \times \text{C} \times \text{N} \times 100}{\text{M}}$$

Dónde:

A= mL de H₂SO₄ gastados de la muestra problema

B= mL de H₂SO₄ gastados del blanco.

C= miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

N= Normalidad del ácido H₂SO₄.

M= peso de la muestra, (g).

% de proteína cruda o bruta = % Nitrógeno x factor de conversión (6.25).

Los resultados se presentaron en % de proteína.

6.2.6 Análisis de hierro.

Los análisis de hierro se realizaron en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, para las muestras de hoja de frijol liofilizada, croqueta de la dieta basal y harina de la dieta deficiente en hierro se realizaron los análisis de cuantificación de hierro por digestión con HNO₃ como lo marca la NOM-117-SSA1-1994, para la hoja de frijol liofilizada también se realizaron análisis mediante digestión con HCl para determinar el contenido de hierro biodisponible como lo establece la NOM-131-SSA1-1995. Ambas se realizaron con un espectrómetro marca Perkin Elmer modelo Analyst 200.

6.3 Determinación de compuestos fenólicos totales y solubles en agua

Para la determinación de los compuestos fenólicos solubles en las hojas de frijol se realizó la extracción bajo dos condiciones: en extracto metanólico para compuestos fenólicos totales y en extracto acuoso para compuestos fenólicos solubles, la determinación cuantitativa se realizó por la prueba de Ácido Gálico-Folín (Singleton y Rossi, 1965).

Para la extracción de fenoles totales se pesaron 100 mg de la hoja de frijol liofilizada y molida en un tubo Falcon de 50 mL y se añadieron 10 mL de metanol al 30%, se agitó en un vórtex a 8000 rpm durante 10 min. Se filtró el sobrenadante

con papel Whatman grado 90 de tamaño 12.5 cm hasta obtener todo el líquido. Se tomó una alícuota de 125 μ L del extracto y se colocó en un tubo de ensaye. Se le adicionaron 500 μ L de agua desionizada y se agitó brevemente en vórtex a 3000 rpm. Después se agregaron 125 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Co.), se agitó brevemente en vórtex a 3000 rpm y se dejó reposar 6 min en oscuridad. Posteriormente se añadieron 1.25 mL de Na₂CO₃ (Sigma Aldrich Co.) al 7% y 1 mL de agua desionizada, se agitó brevemente en vórtex a 3000 rpm. Se dejó reposar 1.5 h en oscuridad a temperatura ambiente y se leyó a una absorbancia de 750 nm en el espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis). En otro tubo se preparó el blanco de corrección con 125 μ L de extracto de la muestra y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del reactivo de Folin-Ciocalteu. Por otro lado se prepararon dos blancos de calibración. Para el blanco de calibración se usó metanol al 30% y con todos los reactivos bajo las mismas condiciones. Para el blanco de calibración del factor de corrección se usó metanol al 30% y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del reactivo de Folin-Ciocalteu. La concentración final se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/ 100g de muestra (mg EAG/ 100g).

Se elaboró una curva estándar de calibración en la cual se tomaron 4 g de ácido gálico (Sigma Aldrich Co.) y se disolvieron en 50 mL de agua desionizada, la concentración final fue de 0.08 mg de AG/mL. De esta solución se tomaron las alícuotas requeridas que se llevaron a diferentes volúmenes con agua desionizada para tener una serie de concentraciones de 0.08 hasta 0.0016 mg AG/mL. De cada una de las soluciones se tomó una alícuota de 125 μ L y se siguió la técnica de fenoles totales. Se graficó la absorbancia contra la concentración. La ecuación obtenida fue la aplicada en la determinación de fenoles totales.

Con la finalidad de determinar la cantidad de fenoles solubles en agua se obtuvo un extracto acuoso con 100 mg de la hoja de frijol liofilizada y molida en un tubo Falcon de 50 mL y se añadieron 10 mL agua HPLC, se agitó en un vórtex a 3000 rpm durante 10 min. Se filtró el sobrenadante con papel Whatman hasta obtener todo el líquido y se determinaron de la misma manera que los fenoles totales.

6.4 Determinaciones bioquímicas de factores antinutrícos

La determinación de los factores antinutrícos se realizó con la intención de observar la presencia de sustancias químicas capaces de afectar la digestión o absorción de nutrientes de forma que, al ser consumida la hoja de frijol, pudieran tener un efecto adverso. Se determinaron compuestos fenólicos, taninos condensados, fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas.

6.3.1 Determinación de taninos.

Se cuantificaron los taninos condensados expresados como equivalentes de (+) catequina (Cat) en mg/ 100g de hoja de frijol liofilizada (mg EC/100g), de acuerdo al ensayo de la vainillina de Desphande y Cheryan (1985). El método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en soluciones ácidas. La vainillina protonada es un radical electrofílico débil que reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 2 u 8. El producto intermedio de esta reacción se deshidrata rápidamente para dar un producto coloreado de rosa o rojo cereza. La reacción se verifica entre la vainillina y los flavonoides como catequina.

Para la extracción de taninos se pesaron 200 mg de hoja de frijol liofilizada y molida y se colocaron en un tubo Falcon de 50 mL. Se adicionaron 10 mL de metanol, se agitó en un vórtex a 8000 rpm durante 20 min y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente, se tomó 1 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo de ensaye, se adicionaron 5 mL del reactivo de vainillina (Sigma Aldrich Co.) (vainillina al 1% en metanol y HCl al 8% en metanol, en proporción 1:1) preparado en fresco. En otro tubo se preparó el factor de corrección con 1 mL del extracto de la hoja de frijol y 5 mL de HCl al 4% en metanol. Por otro lado, se prepararon dos blancos de calibración uno con 1 mL de metanol y 5 mL de reactivo de vainillina y otro con 1 mL de metanol y 5 mL de HCl al 4% en metanol. La reacción se llevó a cabo por 20 min a 30°C y cada muestra se leyó a una absorbancia de 500 nm (Jenway 6505 UV/Vis).

Para la determinación de los taninos condensados se elaboró una curva estándar de calibración con 10 mg de (+)-catequina (Sigma Aldrich Co.) que se disolvieron

en 10 mL de metanol absoluto; la concentración final fue de 1 mg/ mL. De esta solución se tomó una alícuota de 5 mL y se llevó a un volumen de 10 mL con metanol absoluto, y así sucesivamente hasta obtener una serie de concentraciones de 1 hasta 0.0039 mg/ mL. De cada una de las soluciones se tomó una alícuota de 1 mL y se siguió la técnica para taninos condensados previamente descrita. Se graficó la absorbancia contra la concentración y la ecuación obtenida fue la aplicada en la determinación de taninos. La concentración final se expresó como mg equivalentes de (+) catequina/ 100g de hoja de frijol liofilizada (mg EC/100g).

6.3.2 Determinación de fitatos.

Se cuantificaron los fitatos totales contenidos en la hoja de frijol liofilizada por el método propuesto por Gao y col. en 2007. Se pesaron 0.5 g de hoja de frijol liofilizada molida con una malla de 0.5 mm en un tubo Falcon de 15 ml, se le añadieron 10 mL de HCl al 3.5% (preparado con agua desionizada) y se agitó en vórtex por 5 seg. Las muestras fueron colocadas en una plancha de agitación durante una hora a 220 rpm, después fueron centrifugadas a 5000 rpm/ 20 min a 10°C, el sobrenadante se extrajo con una pipeta y se colocó nuevamente en un tubo Falcon de 15 mL que contenía 1g de NaCl, se agitó en un vórtex por 5 seg para homogeneizar la muestra. Se pasó a la plancha de agitación a 350 rpm durante 20 min y posteriormente se mantuvieron a -20°C durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min y 1 mL del sobrenadante claro se diluyó 25 veces en un tubo Falcon de 50 mL (1 mL del sobrenadante + 24 ml de agua desionizada) agitando en vórtex durante 5 seg. A 3 mL de la solución diluida se le añadieron 1 mL del reactivo de Wade (Sigma S.A. de C.V.) y se agitó en vórtex por 5 seg, se centrifugó a 5000 rpm/10 min a 10°C, se tomó el sobrenadante de la superficie y se leyó a 500 nm contra un blanco de agua desionizada.

Para cuantificar el contenido de fitatos en la hoja de frijol liofilizada se preparó una curva estándar, usando una solución de concentración de 250 µg de fitato de sodio/ mL. Para preparar esta solución se aforaron 12.5 mg de fitato de sodio en

50 mL de agua desionizada. La curva se preparó por diluciones para obtener concentraciones de 0 hasta 300 μg de fitato de sodio en un volumen total de 3000 μL cada una. Se leyó la absorbancia a 500 nm y se graficó contra la concentración de fitato de sodio. La ecuación obtenida en esta gráfica se utilizó para extrapolar los valores de fitatos presentes en la hoja de frijol liofilizada.

6.3.3 Cuantificación de proteína.

La proteína se cuantificó por el micro método de Bradford (Bradford, 1976). Esta es una técnica que determina la concentración de proteína soluble y se basa en el cambio de coloración al unirse a diferentes concentraciones de proteína. El colorante utilizado es el azul brillante de Coomassie G-250, colorante acídico que se une principalmente a aminoácidos básicos (Lys, Arg, His) y aromáticos (Trp, Tyr, Phe) y la sensibilidad de este método cae en el rango de 1-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La muestra se preparó pesando 5 g de HFL en un matraz Erlen-meyer de 100 mL, al que se le adicionaron posteriormente 50 mL de agua HPLC y se agitó en plancha a 5000 rpm a temperatura de 4° C por una hora. Posteriormente, se vació la muestra a tubos Falcon® para centrifugarse a 5000 rpm durante 10 min. Después de la centrifugación se extrajo el sobrenadante se alucuotó en tubos eppendorff de 2 mL y se mantuvo en congelación a -20° C hasta que el análisis de proteína fue realizado. Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó una solución estándar de albúmina sérica de bovino (ASB) a diferentes concentraciones y reactivo comercial de Bradford así como placas de 96 pozos. Brevemente, se colocaron 10 μL de los estándares de proteína o 10 μL de la muestra problema y se adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford, se incubaron a temperatura ambiente por 15 min y el cambio de color generado se leyó a 595 nm en un lector de microplacas.

6.3.4 Cuantificación de inhibidores de proteasas.

Este estudio se realizó en el CINVESTAV Campus Irapuato, en el laboratorio de Defensa de plantas de la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Blanco Labra. La presencia de los

inhibidores de proteasas fue analizada por la actividad inhibitoria de tripsina, usando el sustrato BAEE (Sigma S.A. de C.V.) (Schwartz y Takenaka, 1955; Erlanger y col., 1961). Las soluciones se prepararon de la siguiente manera, en un tubo de ensayo se pesó 0.002 g de tripsina y en otro 0.015 g de sustrato BAEE. A la tripsina se le colocaron 0.5 mL de agua pH 3 y al BAEE 3 mL de buffer pH 8.1. La muestra a analizar fue un extracto acuoso de hoja de frijol liofilizada que se preparó con 5 g de hoja de frijol liofilizada en 50 mL de agua desionizada, se mantuvo en agitación a 320 rpm durante 1 hora, se centrifugó a 5000 rpm por 20 min, el sobrenadante se extrajo con la ayuda de una pipeta y se hicieron alícuotas de 2 mL mantenidas a -20°C hasta su uso. Para la determinación se colocaron en varios tubos de ensayo 2.8 ml de buffer pH 8.1 tris CaCl₂:2H₂O 0.15 M/ 0.05 M a 37°C. El espectrofotómetro UV fue calibrado con buffer pH 8.1 más sustrato BAEE a 253 nm y para la lectura se usó el programa KINETICS (Beckman, modelo DU-65). Para medir la actividad enzimática se colocaron a los tubos incubados 10 µL de enzima y 50 µL de sustrato BAEE y se midió la absorbancia por duplicado. Posteriormente al buffer y la tripsina se le añadió extracto acuoso de hoja de frijol liofilizado y se dejó reposar a 37°C por dos minutos y después se agregó el sustrato BAEE se dejó reposar y se midió la absorbancia. Una unidad de tripsina es definida como un incremento de 0.01 de absorbancia a 253 nm y se expresa por la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad/ } \mu\text{L} = \frac{\text{Absorbancia de la enzima} / \text{Absorbancia con inhibidor}}{0.01 * (\text{alícuota} - \text{enzima})}$$

La actividad inhibitoria de tripsina es definida como el número de unidades de tripsina inhibidas y responden a la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Inhibidas/ mL} = \frac{\text{Absorbancia de la enzima} - \text{Absorbancia con inhibidor}}{0.01 * (\text{alícuota} - \text{inhibidor})}$$

6.3.5 Determinación de la presencia de lectinas.

Para determinar la presencia de lectinas se analizó la actividad aglutinante del extracto acuoso de hoja de frijol liofilizada utilizando el método de las diluciones dobles seriadas en placas de 96 pozos (Jaffé, 1980), en donde se colocaran 100 μ L de PBS como control negativo, después en los pozos de cada línea (2A, 3A,..., 8A) se agregaron, por triplicado, 100 μ L de la fracción a probar con concentración de proteína conocida. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de PBS a toda la placa y se realizaron diluciones dobles seriadas comenzando en los primeros pozos y pasando a los siguientes (1A, 1B, 1C,...,1L). Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50 μ L de eritrocitos de conejo al 2%, los cuales habían sido previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) y se incubó a 37° C durante 3 h. La placa se leyó en un microscopio invertido y la actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa. La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación: $AE = (2^n) / mg$

Dónde: AE=Actividad específica aglutinante (U/mg) expresada en unidades por mg de proteína inicial, n=Última dilución con aglutinación apreciable al microscopio, mg es la cantidad de proteína en mg.

6.4 Ensayo Biológico

6.4.1 Animales. Se utilizaron 40 ratas de la cepa Wistar, hembras, de ocho semanas de edad, adquiridas en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas fueron aleatorizadas en distintos grupos experimentales para conformar los grupos de estudio. Se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, las ratas fueron tratadas de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y se atendieron las consideraciones éticas correspondientes. Los animales se colocaron en jaulas plásticas individuales, la cama de aserrín fue cambiada cada semana, se les proporciono agua y alimento *ad libitum* y se mantuvieron a temperaturas entre 22-25°C y a ciclos circadianos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

6.4.2 Dietas. Se utilizaron dos dietas para roedores, la dieta basal (DB, Rodent Laboratory Chow 5001) que contiene todos los nutrientes necesarios para mantener un estado nutricio adecuado para roedores y la dieta deficiente en hierro (DDFe, Rismart S.A. de C.V.) en polvo. El contenido de hierro en las dietas fue corroborado por absorción atómica obteniendo valores de hierro en la dieta basal de 165 ppm de Fe y en la dieta deficiente en hierro de 34 ppm de Fe.

Para el aporte de hierro por medio del sulfato ferroso se utilizaron grageas de sulfato ferroso (Homoger, STREGER S.A.) con un aporte de 191 mg de sulfato ferroso en cada gragea, equivalente a 60 mg de hierro por gragea. Las grageas fueron molidas cuidadosamente en un mortero de porcelana, adicionadas a la dieta y mezcladas cuidadosamente para lograr su homogeneización.

Las dietas experimentales DDFe, DDFe con hoja de frijol liofilizada al 10% m/m y DDFe con sulfato ferroso 20.6 mg de Fe/kg se elaboraron en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las mezclas fueron realizadas en bolsa plástica, limpia, se evitó el contacto con posibles contaminantes de hierro y se mezclaron perfectamente hasta lograr la homogeneización de las partículas. Las dietas fueron peleteadas en el Laboratorio Experimental Multidisciplinario II del Departamento de Ingeniería y Tecnología, Área de Ingeniería Aplicada de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México en un equipo Extractor en frío de monotornillo TA 6/D, marca Didacta Italia y modelo D45TE de acero inoxidable usando agua tridestilada como adyuvante y posteriormente se almacenó a temperatura ambiente en un lugar fresco hasta su empleo.

6.4.3 Grupos de estudio

El estudio consistió en dos fases: fase de disminución de hierro con duración de 11 días y fase de recuperación de hierro con duración de 14 días.

- **Grupo 1 control positivo.** Este grupo conformado por 12 ratas, fue alimentado con la DB y fue el estándar de comparación entre los grupos

depletados y los grupos recuperados. A los 11 días se sacrificaron 4 animales como control de la fase de disminución de hierro.

- **Grupos con deficiencia de hierro.** Este grupo conformado por 28 ratas fueron alimentados con DDFe durante 11 días para inducir anemia en ratas (Ning-Sing y Hui-Liu, 2000). Posteriormente al periodo de disminución se sacrificaron 4 ratas para hacer la comparación entre los distintos parámetros y biomarcadores a analizar. Las ratas restantes del grupo deficiente en hierro fueron divididas en tres subgrupos de forma aleatoria, los cuales fueron sometidos a tres dietas distintas durante los catorce días del periodo de recuperación.
- **Grupo suplementado con hoja de frijol liofilizada (HFL).** Formado por ocho ratas. Este grupo fue alimentado con una mezcla dieta formulada con 90% en peso de DDFe y 10% HFL durante 14 días.
- **Grupo realimentado con DB.** Formado por ocho ratas. Este grupo fue alimentado con la DB que tiene el hierro necesario para mantener el estado nutricio de las ratas durante 14 días.
- **Grupo suplementado con sulfato ferroso.** Formado por ocho ratas. Este grupo fue alimentado con una dieta formulada con DDFe y sulfato ferroso que aportaba los 20.6 mg de Fe/kg equivalentes al hierro aportado por la HFL durante 14 días.

Al término del experimento los animales fueron sacrificados por decapitación, se recuperó la sangre en tubos con y sin anticoagulante y se realizó la necropsia para obtener el hígado, bazo y corazón.

6.5 Determinación de los biomarcadores hematológicos.

Los biomarcadores hematológicos se midieron empleando un analizador hematológico automatizado llamado CELL-DYN 1400 que, mediante impedancia eléctrica, determina los leucocitos, las plaquetas y los eritrocitos y el método modificado de la cianometahemoglobina para determinar los niveles de hemoglobina. La sangre colectada con anticoagulante fue colocada en el equipo que aspiró 30 μ L de sangre y se diluyó automáticamente con el diluyente CELL-

DYN hasta 1:25, se aspiraron 100 μ L de la muestra diluida y se mezclaron con 5 mL del diluyente CELL-DYN en la cámara de mezcla de los eritrocitos/plaquetas en una relación de 1:12,801. El resto de esta dilución se mezcló con 1 mL del reactivo hemolizante en la cámara de mezcla de los leucocitos, el reactivo hemolizante destruyó la membrana de cada eritrocito con la liberación de la hemoglobina. La hemoglobina se determinó por espectrofotometría, como fuente lumínica se utilizó un diodo emisor de baja energía, la luz transmitida se midió con un detector fotométrico, provisto de filtro, a una longitud de onda de 540 nm. El valor de hemoglobina se comparó con el valor de referencia y se expresó como gramos de hemoglobina por decilitros de sangre total (g/dL). Los datos obtenidos de leucocitos se representaron en histogramas. El número absoluto de células de cada subpoblación leucocitaria se calculó una vez determinado el recuento de leucocitos, multiplicando este valor por el porcentaje hallado de cada población y los resultados se expresaron de la siguiente manera:

- Leucocitos (WBC) K/ μ L (miles por microlitro)
- Linfocitos (LYM) K/ μ L
- Porcentaje de linfocitos (LYM %)
- Granulocitos (GRAN) K/ μ L
- Porcentaje de granulocitos (GRAN %)
- Los eritrocitos (RBC) fueron reportados como M/ μ L
- Volumen corpuscular medio (VCM) en fL
- Hemoglobina corpuscular media (HCM) en pg
- Concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) en g/dL

6.5.1 Determinación de la ferritina. Para determinar la concentración de ferritina sérica se utilizó el Rat Ferritin Elisa RUO (Alpco, TM Immunoassays). Cada muestra fue diluida 1:40 para su uso (10 μ L de la muestra de plasma y 390 μ L de diluyente). Se preparó a la par una curva estándar de concentraciones conocidas de ferritina desde 0 hasta 400 ng/mL. En una microplaca de 96 pozos proporcionado en el kit se pipetearon 100 μ L de muestra por duplicado, las muestras fueron las diluciones para la curva y las muestras de plasma de sangre

de rata, se incubó a temperatura ambiente por 60 min protegida de la luz. Se aspiró el contenido de los pocillos, se llenaron los pocillos con solución de lavado diluida y se vació su contenido, sacudiendo fuertemente sobre papel absorbente para retirar todo el contenido de los pocillos, se repitió esta operación tres veces continuas. Despues se pipeteó en cada pocillo 100 μ L del conjugado enzima anticuerpo diluido apropiadamente y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos manteniendo la placa protegida de la luz. Se volvió a realizar el lavado anterior por tres veces y se sacudió la placa sobre papel absorbente, se pipetearon 100 μ L de solución de sustrato TMB en cada pocillo y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por 10 minutos y despues se añadieron 100 μ L de solución *stop* en cada pocillo. La absorbancia fue determinada a 450 nm en un lector de microplaca Thermo Electron Corporation, modelo Multiskan Ascent. Con los valores obtenidos de absorbancia en los pocillos designados se realizó la curva de concentración de ferritina contra la absorbancia y la ecuación obtenida fue la empleada para interpolar las absorbancias de las muestras y obtener los valores de ferritina en cada muestra.

6.6 Análisis Estadístico.

Una vez obtenidos los resultados de los experimentos se conformaron en una base de datos, donde se pusieron las mediciones realizadas para cada parámetro o biomarcador por rata como conteo de glóbulos blancos, glóbulos rojos, hemoglobina, ferritina, volumen corpuscular medio, entre otros. así como el promedio de estas mediciones para cada rata, finalmente con los promedios de cada biomarcador por rata se hizo una suma y un promedio para cada biomarcador por grupo que es el que aparece en la tabla de resultados para biomarcadores. Se unificaron los valores de todos los biomarcadores por cada grupo y se analizaron con ayuda del programa SSPS Statistics 17.0. Se obtuvieron valores de media, desviación estándar y error estándar para cada biomarcador por grupo. Posteriormente, se realizaron pruebas de T de Student para analizar las diferencias estadísticas entre los valores obtenidos para el grupo control y el grupo deplegado, durante el periodo de depleción. Para los resultados obtenidos despues

del periodo de recuperación de realizaron ANOVAS para analizar las diferencias estadísticas entre los cuatro grupos (control, hoja de frijol liofilizada, dieta basal y sulfato ferroso) y después de esto, en los biomarcadores donde se observó diferencia significativa, se analizaron con los método de Dunnett y Tukey. Los resultados obtenidos con el análisis estadístico se muestran en las tablas de valores para biomarcadores así como en las gráficas de biomarcadores.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis químico proximal y contenido de hierro en hoja de frijol liofilizada

El AQP de la HFL se muestra en el Cuadro 7. El contenido de proteína cruda se encontró dentro del promedio para hojas verdes. La cantidad de fibra presente en la hoja fue elevada por lo que podría contribuir con aporte significativo de fibra. Este contenido es similar al promedio reportado para otros valores de fibra en alimentos de hoja verde como la acelga con un valor promedio de hasta 40%, mientras que en base húmeda es de $3.9 \pm 0.2\%$ debido a la gran cantidad de agua presente en las hojas de los vegetales (Macías de Costa y col., 2003).

El resultado obtenido para el hierro indica un valor elevado de hierro biodisponible para un vegetal ya que normalmente se observan valores de biodisponibilidad de un 10-15%, mientras que para esta muestra se observó un valor de cerca del 75%. El hierro total fue menor al reportado por Ayala-Vela y col. (2008) quienes encontraron 643 mg/kg. Lo anterior puede deberse al manejo y preparación de la muestra ya que el hierro del suelo y utensilios pueden afectar la cantidad presente en la muestra. Otras posibles causas son la variación fisiológica de la planta, la temporada en que fue cultivada o cosechada y factores climáticos diversos.

Cuadro 7. Análisis químico proximal de la hoja de frijol liofilizada.

CONTENIDO	CANTIDAD
Materia seca (%)	94 ± 0.003
Proteína cruda (%)	24.5 ± 0.2
Extracto etéreo (%)	2.9 ± 0.05
Fibra (%)	38.3 ± 0.8
Carbohidratos (%)	19.2 ± 0.43
Cenizas (%)	15.1 ± 0.02
Hierro mg/g	0.2747 (total) 0.2061 (biodisponible)

7.2 Contenido de compuestos fenólicos totales y solubles en agua

En el cuadro 8 se muestran los valores de compuestos fenólicos obtenidos, estos valores fueron mayores que los reportados para la harina de semilla de frijol (0.958 mg eq EAG/g de harina para los compuestos fenólicos solubles y de 0.733 mg eq AG/g de harina para compuestos fenólicos totales) (Reyes-Fernández, 2008) y de 0.459 mg eq AG/g de frijol (Yao y col., 2011).

Cuadro 8 Contenido de compuestos fenólicos totales y solubles en agua

Compuestos fenólicos	Contenido
Fenoles totales (mg AG/g HFL)	5.796±0.31
Fenoles solubles (mg AG/g HFL)	4.742+0.26

7.3 Contenido de factores antinutricios

El Cuadro 9 muestra el contenido de factores antinutríos encontrados en la HFL.

Cuadro 9. Contenido de factores antinutríos en la hoja de frijol liofilizada

Compuestos antinutricio	Contenido
Taninos (mg eq (+) Cat/g HFL)	3.000± 0.48
Fitatos (mg Ac. Fítico/g HFL)	39.280± 2.98
Lectinas (UA/mg de proteína)	ND
Inhibidores de proteasas (UI/mg de proteína)	2.14± 0.32

ND: No detectado, UA: Unidades de aglutinación, UI: unidades de inhibición.

No existen valores reportados de la cantidad de taninos presentes en la hoja de frijol liofilizada de la variedad Pinto Villa, los estudios que existen al respecto es sobre la testa del frijol y sobre harina del grano de frijol completo. Se sabe que la mayoría de los taninos en el grano de frijol se encuentran presentes en la testa,

encontrándose en menores cantidades en el cotiledón (Desphande y col., 1982). Los resultados mostraron valores elevados de taninos comparados con los obtenidos por Reyes en el 2008 para el frijol común de la variedad Pinto Durango que fue de 0.303 mg eq (+) Cat/g de harina de frijol y de 0.946 mg eq de (+) Cat/g de harina de frijol común de la variedad Pinto Villa, reportado por Iniestra y col. (2005). Sin embargo, estos valores son esperados pues se sabe que los taninos son compuestos químicos del metabolismo de las plantas que están presentes en hojas y principalmente en estructura leñosa como tallos y troncos. Los valores encontrados de taninos para plantas usadas para alimentar ganado son de 1.39 mg/g de forraje de *Amarantus hibridus*, 2.5 mg/g de forraje de *Sorghum alepense*, 13.43 mg/g de *Cosmos bipinnatus* y hasta 51.68 mg/g de forraje de *Desmodium molliculum* (Gutiérrez y col., 2008). Los efectos antinutricionales de taninos se relacionan con la disminución de la ingesta de alimentos, la formación de complejos con las proteínas de la dieta y con otros componentes de los alimentos, la inhibición de enzimas digestivas, el incremento de la excreción de proteína endógena, los efectos sobre el tracto digestivo así como la toxicidad de taninos absorbidos y sus metabolitos (Gupta, 1987).

Estos datos son importantes pues se sabe que los compuestos fenólicos están relacionados con una importante actividad antioxidante que ayuda a neutralizar el efecto de los radicales libres presentes en el organismo (Bolívar y Luis, 2010) ayudando a mantener la integridad de la membrana celular, lo que evita la muerte celular por daños a su estructura. Los compuestos fenólicos presentan capacidad antioxidante, en el caso de estas moléculas se sabe que ésta depende en gran medida de la posición de los grupos hidroxilo en la sustitución de los anillos fenólicos (Yao y col., 2011). La presencia de compuestos fenólicos en la dieta se relaciona con la disminución de riesgo de desarrollar cáncer (Messina, 1999; Aparicio-Fernández y col., 2006) y enfermedades coronarias e inflamatorias (Bravo, 1998).

El ácido fítico es capaz de interaccionar con proteínas, inhibir enzimas digestivas y ligarse a minerales de la dieta, principalmente zinc y calcio, volviéndolos

indisponibles o parcialmente disponibles para su absorción (Deshpande y Cheryan, 1984; Knuckles y col., 1985). Sin embargo, estudios epidemiológicos y estudios *in vivo* sugieren un posible papel preventivo del ácido fítico frente a diversas patologías cardíacas (Zhou y Erdman, 1995). Los resultados obtenidos para fitatos fueron altos comparados con los valores reportados para granos y semilla de frijol común aunque se sabe que la cantidad de fitatos presentes en las hojas es muy superior al presente en los granos y semillas (Haug y Lantzsch, 1983). Iniestra y col. (2005) reportaron para distintas variedades de frijol común cantidades entre 0.98 ± 0.13 y 2.16 ± 0.03 mg/g, particularmente para Pinto Villa el valor fue de 1.18 ± 0.08 mg/g. Bernal-Lugo y col. (1990) y Deshpande y col. (1982) reportaron valores de entre 0.6 y 2.27% para frijol común. Los valores de fitatos encontrados para distintas plantas usadas como forraje se han calculado en 44.8 mg/g para *Amarantus hibridus*, 39.3 mg/g para *Desmodium molliculum* y 27.3 mg/g para *Malva parviflora* (Gutiérrez y col., 2007).

Las lectinas reaccionan con la superficie epitelial del tracto digestivo, pueden interferir con la absorción de nutrientes, alergias leves y otros efectos subclínicos, particularmente cuando se consumen en grandes cantidades. No obstante, la administración oral de bajas dosis de lectinas puede tener efectos benéficos en la eficiencia de la digestión y absorción del intestino, del sistema inmune y de la flora bacteriana (Freed, 1999). Se ha observado que lectinas vegetales de diferentes fuentes inhiben el crecimiento de células cancerosas en función de la concentración y de manera diferencial. Son capaces de inducir apoptosis y activar el sistema inmune mediante la estimulación de la proliferación de linfocitos T (Maier y Fiebig, 2002; Castañeda-Cuevas y col., 2007). En este caso, como se esperaba, no se detectó su presencia. Las lectinas en las plantas se encuentran en mayor concentración en las semillas y tejidos de almacenamiento, constituyendo entre el 2 al 10% del total de las proteínas, principalmente en las semillas de leguminosas. Estas proteínas en semillas se localizan principalmente en los cuerpos proteicos de las células de los cotiledones y en menor cantidad en hojas, raíces y tallos, lo cual sugiere que las lectinas juegan un papel fisiológico importante en las plantas (Chrispeels y Raikhel, 1991). Probablemente las lectinas

son sintetizadas en las hojas e, inmediatamente, transferidas a las semillas durante el desarrollo y diferenciación de los embriones debido a que la proporción de lectinas en las hojas maduras disminuye rápidamente al incrementar su concentración en el citoplasma de los cotiledones y los embriones. Cuando la semilla germina, hay una disminución progresiva del contenido de lectinas proporcional a la pérdida de proteínas de reserva (Mialonier y col., 1973; Pueppke y Bauer, 1978).

Los inhibidores de proteasas son polipéptidos con habilidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Las semillas de leguminosas contienen principalmente inhibidores de proteasas de serina, pertenecientes casi en su totalidad a las familias Kunitz y Bowman-Birk (Ceciliani y col., 1997). Se consideran factores antinutricios ya que interfieren con la digestión de proteínas o con la absorción y utilización de aminoácidos y otros nutrientes. Los IP fueron los primeros compuestos de origen alimenticio probados contra el cáncer (Troll y col., 1987) ya que un sinnúmero de proteasas intervienen en diferentes etapas del proceso maligno y al inhibir dichas enzimas es posible detener el proceso de invasión carcinogénica y además inhibir el desarrollo tumoral (García-Gasca y col., 2002). No existe literatura que reporte los valores de inhibidores de proteasas en la hoja de frijol, sin embargo, existe amplia literatura sobre estos valores en la testa de frijol o el cotiledón del frijol. Se obtuvo un resultado de 2.14 ± 0.32 UI/mg de proteína. En el estudio de Iniesta y col. (2005) se reportó para cotiledón entre 4.78 y 12.22 UI/mg siendo la variedad Flor de Mayo M38 la que presentó el valor promedio más alto 12.22 ± 0.02 seguida por el Negro Sahuatoba 11.27 ± 0.57 . Entre grupos de variedades por color de testa, los negros y color rosa presentaron valores altos de UI (10.26 ± 1.13 y 9.99 ± 2.64 respectivamente) siguiéndoles las variedades de color dorado o café (bayos), blancos y los de testa amarilla (azufrados). Elias y col. (1979) y Beninger y Hosfield (2003) reportaron que en general las variedades de testa negra (13 UI/mg) inhiben en mayor proporción a la tripsina que las de testa blanca (1.0 UI/mg) o roja (11 UI/mg). La literatura indica la presencia de los inhibidores de proteasas en las plantas como proteínas de defensa principalmente, se concentran principalmente en semilla y se sabe que en

hoja se encuentran en pequeñas cantidades cuando la planta está sana. Se reporta su incremento en UI/g de hoja cuando la planta es atacada por plagas, mohos o presentan daños mecánicos (Ceciliani y col., 1997).

Los resultados anteriores muestran que la hoja de frijol contiene compuestos fenólicos, fitatos e inhibidores de proteasas. Resulta importante caracterizar los efectos adversos del consumo de estos compuestos al incluir hoja de frijol a la dieta así como efectos benéficos que permitan prevenir enfermedades no transmisibles como cáncer y enfermedad cardiovascular.

7.3 Estudio Biológico

El estudio biológico se llevó a cabo administrando hoja de frijol liofilizada en la dieta a ratas Wistar con la intención de determinar la disponibilidad del hierro contenido en ésta para lo cual se utilizó dieta estándar basal (DB) y dieta deficiente en hierro (DDFe). En la Figura 10 se observa el comportamiento de ganancia de peso para los períodos de deficiencia y recuperación de hierro. El peso se registró de forma semanal desde el primer día que se inició el experimento. No se observaron diferencias en la ganancia de peso corporal entre tratamientos, incluyendo el periodo de deficiencia de hierro.

La cantidad de alimento consumido durante la etapa experimental se observa en la Figura 11. El consumo de alimento disminuyó en los animales alimentados con DDFe ($p < 0.05$) lo que sugiere que la disminución se debe a la deficiencia de hierro en la dieta. Uno de los efectos más comunes de las deficiencias de hierro es la anorexia, se ha reportado que cuando existe anemia o deficiencia de hierro, la ingesta de alimentos se ve disminuida (Mataix-Verdu, 2009). Durante el periodo de recuperación la cantidad de alimento consumido aumentó en los animales realimentados con DB pero no así en los grupos realimentados con HFL o sulfato ferroso. Lo anterior puede deberse a que las dietas suplementadas alcanzaron cantidades de hierro de 61.4 mg de Fe/Kg en dieta suplementada con HFL o suplementada con sulfato ferroso mientras que la DB contenía valores de hierro de 165 mg de hierro/Kg. Adicionalmente, entre las posibles razones por las que el

consumo de las dietas suplementadas no aumentó, están la textura y palatabilidad de la dieta ya que la consistencia, textura y aroma de la DB son adecuadas para roedores y que las dietas suplementadas tenían una consistencia muy dura.

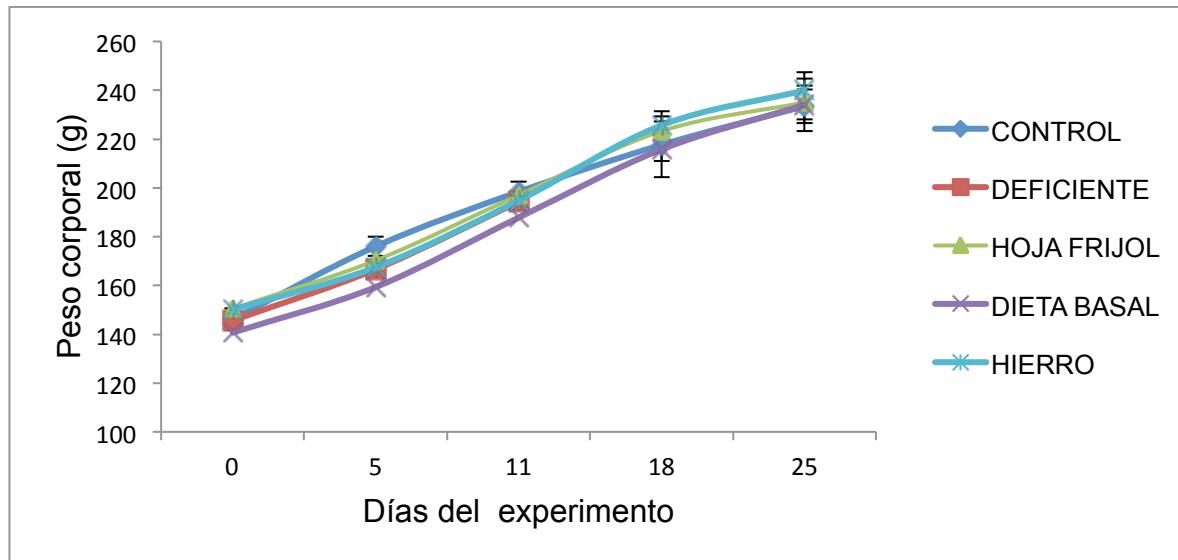


Figura 10. Comparación de la ganancia de peso entre los grupos. Los animales fueron alimentados con dieta estándar o dieta deficiente en hierro por 11 días y, posteriormente, se alimentaron con dieta suplementada con hoja de frijol, dieta estándar o dieta suplementada con sulfato ferroso. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p>0.05$). Se muestran los valores \pm ES.

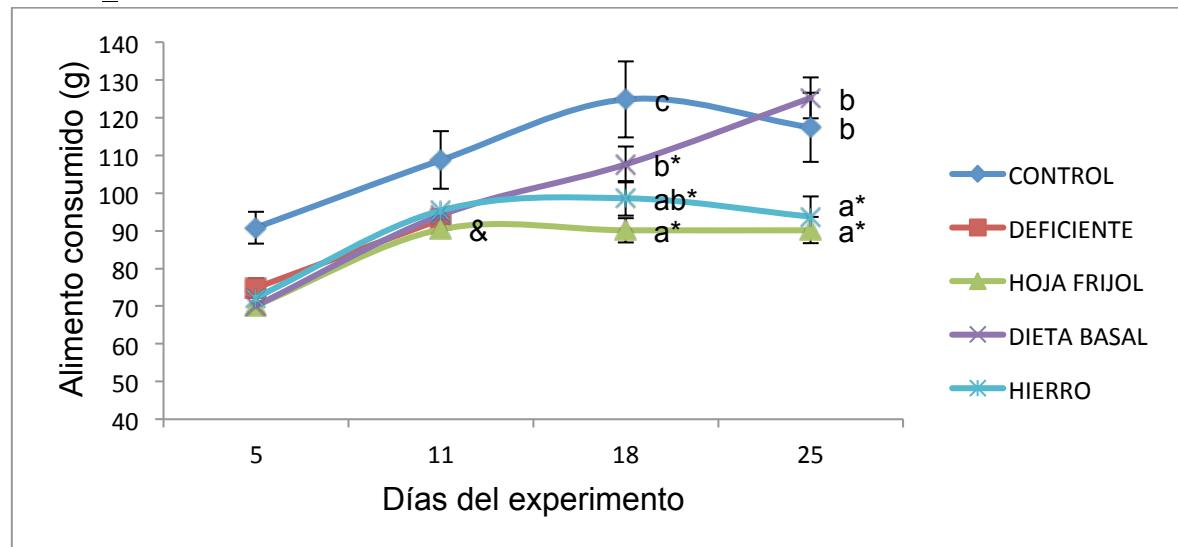


Figura 11. Comparación del consumo de alimentos entre los grupos. Las ratas fueron alimentados con dieta estándar o dieta deficiente en hierro por 11 días y, posteriormente, se alimentaron con dieta suplementada con hoja de frijol, dieta estándar o dieta suplementada con sulfato ferroso. Se observa diferencia estadística por t de Student ($p\leq 0.05$) (&), las letras minúsculas indican diferencia estadística Tukey ($p\leq 0.05$) y mediante Dunnett ($p\leq 0.05$) (*). Se muestran los valores \pm ES.

Después de concluidos los períodos de deficiencia y de recuperación y una vez sacrificadas las ratas se extrajeron el hígado, el bazo y el corazón, órganos relacionados con el metabolismo del hierro (Dallman, 1974). Los órganos fueron disectados y pesados en una balanza analítica (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación del peso de corazón, bazo e hígado de las ratas entre los períodos de deficiencia y recuperación de hierro

ÓRGANO	Deficiencia		Recuperación			
	Control	DDFe	Control	HFL	DB	SF
HÍGADO (g)	9.71± 0.18	8.97± 0.45	10.16± 0.50	9.81± 0.27	10.61± 0.55	9.82± 0.24
BAZO (g)	0.74± 0.09	0.58± 0.01	0.64± 0.04	0.73± 0.03	0.69± 0.07	0.69± 0.04
CORAZÓN (g)	1.06± 0.06	1.1± 0.07	1.09± 0.07	1.04± 0.03	1.12± 0.04	1.08± 0.07

Los pesos de los órganos fueron ajustados al peso corporal de cada animal y posteriormente ajustados al control con la intención de apreciar más claramente los cambios. El ajuste se realizó dividiendo el peso de cada órgano entre el peso corporal de cada animal y posteriormente se calculó el promedio del peso de los órganos el cuál se dividió entre el peso promedio de dicho órgano para el caso de animales control. En la Figura 12 se muestran los resultados para la fase de deficiencia. Se observa que el bazo disminuyó en más del 22% en el grupo deficiente con respecto al grupo control sin presentar diferencia estadística significativa ($p>0.05$), el hígado mostró una pérdida de peso de cerca del 9% con respecto al control y en el corazón no se observaron pérdidas de peso.

En la Figura 13 se muestran los pesos ajustados para los órganos estudiados en la fase de recuperación. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) sin embargo, para el caso del consumo de dieta suplementada con HFL se observó un aumento importante del bazo ya que no sólo recuperó el peso perdido sino que aumentó un 16% por encima del grupo control. Lo anterior puede deberse a un mecanismo de compensación para aumentar la cantidad de glóbulos rojos circulantes con la intención de mejorar la captación de hierro ya que una de las funciones del bazo es regular la cantidad de glóbulos rojos (Roach y Benyon,

2004; Harrison, 2008). En el caso del hígado y corazón se observaron valores similares al control. Las dietas de recuperación con sulfato ferroso o DB mostraron valores similares al control para los 3 órganos estudiados.

En el Cuadro 11 se muestran los valores para los biomarcadores hematológicos. Se observa que durante el periodo de deficiencia todos los marcadores para el grupo deficiente se vieron reducidos en comparación de los valores para el grupo control con excepción del porcentaje de linfocitos, el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media. Lo anterior es esperado pues el sistema inmunológico mantendrá los porcentajes adecuados de linfocitos y granulocitos y solo bajo situaciones de ataques por bacterias, hongos o virus se incrementa el porcentaje de granulocitos, bajo otras situaciones podría indicar alguna patología (Harrison, 2008).

En el caso del volumen corpuscular medio, la hemoglobina corpuscular media y la concentración de hemoglobina corpuscular media se verían afectados si el periodo de deficiencia de Fe hubiera durado más tiempo, el VCM se hubiera visto incrementado si la deficiencia de nuestras ratas hubiera sido de ácido fólico (Harrison, 2008; Mataix Verdú 2009). Para observar más claramente las diferencias encontradas, los valores hematológicos se ajustaron al valor promedio de los controles. En las Figuras 14 y 15 se muestran los resultados de la etapa de deficiencia y en las Figuras 16 y 17 para el caso de la etapa de recuperación.

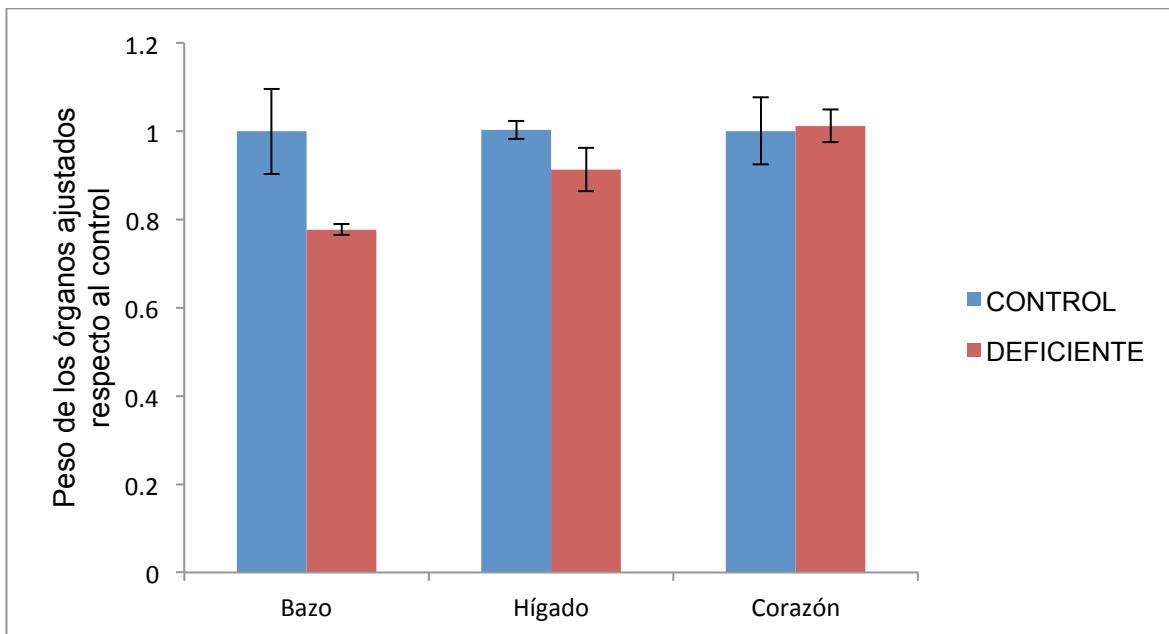


Figura 12. Comparación del peso de los órganos en el periodo de deficiencia.

Después del sacrificio los órganos fueron pesados. Los resultados se muestran en valores ajustados por pesos corporales y ajustados al control. No se observó diferencia significativa ($p>0.05$). Se muestran los valores \pm ES.

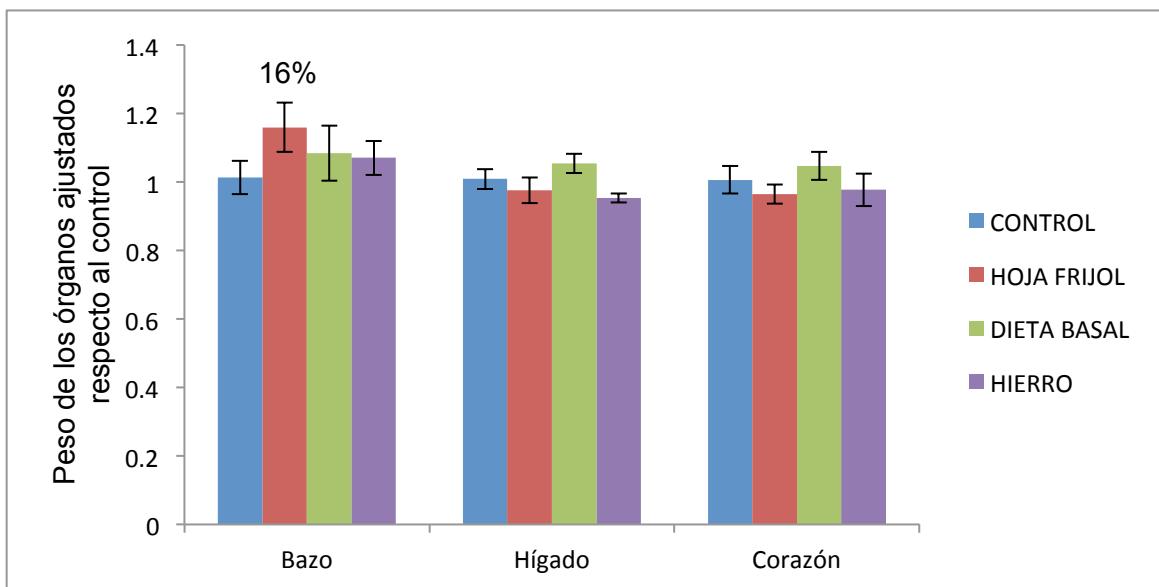


Figura 13. Comparación del peso de los órganos en el periodo de recuperación.

Después del sacrificio los órganos fueron pesados. Los resultados se muestran en valores ajustados por pesos corporales y ajustados al control. No se observó diferencia significativa ($p>0.05$). Se muestran los valores \pm ES.

Cuadro 11. Resultados obtenidos para los biomarcadores hematológicos

Deficiencia			Recuperación			
Biomarcador	Control	Deficiente	Control	HFL	DB	SF
Glóbulos blancos (K/ μ L)	2.66 \pm 0.47 &	0.88 \pm 0.06 &	5.6 \pm 0.79	7.87 \pm 0.87	6.06 \pm 1.15	4.88 \pm 0.66
Linfocitos (K/ μ L)	1.91 \pm 0.23 &	0.71 \pm 0.04 &	4.83 \pm 0.71	6.44 \pm 0.67	5.34 \pm 1.05	4.06 \pm 0.57
% linfocitos	77.15 \pm 1.14 &	82.42 \pm 1.16 &	86.07 \pm 1.10	82.74 \pm 2.82	87.22 \pm 1.05	82.75 \pm 1.39
Granulocitos (K/ μ L)	0.61 \pm 0.14 &	0.17 \pm 0.02 &	0.76 \pm 0.10 a	1.43 \pm 0.33 a	0.72 \pm 0.11 a	0.82 \pm 0.12 a
% granulocitos	22.97 \pm 1.15 &	17.57 \pm 1.16 &	13.93 \pm 1.10	17.26 \pm 2.82	12.78 \pm 1.05	17.37 \pm 1.39
Glóbulos rojos (M/ μ L)	5.71 \pm 0.60 &	3.94 \pm 0.17 &	5.78 \pm 0.55	7.19 \pm 0.25	6.33 \pm 0.29	6.01 \pm 0.43
Hematocrito (%)	33.42 \pm 3.18 &	21.99 \pm 1.08 &	33.73 \pm 3.28	39.53 \pm 1.23	35.74 \pm 1.61	33.06 \pm 2.52
VCM (fL)	58.37 \pm 0.62 &	55.62 \pm 0.47 &	58.36 \pm 0.18 b	55.06 \pm 0.72 a*	56.5 \pm 0.46 a, b	54.75 \pm 0.83 a*
HCM (pg)	22.61 \pm 0.95	22.5 \pm 0.66	21.44 \pm 0.10 b	20.35 \pm 0.27 a	20.57 \pm 0.22 a, b	20.32 \pm 0.34 a*
MCHC (g/dL)	38.79 \pm 2.04	40.4 \pm 1.06	36.75 \pm 0.17 a, b	36.97 \pm 0.13 a, b	36.41 \pm 0.12 a	37.11 \pm 0.18 b
Hemoglobina (g/dL)	13.2 \pm 0.52	8.54 \pm 0.45	12.37 \pm 1.18	14.61 \pm 0.44	13.01 \pm 0.61	12.27 \pm 0.94
Ferritina (μ dL)	42.47 \pm 6.78	22.69 \pm 1.98	44.84 \pm 4.20	26.17 \pm 4.20	30.45 \pm 3.95	37.47 \pm 6.51

& diferencia significativa por t de Student ($p\leq 0.05$). Letras minúsculas indican diferencia significativa (Tukey, $p\leq 0.05$), asteriscos indican diferencia significativa (Dunnett, $p\leq 0.05$).

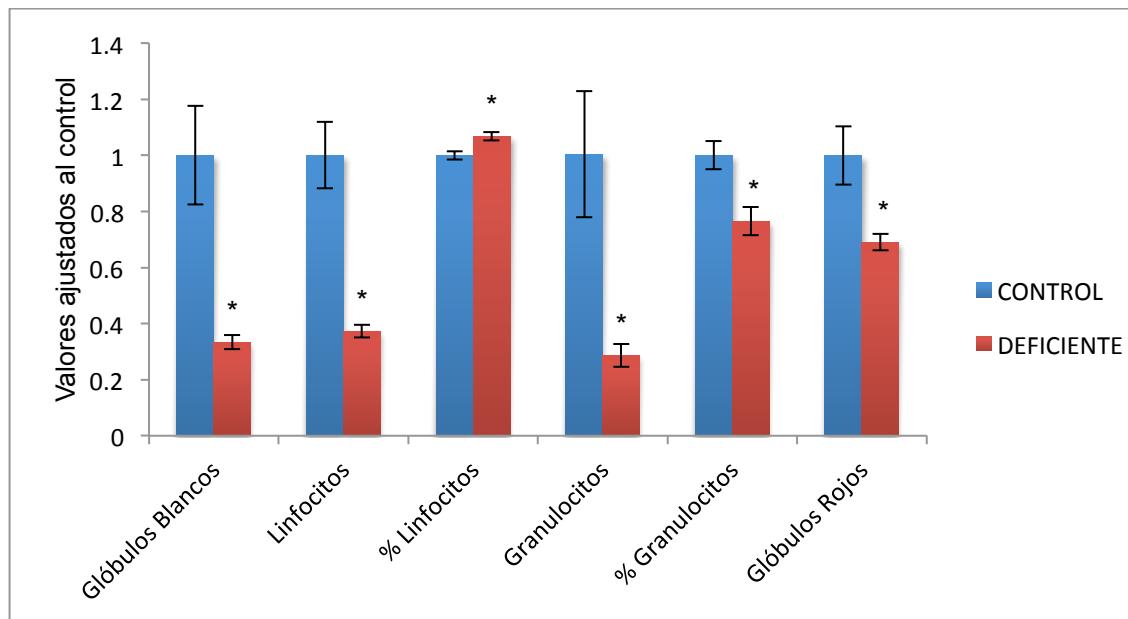


Figura 14. Comparación de poblaciones de células sanguíneas en el periodo deficiencia. Los parámetros hematológicos fueron ajustados al control. Diferencia significativa t de Student ($p \leq 0.05$) (*). Se muestran los valores \pm ES.

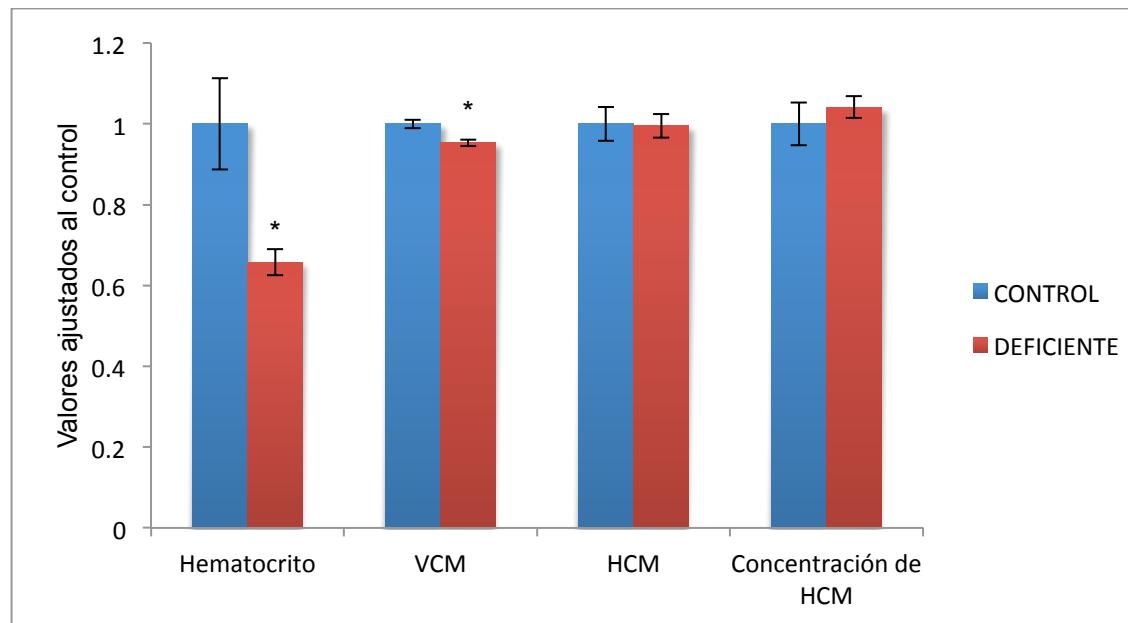


Figura 15. Comparación de marcadores sanguíneos en el periodo de deficiencia. Los parámetros hematológicos fueron ajustados al control. Diferencia significativa t de Student ($p \leq 0.05$) (*). Se muestran los valores \pm ES.

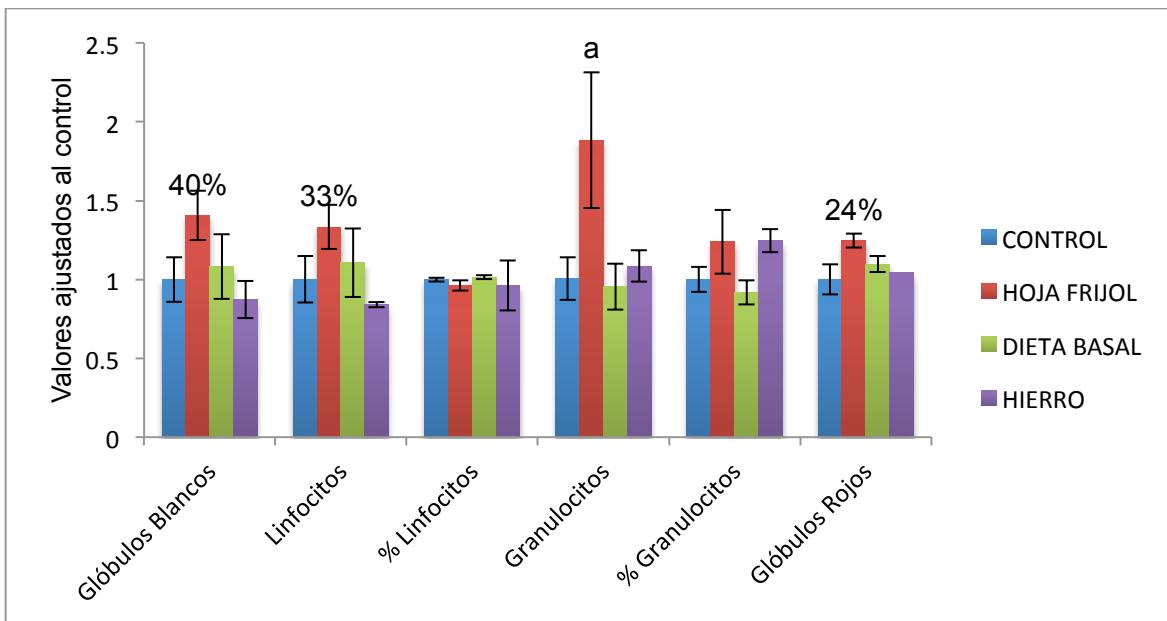


Figura 16. Comparación de poblaciones de células sanguíneas en el periodo de recuperación. Los parámetros hematológicos fueron ajustados al control. Letras minúsculas indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$). Se muestran los valores \pm ES.

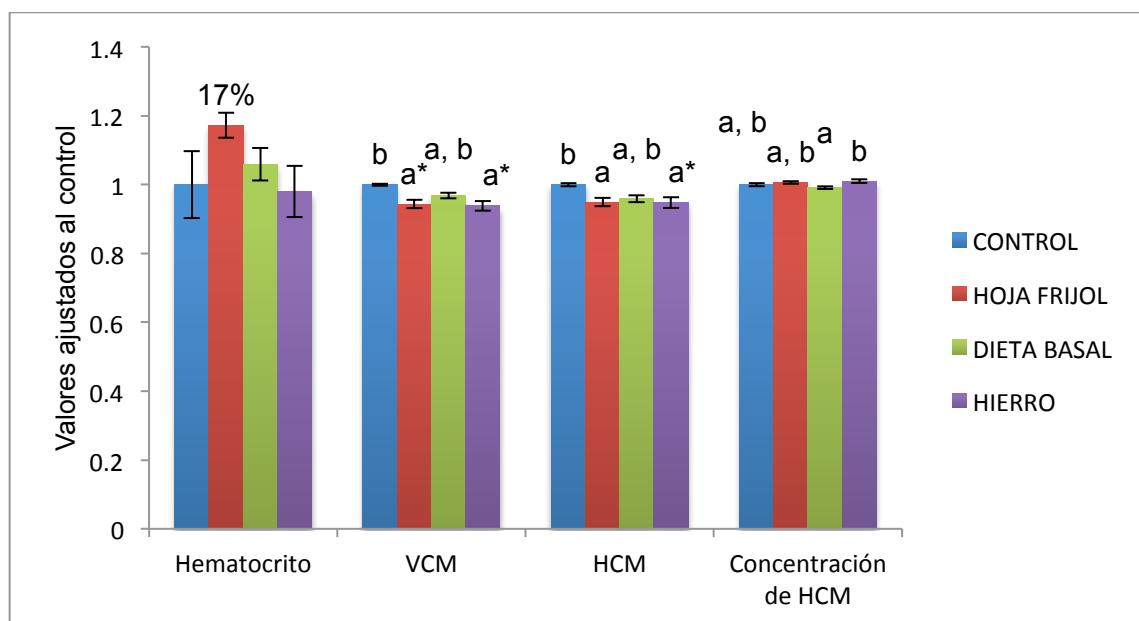


Figura 17. Comparación de marcadores sanguíneos en el periodo de recuperación. Los parámetros hematológicos fueron ajustados al control. Letras minúsculas indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$), asteriscos indican diferencia significativa (Dunnett, $p \leq 0.05$). Se muestran los valores \pm ES.

Se observó que el grupo de ratas deficientes mostraron disminución en glóbulos blancos (64%), linfocitos (62%), granulocitos (72%), porciento de granulocitos (23%), glóbulos rojos (30%), hematocrito (34%). Los valores de porciento de linfocitos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media no se vieron afectados ya que para alcanzar depleción en estos parámetros es necesario un periodo de tiempo mayor (Robins y Cotran, 1990; Harrison, 2008). Uno de los efectos principales de la deficiencia de hierro es su impacto sobre el sistema inmunológico, disminuyendo el conteo total de células blancas sin alterar sus porcentajes. Al disminuir la disponibilidad de hierro se altera inicialmente el número de células rojas y por ende el hematocrito y si la deficiencia continúa se altera su VCM, HCM y concentración de HCM. Las diferencias entre los valores de los biomarcadores en el grupo control contra el grupo depletado muestra claramente el éxito del periodo de depleción.

Para el caso de los biomarcadores hematológicos ajustados después de la fase de recuperación, el consumo de dieta suplementada con HFL mostró que en cada uno de los parámetros analizados se revertió la reducción provocada por la deficiencia en hierro y, en algunos casos, los valores superaron a los de las ratas control. De esta forma se observó un incremento del 40% para glóbulos blancos, linfocitos en más de un 33%, los granulocitos en más de un 88% ($p \leq 0.05$), el porciento de granulocitos en casi un 24%, los glóbulos rojos en más de un 24% y el hematocrito en un 17%. Las dietas de recuperación con DB o suplementación con sulfato ferroso mostraron niveles similares al control. En el caso de VCM, HCM y concentración de HCM se observaron valores similares al control pero con algunas diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

La dieta suplementada con HFL mostró valores en los parámetros hematológicos que no se observaron en los animales recuperados con DB o sulfato ferroso. Sorprende que el número de células blancas aumentara en todos los casos ya que se logró no solo la recuperación, sino un incremento importante por encima del control. El valor más importante se observó en granulocitos ya que mostraron un

88% por encima del control. Lo anterior sugiere que la hoja de frijol presenta un efecto estimulador del sistema inmune.

De forma similar, el hematocrito que se había disminuido en un 34% en el periodo de deficiencia, durante el periodo de recuperación con la dieta suplementada con HFL incrementó en un 17% por encima del grupo control. Los demás biomarcadores se mantuvieron en los niveles mostrados por el grupo control durante el periodo de recuperación.

Las Figuras 18 y 19 muestran valores ajustados para hemoglobina y ferritina después del periodo de deficiencia y de recuperación, respectivamente. Se observa que después de la fase de deficiencia la hemoglobina disminuyó en más de un 35% y la ferritina en más de un 34%. Después de la fase de recuperación, todos los grupos experimentales lograron recuperar los niveles de hemoglobina pero el mayor nivel se alcanzó con la dieta con HFL ya que logró incrementar los niveles de hemoglobina a un 18.12% por encima del control.

Lo anterior sugiere nuevamente un efecto compensatorio para aumentar la captación de hierro, en este caso aumentando el tamaño del eritrocito (hematocrito). El incremento de células del sistema inmune puede estar vinculado con una posible actividad mitogénica de componentes presentes en la hoja de frijol y al aumentar el tamaño y número de eritrocitos aumenta también la necesidad de hemoglobina.

En cuanto a los niveles de ferritina, en todos los casos se observó un aumento que no alcanzó los niveles del control. Lo anterior sugiere que el tiempo para abastecer el nivel de hierro en ferritina no fue suficiente ya que el organismo da prioridad a la recuperación de hemoglobina. La dieta con HFL fue la que mostró el menor aumento en la recuperación de ferritina sin embargo, este valor fue comparable con las demás dietas.

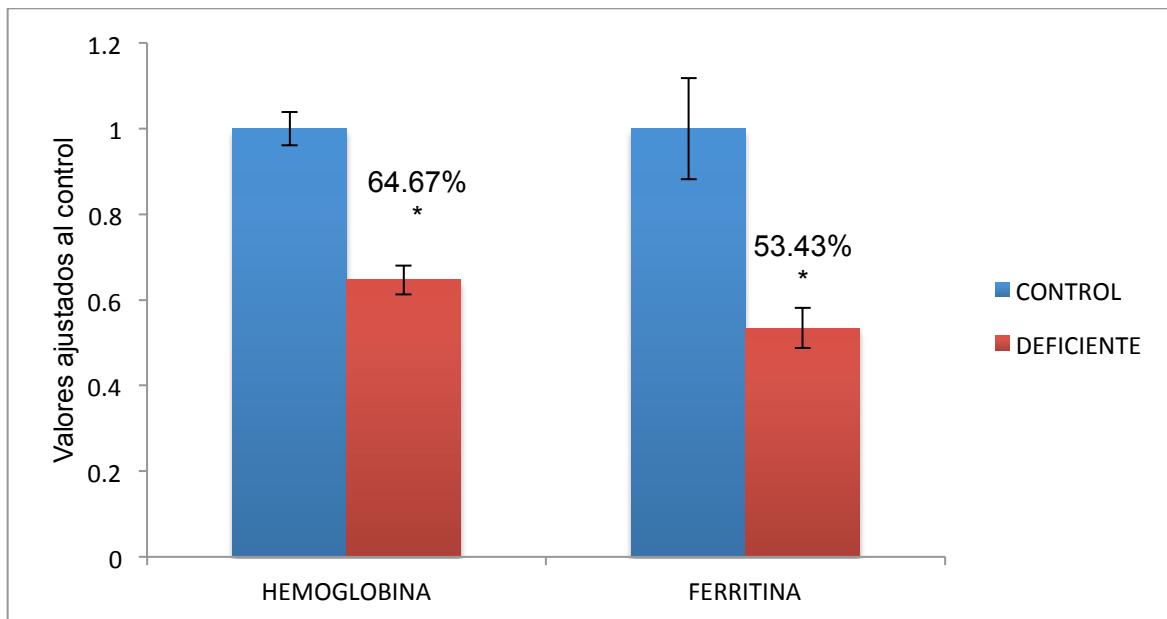


Figura 18. Comparación de hemoglobina y ferritina en el periodo de deficiencia. Los parámetros fueron ajustados al control. Diferencia significativa t de Student ($p \leq 0.05$) (*). Se muestran los valores \pm ES.

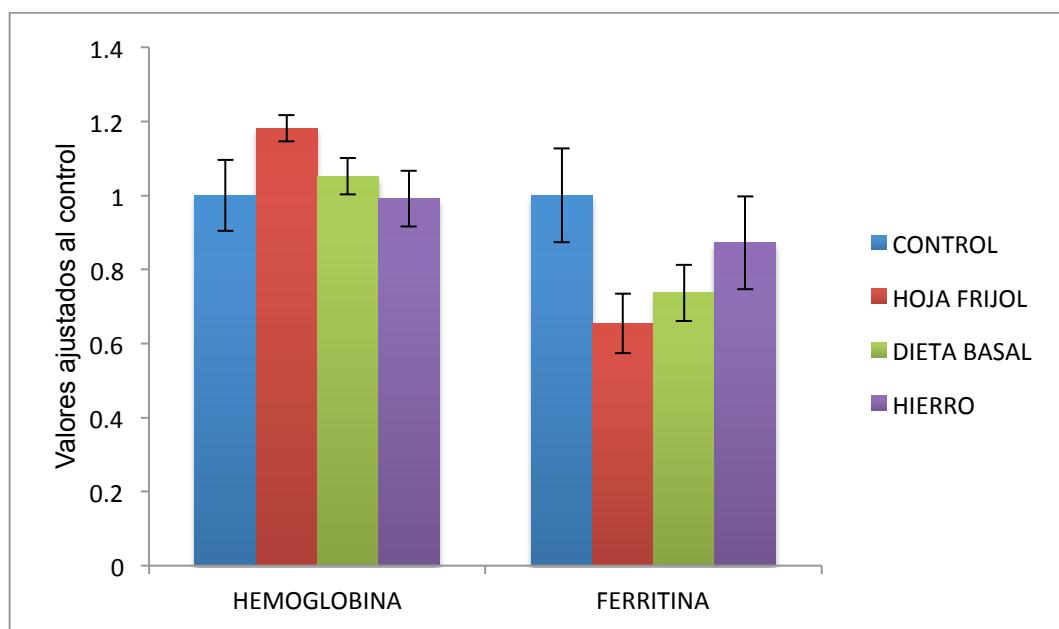


Figura 19. Comparación de hemoglobina y ferritina en el periodo de recuperación.
No se encontró diferencia entre grupos. Se muestran los valores \pm ES.

8. CONCLUSIONES

Se logró establecer el perfil nutricio de la hoja de frijol liofilizada donde el AQP mostró que el contenido de proteína cruda y de fibra es elevado ya que reporta un valor de 38.3% sobre el peso seco de la hoja de frijol. El contenido de hierro biodisponible fue mayor al esperado con un 75% del hierro total.

El contenido de factores antinutrícos se encontró dentro de los esperados para alimentos similares, particularmente el contenido de compuestos fenólicos solubles en la hoja de frijol liofilizada podría presentar un buen efecto antioxidante en el consumidor.

El efecto del consumo de la hoja de frijol liofilizada incrementó la cuenta de células del sistema inmune, probablemente debido a efectos estimuladores de la mitosis como sugiere también el crecimiento del bazo.

El hierro presente en la hoja de frijol liofilizada fue capaz de revertir los estados de deficiencia de hierro en sangre de ratas Wistar, demostrado con la recuperación de los biomarcadores hematológicos como los valores de hemoglobina, número de glóbulos rojos y hematocrito. Sin embargo, no se alcanzó a recuperar el nivel de ferritina bajo las condiciones experimentales del estudio.

Los resultados sugieren que la hoja de frijol liofilizada puede ser una alternativa de alimento empleada para ayudar a mantener los biomarcadores de hierro y revertir los estados de deficiencia de hierro.

9. PERPECTIVAS

El estudio del metabolismo del hierro actualmente es muy intenso, hay muchas líneas de investigación que tienen un enorme futuro para las personas interesadas en su estudio, como por ejemplo el efecto del consumo de hierro sobre el estrés oxidativo. Aun cuando este proyecto estuvo basado en un estudio amplio sobre la calidad nutricia y antinutricia de la hoja de frijol, siembra apenas las bases de futuras investigaciones que pueden arrojar resultados muy interesantes. La hoja de frijol *Phaseolus vulgaris* de la variedad Pinto Villa no había sido estudiada desde el punto de vista nutricio, pero los resultados obtenidos en este estudio con respecto al sistema inmune permiten iniciar con líneas de investigación relacionadas con inmunología. Estudios sobre el efecto del consumo de la hoja de frijol liofilizada sobre el estrés oxidativo en ratas sería un estudio muy interesante, ya que por la cantidad elevada de hierro presente pudiera observarse un incremento en el mismo, pero también su aporte de compuestos fenólicos podrían ayudar a regular el estrés oxidativo de las ratas y posteriormente también realizar estudios sobre el impacto en estado nutricio con el consumo de la hoja de frijol en distintas preparaciones para así hacer llegar a la mesa de los mexicanos y de la población mundial en general la hoja de frijol como una alternativa de alimento rico en hierro y con un posible efecto funcional.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Gallegos JA, Ochoa-Márquez R, Arrieta-Montiel MP, Ibarra Pérez FA, Pajarito-Ravelero A, Sánchez-Valdez I. 1995. Registration of "Pinto Villa" common bean. *Crop Science*. 35:1211.
- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *International Journal Biochemistry Cell Biol.* 33: 940–959
- Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Díaz-Castro J, Barrionuevo M, Ros PB, Campos MS. 2006. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anemia in comparison with cow milk. *International Dairy Journal* 16: 813-21
- Alferez M, Díaz-castro J, Lopéz-Aliaga I, Rodríguez Ferrer M, Pérez-Sánchez J, Campos M. 2010. Development of nutritional iron deficiency in growing male rats: hematological parameters, iron bioavailability and oxidative defense. *British Journal of Nutrition* 105: 517-525
- Andrews NC. 1999. Disorders of iron metabolism. *New England Journal Medical* 341:1986–1995
- Andrews NC. 2008. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 112: 219–230.
- Antoniades C, Tousoulis D, Tentolouris C, Toutouzas P, Stefanadis C. 2003. Oxidative Stress, Antioxidant Vitamins, and Atherosclerosis. From Basic Research to Clinical Practice. *Herz*. 28(7): 628–38.
- AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 930.15
- AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 942.05

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 962.09.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 920.39

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 2001.11

Aparicio-Fernández X, García-Gasca T, Yousef GG, Lila MA, González de Mejía E, Loarca-Piña G. 2006. Chemopreventive Activity of Polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2116-2122.

Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790: 589–599

Ayala-Vela J, Guía-González M, Espinosa-Huerta E, Acosta-Gallegos J, Guzmán-Maldonado S, Mora-Avilés M. 2008. Iron content and ferritin gene expression in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica en México*. 34: 481-489.

Banner W Jr., Tong TG. 1986. Iron poisoning. *Pediatric Clinic of North America*. 33: 393-409

Barton JC. 2003. A brief history of hemochromatosis. In: Edward CQ, Barton JC, eds. *Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis, and treatment*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. pp 3-7.

Benninger CW, Hosfield GL. 2003. Antioxidant activity of extracs, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 7879-7883

Bernal-Lugo I, Prado G, Parra C, Moreno E, Ramírez J, Velazco O. 1990. Phytic acid hydrolysis and vean susceptibility to store induced hardening. *Journal of Food Biochemistry*. 14: 253-261

Bolivar A, Luis C.Z. 2010. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*. 119: 1485–1490.

Bothwell TH, Seftel H, Jacobs P, Torrance JD, Baumslag M. 1964. Iron overload in Bantu subjects: studies on the availability of iron in Bantu beer. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 14: 47-51

Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, Finch CA. 1979. Iron metabolism in man. Oxford, England. Blackwell Scientific. p 7.

Bottomley S. 1982. Sideroblastic anemia. *Clinical Heamatology* 11: 389-409

Bourdon I, Olson B, Backus R, Richer BD, Davis PA, Schneeman BO. 2001. Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meals in men. *Journal of Nutrition*. 131: 1485-1490.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254

Bravo L. 1998. Poliphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56(11): 317-333

Bressani R, Blanco A. 1991. Biodisponibilidad de aminoácidos en frijol (*Phaseolus vulgaris*). Instituto de Nutrición del Centro de América y Panamá (INCAP). 41: 39-51.

Breuer W, Shvartsman M, Cabantchik ZI. 2008. Intracellular labile iron. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40: 350–354.

Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW. 1994. Iron metabolism in health and disease. London: WB Saunders Company Ltd.; 1997, pp 189-225.

Caimi G, Carollo C, Lo Presti R. Diabetes Mellitus: Oxidative Stress and Wine. Current Medical Research & Opinion 2003;19(7): 581–6.

Campuzano-Maya G. 1996. Cómo llegar al diagnóstico etiológico del paciente con anemia. Anales de la Academia de Medicina de Medellín. 9: 29-36

Campuzano-Maya G. 2007. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. Medicina & Laboratorio. 13: 511-550

Campuzano-Maya G. 2010. Educación en prevención y promoción de la salud. Anemia, un signo no una enfermedad. Laboratorio Clínico Hematológico. EDIMECO, S.A. 5º edición, Medellín, Colombia. pp 1-5.

Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD 1988. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. Science 240: 924-8

Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, López-Martínez J, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2007. Efecto Antiproliferativo *In Vitro* de una Lectina De Frijol Tépari sobre Diferentes Tipos de Cáncer Humano. RESPYN Edición especial No. 7-2007 <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

Ceciliani F, Tava A, Iori R, Mortarino M, Odoardi M, Ronchi S. 1997. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. Phytochemistry 44 (3):393-398.

Chen TT, Li L, Chung DH, Allen CD, Torti SV, Torti FM, Cyster JG, Chen CY, Brodsky FM, Niemi EC, Nakamura MC, Seaman WE, Daws MR. 2005. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. The of Journal Experimental Medicine 202: 955–965.

Chrispeels MJ, Raikhel NV. 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *The Plant Cell* 3: 1-9.

Commission on the Nutrition Challenges of the 21st Century Ending. 2000. Malnutrition by 2020: an agenda for change in the millennium. Final report to the ACC/SCN. *Food & Nutrition Bulletin*. 21: 3-88

Dallman PR. 1974. Tissue effects of iron deficiency. In: Jacobs A, Worwood M, eds. *Iron in biochemistry and medicine*. London: Academic Press. pp 473-75

Dallman PR. 1986. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annual Review of Nutrition* 6: 13-40

Darshan D, Vanoaica L, Richman L, Beermann F, Kuhn LC. 2009. Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. *Hepatology* 50: 852-860

De Domenico I, Vaughn MB, Li L, Bagley D, Musci G, Ward DM, Kaplan J. 2006. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes Ferritin degradation by the proteasome. *The EMBO Journal*. 25: 5396-5404

De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. 2008. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Natural Reviews Molecular Cell Biology* 9:72-81.

De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. 2009. Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood* 114: 4546-4551

De Valk B, Marx JJM. Iron, Atherosclerosis, and Ischemic Heart Disease. *Archives of Internal Medicine* 1999;159: 1542-8.

DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. 1985. The prevalence of anaemia in the world. *World Health Stat Q* 38: 302-316

Deshpande SS, Shate SK, Salunkhe DK y Cornforth DP. 1982. Effect of dehulling on phytic acid, polyphenols and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). The Journal Food Science.47: 1846-1849.

Deshpande SS, Cheryan M. 1984. Preparation and antinutritional characteristics of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates. Plant Foods for Human Nutrition. 34: 185.

Deshpande SS, Cheryan M. 1985 Evaluation of Vainillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. Journal Food Science. 50: 905-910

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. 2005. The iron exporter ferroportin/SIc40a1 is essential for iron homeostasis. Cell Metabolism. 1: 191–200.

Durackova Z, Bergendi L, Liptakova A, Muchova J. 1993. Free Radicals Derived from Oxygen and Medicine. Bratislava Medical Journal. 94(8): 419–434.

Edwards CQ, Griffen LM, Coldgar D. 1988. The prevalence on hemochromatosis among 11, 065 presumably healthy blood donors. New England Journal Medical. 318: 1355-62

Elias LD, de Fernández GD, Bressani R. 1979. Possible effects of seed coat polyphenols on the nutritional quality of vean protein. Journal Food Science. 44: 524-527

Emerit J, Beaumont C, Trivin F. 2001. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. Biomedical Pharmacotherapy Journal 55: 333-339.

ENSANUT. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición www.insp.mx/ensanut

Epsztejn S, Glickstein H, Picard V, Slotki IN, Breuer W, Beaumont C, Cabantchik ZI. 1999. H-Ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. Blood 94: 3593–3603

Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95: 271-278.

Fang EF, Lin P, Wong JH, Tsao SW, Ng TB. 2010. A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Extralong Autumn purple bean. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2221–2229.

Feder JN, Gnarke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo Jr. R, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb BD, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang TE, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genetics Journal*. 13: 399-408.

Ferreira C, Buccini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, Beaumont C. 2000. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *The Journal Biological Chemistry*. 275: 3021–3024

Finch CA, Lenfant C. 1972. Oxygen transport in men. *New England Journal Medical* 286: 407-410

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 2004. Dietary reference intakes of arsenic, boron, calcium, chromium, cooper, fluoride, iodine, iron, magnesium, manganese, molybdenum, nickel, phosphorus, selenium, silicon, vanadium and zinc. Washington, D.C.: National Academy Press. 290-393

Freed D. 1999. Do dietary lectins cause disease? *British Medical Journal*. 318: 1023-1024.

Galaris D, Pantopoulos K. 2008. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sci.* 45: 1–23

Gao TH, Chen BH. 2006. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54: 7544–7455.

Gao Y, Shang C, Saghaf Maroof MA, Biyashev RM, Grabau EA, Kwanyuen P, Burton JW, Buss GR. 2007. A Modified Colorimetric Method for Phytic Acid Analysis in Soybean. Published in *Crop Science.* 47: 1797–1803.

García-Gasca T, Salazar Olivo LA, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A. 2002. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology In vitro:* 16: 229-233

Gupta YP. 1987. Antinutritional and toxic factors in food legumes: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 37: 201-217.

Gutiérrez D, Mendoza S, Serrano V, Bah M, Pelz R, Balderas P, León F. 2008. Proximate composition, mineral content, and antioxidant properties of 14 Mexican weeds used as fodder. *Weed Biology and Management* 8(4): 291-296.

Haidari M, Javadi E, Sanati A, Hajilooi M, Ghanbili J. 2001. Association of Increased Ferritin with Premature Coronary Stenosis in Men. *Clinical Chemistry.* 47(9): 1666–72.

Hallberg L. 1981. Bioavailability of iron in man. *Annual Reviews of Nutrition.* 1: 123-47

Halliday JW, Ramm GA, Powell LW. 1994. The cellular iron processing and storage: the role of ferritin. In: *Iron metabolism in health and disease.* Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW eds. WB Saunders Company LTD, London. p 97.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in humans disease: an overview. *Methods in Enzymology*. 186:1-85

Hargreaves RM, Street M, Hoy T. 1981. Myoglobin depletion in childhood iron deficiency. *British Journal Haematology*, 47: 399-401

Harrison L. 2008 Principios de medicina interna. Editorial McGraw Hill-Interamericana, 17º edición. México, D.F. Volumen 1 pp 379-525

Haug W, Lantzsch HJ. 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal Science of Food Agriculture*. 34: 1423-1426.

Hayashi H, Yano M. 2002. Iron Cytotoxicity in Chronic Hepatitis C. *Journal Health Science*. 48(3):227-31.

Heath CW, Strauss MB, Castle WB. 1932. Quantitative aspects of iron deficiency in hypochromic anemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 11:91-110

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. 2010. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 142:24-38.

Hídvégi M, Lásztity R. 2002. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. *Periodica polytechnica Chemical Engineering* 46: 59-64.

<http://pubpages.unh.edu/~ndc/> Última consulta junio 10, 2012

<http://ciencia.medtropoli.net/2011/04/11/la-hemoglobina-un-reto-a-la-nanotecnologia/>

<http://www.enotes.com/topic/Myoglobin>

<http://www.nap.edu/catalog/11763.html>. Última consulta 16 de Abril del 2011

<http://www.oocities.org/pelabzen/hemoglob.html>

<http://www2.potsdam.edu/bouabdf/research%20interests.html> Última consulta junio 10, 2012

<http://www.nap.edu/catalog/11763.html>. Última consulta 20 de abril, 2011

http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin_es.pdf. Última consulta, 21 de abril, 2011

Huang ZL, Wang BW, Eaves DH, Shikany JM, Pace RD. 2007. Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chemistry* 103: 1395–1402.

Huebers HA, Finch CA. 1987. The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiological Reviews* 67: 520-81

INE. Instituto Nacional de Ecología, México. <http://www.ine.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales#arriba>. Última consulta 2 de Septiembre, 2012.

Iniesta-Gonzalez J, Ibarra-Pérez F, Gallegos-Infante J, Rocha-Guzman N, González-Laredo R. 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 39: 603-610

Iyengar GV, Nair PP. 2000. Global outlook on nutrition and the environment: meeting the challenges of the next millennium. *Science Total Environment Journal* 249: 331-346

Jaffé W. 1980. Hemaglutinins (lectins). In: *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press. New York, NY, EU. pp 73-102.

Jain SK, Yip R, Dallaman PR, Shohet SB. 1982. Reduced lecithin-cholesterol acyltransferase in iron deficient rats. *Journal of Nutrition* 112:1230-2.

Jimenez-Cervantes C, Martnez-Esparza M, Perez C, Daum N, Solano F, Garca-Borron JC. 2001. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *Journal of Cell Science*. 114:2335–2344.

Jin L, Xue HY, Jin, LJ, Li SY, Xu YP. 2008. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur. Journal of Pharmacology*. 582:162–167

Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, Viswanath V, Jacobs R, Yang L, Beal MF. et al. 2003. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 37:899–909.

Kell DB. 2009. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Medical Genomics* 2. Art. 2 <http://www.biomedcentral.com/1755-8794/2/2/>

Knuckles BE, Kuzmicky DD, Betschart AA. 1985. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on in vitro protein digestibility. *Journal of Food Science*. 50: 1080.

Koppenol WH. 1993. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine*. 15: 645–651

Krajčovičová-Kudláčková M, Spustová V, Pauková V. 2004. Lipid Peroxidation and Nutrition. *Physiological Research*. 53: 219–24.

Lebovitz HE. 1998. Postprandial hyperglycemic state: Importance and consequences. *Diabetes Research and Clinical Practice* 40: S27–S28.

Lee P, Beutler E. 2009. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. Annual Reviews of Pathology. 4. 489-515.

Levi S, Cozzi A, Arosio P. 2005. Neuroferritinopathy: a neurodegenerative disorder associated with L-ferritin mutation. Best Practice & Research Clinical Haematology 18: 265–276

Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC, 1999. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. Nature Genetics 21: 396-399.

Li GH, Wan JZ, Le GW, Shi YH. 2006. Novel angiotensin I -converting enzyme inhibition peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein. Journal of Peptide Science 12: 509–514.

Lombardi-Boccia G, Martínez-Dominguez B, Aguzzi A. 2002. Total heme and no heme iron in raw and cooked meats. Journal of Foods Science 67: 1738-41

Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. 1997. Prevalence of iron deficiency in the United States. Division of Health Examination Statistics, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, Hyattsville, Md 20782, USA. JAMA 277(12): 973-6.

Lopez HW, Leenhardt F, Coudray C, Remesy C. 2002. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? International Journal of Food Science & Technology 37: 727-739.

Macías de Costa S, Montenegro M, Arreguill T, Sánchez de Pintol M, Nazarenol M, López de Mishimal B, 2003. Characterization of fresh beta vulgaris from Santiago del Estero (Argentina). Nutrient and carotenoid content of stem and leaves. Ciência e Tecnologia de Alimentos vol.23 no.1: 33-37

Mackay HM. 1928. Anemia in infancy: prevalence and prevention. Archives of Disease in Childhood 3: 117-46

Maier G, Fiebig H. 2002. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. *Anti-Cancer Drugs.* 13: 373-379

Manual para Phen Green™ SK, Diacetate, Life Technologies Corporation, 2012. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/g002.pdf>. Última consulta, Septiembre 19, 2012.

<http://probes.invitrogen.com/media/msds/14313.html> Última consulta, Septiembre 19, 2012.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. 2003. Effect of alpha lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotoc in-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 14: 288-294.

Mataix Verdú J. 2009. *Tratado de Nutrición y alimentación*, Editorial Oceano-Ergon, 1º edición. México, D.F. pp 285-291, 1041, 1226, 1678-1688

McCollum EV. 1957. *A history of nutrition*. Boston: Houghton Mifflin. pp 334-58

Melhorn DK, Gross S. 1971. Vitamin E dependent anemia in the pre-term infants. I. Effects of large doses of medicinal iron. *Journal of Pediatrics* 79: 569-80.

Messina MJ. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70:439-450.

Mialonier G, Privat JP, Monsigny M, Kahlen G, Durand R. 1973. *Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects*. *Physiologie Vegetale.* 11:519-37

Miwa N, Akiba T, Kimata N, Hamaguchi Y, Arakawa Y, Tamura T, Nitta K, Tsuchiya K. 2010 Usefulness of measuring reticulocyte hemoglobin equivalent in the management of haemodialysis patients with iron deficiency. *International Journal of Laboratory Hematology* 32(2):248-55.

Mortimer C .1999. Química. Editorial Iberoamericana. 2º edición. México, D.F. pp 596

Nemeth E. and Ganz T. 2009. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Hematologic* 122, 78-86.

Ning-Sing S, Hui-Liu Y. 2000. Bioavailability of iron of purple laver, (*Porphyra spp.*) estimated in rat hemoglobin regeneration bioassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1734-1737

Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

<http://bibliotecas.salud.gob.mx/gsdl/collect/nomssa/index/assoc/HASH01c6.dir/doc.pdf>.

Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.

<http://www.issste-cmn20n.gob.mx/datos/Normas/NOM-131-SSA1-1995.pdf>.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica). 2008. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>.

Nuttall SL, Dunne F, Kendall MJ, Martin U. 1999. Age independent oxidative stress in elderly patients with NIDDM. *Oxford Journal Medical* 92: 33-8.

Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD. 2005. Identification of a ferrireductase

required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature Genetics* 37: 1264–1269

Olsson KS, Norrby A. 2008 Comment to: Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologic* 2008; 93:90–7. *Haematologic* 93:e51

Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. 2001. Ferritin and the Response to Oxidative Stress. *Biochememestry Journal* 357: 241–7.

Peng XF, Zheng ZP, Cheng KW, Shan F, Ren GX, Chen F, Wang MF. 2008. Inhibition effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *The Journal of Food Chemestry* 106: 475-481.

Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. 2002. The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *The Journal of Biological Chemistry* 383: 489–502

Pippard MJ. 1994. Secondary iron overload. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell MW, eds. *Iron metabolism in health and disease*. London: WB Saunders. pp 272-309

Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Seminars in Hematology* 35: 35–54

Powell LW, Jazwinska E, Halliday JW. 1994. Primary iron overload. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW. Eds. *Iron metabolism in health and disease*. London: WS Saunders. pp 227-70.

Pueppke SG, Bauer WD. 1978. Role of lectin in plant microorganism interactions II. Distribution of soybean lectin in tissues of glycine max (L) Merr. *Journal of Plant Physiology* 61: 779-784

Puls W, Keup U, Krause HP, Thomas G, Hofmeister F. 1977. Glucosidase inhibition: A new approach to the treatment of diabetes, obesity, and hyperlipoproteinaemia. *Naturwissenschaften The Science of nature* 64: 536–537.

Randhir R, Shetty K. 2007. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8:197–204.

Rauen U, Springer A, Weisheit D, Petrat F, Korth HG, de Groot H, Sustmann R. 2007. Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities. *ChemBiochem Journal* 8: 341–352.

Reddy MB, Cook JD. 1997. Effect of calcium intake on nonheme iron absorption from a complete diet. *The American Journal of Clinical Nutrition* 65: 1820-5

Reyes Fernandez P. 2008. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de harina de frijol cocido y evaluación de su efecto citotóxico en células de cáncer de mama. Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. pp 37-39

Reyes-Moreno C, Paredes-López. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common bean. A review. CRC. Crit. Rev. In: *Food Science Nutrition* 33(3): 227-286.

Richardson DR, Lane DJ, Becker EM, Huang ML, Whitnall M, Rahmanto YS, Sheftel AD, Ponka P. 2010. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 107: 10775–10782

Roach J, Benyon S. 2004. Lo esencial en metabolismo y Nutrición. Editorial Elsevier. 2º edición. México, D.F. pp 174-200

Robins S, Cotran R. 1990. Patología Estructural y Funcional. Editorial Interamericana. 2º edición. México, D.F. pp 664-686

Sayed NE, Gad A, Nofal L, Netti G. 1999. Assessment of the prevalence and potential determinants of nutritional anemia in Upper Egypt. *Food and Nutrition Bulletin* 20:417-421

Schwartz GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1955 16(4):570-5.

Sheldon HH. 1935. *Haemochromatosis*. London: Oxford University Press. pp 164-340

Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. 2008. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 320: 1207–1210

Shiino M, Watanabe Y, Umezawa K. 2001. Synthesis of N-substituted N-nitrosohydroxylamines as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9: 1233–1240.

Silva Trejos P. 2009. Evaluación del contenido de hierro total en alimentos de la canasta básica de consumo de los costarricenses. *Tecnología en Marcha*, 22(2): 98-106.

Singleton SL, Rossi JA. 1965 Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *The American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158

Skikine B, Baynes RD. 1994. Iron absorption. En: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW, eds. *Iron metabolism in health and disease*. London: WB Saunders. pp 340-356.

Sozmen B, Uysal F, Gazitepe D, Aslan L, Sozmen EY. 1999. A Novel Clinical and Laboratory Based Approach to Coronary Heart Disease: Relationship Between Angiography Findings, Antioxidant Enzymes and NO. *Turkish Journal of Medical Science* 29:117–23.

Swain JH, Luhby LA, Reddy MB. 2002. Histidine content of low molecular weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cell. *The Journal of Nutrition*. 135: 245-51

Takagi H, Shi D, Ha Y, Allewell NM, Theil EC. 1998. Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. A mechanism for iron release? *The Journal of Biological Chemistry* 273:18685–18688

Troll, W., Wiesner, R., Frenkel, K. 1987. Anticarcinogenic action of protease inhibitors. *Advances in Cancer Research* 49:265-283.

Turner RH, Liener IE. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry* 68:651-653.

Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schumann K, Kuhn LC. 2010. Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metabolism* 12:273–282.

Voet D, Voet J. 2006. Bioquímica. Editorial Médica Panamericana, 3ra edición. México, D.F. pp 191, 333, 335, 345, 353, 354, 393, 840, 929, 938, 1058, 1060.

Wang J, Pantopoulos K. 2011. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemistry Journal*. 434: 365-381.

Whistler RL, Daniel JR. 1985. Carbohydrates. In: *Food Chemistry*. Second Edition. Owen R, Fennema (ed). Marcel Dekker. pp 69-137.

WHO, World Health Organization 2001. Iron deficiency anemia: Assessment, prevention and control. A guide for programme managers. WHO/NHD/01.3. http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf. Última consulta 21 de Junio de 2012

WHO. World Health Organization 2012. Micronutrient Deficiencies. Iron Deficiency Anemia. <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/index.html>. Última consulta 18 de Junio de 2012.

Yao Y, Ren G, Wang JS, Chen F, Wang MF. 2008. Antidiabetic of mung bean extracts in diabetic KK-Ay mice. *J. Agric. Food Chem.* 56: 8869–8873.

Yao Y, Cheng X, Wang L, Wang S, Ren G. 2011. Biological Potential of Sixteen Legumes in China. *Journal of Aromatic and Molecular Science* 12: 7048-7058.

Yeh KY, Yeh M, Mims L, Glass J. 2009. Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium. *The American Journal of Physiology Gastrointestinal and liver physiology* 296: G55–G65.

Yip R. 1995. Toxicity of essential and beneficial metal iron. In: Berthon G, ed. *Handbook on metal ligands interactions of biological fluid*. New York, Marcel Dekker. pp 689-95

Yip R, Mohandas N, Jain SK. 1982. Red cell deformability in iron deficiency. In: Saltman P, Hegenauer J, eds. *The biochemistry and physiology of iron*. Amsterdan: Elsevier. pp 617-9

Zhang Y, Mikhael M, Xu D, Li Y, Soe-Lin S, Ning B, Li W, Nie G, Zhao Y, Ponka P. 2010. Lysosomal proteolysis is the primary degradation pathway for cytosolic ferritin and cytosolic ferritin degradation is necessary for iron exit. *Antioxid. Redox Signaling* 13:999–1009

Zhou JR, Erdman JW Jr. 1995. Phytic acid in health and disease. *C.R.C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35:495-508.

Zlotkin S. 2001. Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74: 791-5

11. ANEXOS

Análisis estadístico para ganancia de peso entre grupos periodo de deficiencia.

Prueba de muestras independientes									
	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						95% Intervalo de confianza para la diferencia
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error t.p. de la diferencia	Inferior	Superior
Dia0	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1.884	.178	.070	.37	.945	.50260	7.20179	-14.08962 15.09481
Dia5	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1.584	.216	1.340	37	.188	9.35877	6.98547	-4.79514 23.51267
Dia11	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	2.212	.145	.581	37	.565	4.04805	6.96957	-10.07363 18.16973
				.690	27.455	.496	4.04805	5.86773	-7.98221 16.07832

Análisis estadístico para ganancia de peso entre grupos en el periodo de recuperación.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Dia18	Inter-grupos	509.973	3	169.991	.351	.789
	Intra-grupos	13079.686	27	484.433		
	Total	13589.659	30			
Dia25	Inter-grupos	206.294	3	68.765	.130	.942
	Intra-grupos	14307.641	27	529.913		
	Total	14513.935	30			

Análisis estadístico para consumo de alimentos entre grupos en el periodo de deficiencia.

Prueba de muestras independientes									
	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						95% Intervalo de confianza para la diferencia
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error t.p. de la diferencia	Inferior	Superior
ConsDia5	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1.937	.172	3.793	.38	.001	16.16301	4.26176	7.53552 24.79050
				4.862	32.349	.000	16.16301	3.32433	9.39442 22.93159
ConsDia11	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	4.509	.040	3.980	.38	.000	15.65400	3.93324	7.69157 23.61642
				3.328	13.546	.005	15.65400	4.70348	5.53422 25.77377

Análisis estadístico para consumo de alimentos entre grupos en el periodo de recuperación.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ConsDia18	Inter-grupos	4915.709	3	1638.570	11.110	.000
	Intra-grupos	4129.482	28	147.482		
	Total	9045.191	31			
ConsDia25	Inter-grupos	7441.034	3	2480.345	14.303	.000
	Intra-grupos	4855.589	28	173.414		
	Total	12296.623	31			

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) GpuAlimTx	(J) GpuAlimTx	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
ConsDia18	3.00	1.00	-34.73214*	6.28522	.000	-50.2750	-19.1893
	4.00	1.00	-17.23214*	6.12010	.023	-32.3667	-2.0976
	5.00	1.00	-26.23214*	6.28522	.001	-41.7750	-10.6893
ConsDia25	3.00	1.00	-27.30357*	6.81543	.001	-44.1576	-10.4495
	4.00	1.00	7.82143	6.63639	.501	-8.5899	24.2327
	5.00	1.00	-23.67857*	6.81543	.005	-40.5326	-6.8245

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

ConsDia18

GpuAlimTx	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
3.00	8	90.1250		
5.00	8	98.6250	98.6250	
4.00	9		107.6250	
1.00	7			124.8571
Sig.		.513	.465	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.937.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ConsDia25

GpuAlimTx	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3.00	8	90.1250	
5.00	8		93.7500
1.00	7		
4.00	9		117.4286
Sig.			.642

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.937.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Análisis estadístico para el peso promedio de los órganos y biomarcadores sanguíneos en el periodo de deficiencia

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	Inferior	Superior
BazoReal	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	11.818	.014	1.784	6	.125	.15975	.08956	-.05940	.37890
HigReal	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	13.607	.010	1.525	6	.178	.73800	.48407	-.44647	.192247
CorazReal	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales		.011	.919	-3.383	6	.715	-.03625	.09467	-.26791
HGBProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales		.031	.867	6.785	6	.001	4.66250	.68720	2.98099
Ferritina	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales		6.527	.043	3.654	6	.011	19.77250	5.41145	6.53116
WBCProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales			3.627	3.746	6	.010	1.77500	.47379	.61567
LymProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				3.746	3.118	.031	1.77500	.47379	.29890
PorcLymProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				5.201	6	.002	1.20000	.23071	.63546
GranProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				5.201	3.212	.012	1.20000	.23071	.49249
PorcGranProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				5.999	6	.016	5.40000	1.63146	1.40796
RBCProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				5.999	5.310	.016	5.40000	1.63146	1.40783
HCTProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				2.842	6	.029	1.76375	.62055	.24531
MCVProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				2.842	3.310	.055	1.76375	.62055	-.06959
MCHProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				2.914	6	.027	11.43750	3.92566	1.83176
MCHCProm	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales				2.914	3.490	.051	11.43750	3.92566	-.11927
										21.04324
										4.66827
										4.70299
										2.93591
										3.02112
										4.02633
										4.50933

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia		
	F	Sig.						Inferior	Superior
BazoRecAj	Se han asumido varianzas iguales	5.996	.050	2.290	6	.062	.22270	.09725	-.01525 .46065
	No se han asumido varianzas iguales			2.290	3.095	.103	.22270	.09725	-.08146 .52686
HigRecAj	Se han asumido varianzas iguales	1.693	.241	1.673	6	.145	.08928	.05336	-.04128 .21985
	No se han asumido varianzas iguales			1.673	3.971	.170	.08928	.05336	-.05929 .23786
CorazRecAj	Se han asumido varianzas iguales	1.211	.313	-.137	6	.895	-.01162	.08461	-.21866 .19543
	No se han asumido varianzas iguales			-.137	4.390	.897	-.01162	.08461	-.23854 .21531
HbAjCont	Se han asumido varianzas iguales	.031	.867	6.785	6	.001	.35322	.05206	.22583 .48061
	No se han asumido varianzas iguales			6.785	5.876	.001	.35322	.05206	.22518 .48126
FerrAjCont	Se han asumido varianzas iguales	6.527	.043	3.654	6	.011	.46556	.12742	.15378 .77734
	No se han asumido varianzas iguales			3.654	3.904	.023	.46556	.12742	.10832 .82280
WBCAjCont	Se han asumido varianzas iguales	3.627	.106	3.746	6	.010	.66729	.17812	.23146 1.10313
	No se han asumido varianzas iguales			3.746	3.118	.031	.66729	.17812	.11237 1.22222
LinfAjCont	Se han asumido varianzas iguales	3.226	.123	5.201	6	.002	.62827	.12079	.33270 .92384
	No se han asumido varianzas iguales			5.201	3.212	.012	.62827	.12079	.25785 .99870
LinfPromAjCont	Se han asumido varianzas iguales	.038	.851	-3.238	6	.018	-.06837	.02112	-.12005 -.01670
	No se han asumido varianzas iguales			-3.238	5.999	.018	-.06837	.02112	-.12005 -.01670
GranAjCont	Se han asumido varianzas iguales	3.728	.102	3.130	6	.020	.71721	.22911	.15661 1.27781
	No se han asumido varianzas iguales			3.130	3.198	.048	.71721	.22911	.01300 1.42143
GranPromAjCont	Se han asumido varianzas iguales	.030	.869	3.310	6	.016	.23509	.07103	.06130 .40888
	No se han asumido varianzas iguales			3.310	5.999	.016	.23509	.07103	.06129 .40889
RBCAjCont	Se han asumido varianzas iguales	2.099	.198	2.842	6	.029	.30889	.10868	.04296 .57481
	No se han asumido varianzas iguales			2.842	3.464	.055	.30889	.10868	-.01219 62996
HtcAjCont	Se han asumido varianzas iguales	1.739	.235	2.914	6	.027	.34224	.11746	.05481 .62966
	No se han asumido varianzas iguales			2.914	3.490	.051	.34224	.11746	-.00357 68804
MVCAjCont	Se han asumido varianzas iguales	.174	.691	3.508	6	.013	.04711	.01343	.01425 .07998
	No se han asumido varianzas iguales			3.508	5.589	.014	.04711	.01343	.01365 .08057
MCHAjCont	Se han asumido varianzas iguales	.407	.547	.097	6	.926	.00498	.05103	-.11990 .12985
	No se han asumido varianzas iguales			.097	5.350	.926	.00498	.05103	-.12367 .13362
MHCHAjCont	Se han asumido varianzas iguales	1.389	.283	-.700	6	.510	-.04157	.05941	-.18694 .10380
	No se han asumido varianzas iguales			-.700	4.512	.519	-.04157	.05941	-.19939 .11625

Análisis estadístico para el peso de los órganos y biomarcadores sanguíneos en el periodo de recuperación

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
BazoReal	Inter-grupos	.028	3	.009	.518	.674
	Intra-grupos	.489	27	.018		
	Total	.517	30			
HigReal	Inter-grupos	3.347	3	1.116	.862	.473
	Intra-grupos	34.930	27	1.294		
	Total	38.277	30			
CorazReal	Inter-grupos	.025	3	.008	.371	.775
	Intra-grupos	.603	27	.022		
	Total	.628	30			
HGBProm	Inter-grupos	27.602	3	9.201	1.783	.174
	Intra-grupos	139.336	27	5.161		
	Total	166.939	30			
Ferritina	Inter-grupos	1502.017	3	500.672	2.094	.124
	Intra-grupos	6455.051	27	239.076		
	Total	7957.069	30			
WBCProm	Inter-grupos	38.660	3	12.887	2.073	.127
	Intra-grupos	167.838	27	6.216		
	Total	206.498	30			
LymProm	Inter-grupos	23.781	3	7.927	1.694	.192
	Intra-grupos	126.363	27	4.680		
	Total	150.144	30			
PorcLymProm	Inter-grupos	125.072	3	41.691	1.692	.192
	Intra-grupos	665.408	27	24.645		
	Total	790.480	30			
GranProm	Inter-grupos	2.622	3	.874	2.979	.049
	Intra-grupos	7.923	27	.293		
	Total	10.545	30			
PorcGranProm	Inter-grupos	128.965	3	42.988	1.744	.182
	Intra-grupos	665.383	27	24.644		
	Total	794.348	30			
RBCProm	Inter-grupos	8.876	3	2.959	2.543	.077
	Intra-grupos	31.415	27	1.164		
	Total	40.291	30			
HCTProm	Inter-grupos	199.877	3	66.626	1.737	.183
	Intra-grupos	1035.623	27	38.356		
	Total	1235.499	30			
MCVProm	Inter-grupos	60.134	3	20.045	6.675	.002
	Intra-grupos	81.076	27	3.003		
	Total	141.210	30			
MCHProm	Inter-grupos	6.018	3	2.006	3.941	.019
	Intra-grupos	13.742	27	.509		
	Total	19.760	30			
MCHCProm	Inter-grupos	2.209	3	.736	4.069	.017
	Intra-grupos	4.886	27	.181		
	Total	7.095	30			

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia		
							Inferior	Superior	
BazoRecAj	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	5.996 .	.050 .	2.290 2.290	6 3.095	.062 .103	.22270 .22270	.09725 .09725	-.01525 -.08146 .46065 .52686
HigRecAj	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1.693 .	.241 .	1.673 1.673	6 3.971	.145 .170	.08928 .08928	.05336 .05336	-.04128 -.05929 .21985 .23786
CorazRecAj	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1.211 .	.313 .	-.137 -.137	6 4.390	.895 .897	-.01162 -.01162	.08461 .08461	-.21866 -.23854 .19543 .21531
HbAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	.031 .	.867 .	6.785 6.785	6 5.876	.001 .001	.35322 .35322	.05206 .05206	.22583 .22518 .48061 .48126
FerrAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	6.527 .	.043 .	3.654 3.654	6 3.904	.011 .023	.46556 .46556	.12742 .12742	.15378 .10832 .77734 .82280
WBCAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	3.627 .	.106 .	3.746 3.746	6 3.118	.010 .031	.66729 .66729	.17812 .17812	.23146 .11237 .1.10313 .1.22222
LinfAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	3.226 .	.123 .	5.201 5.201	6 3.212	.002 .012	.62827 .62827	.12079 .12079	.33270 .25785 .92384 .99870
LinfPromAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	.038 .	.851 .	-.2338 -.2338	6 5.999	.018 .018	-.06837 -.06837	.02112 .02112	-.12005 -.12005 -.01670 -.01670
GranAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	3.728 .	.102 .	3.130 3.130	6 3.198	.020 .048	.71721 .71721	.22911 .22911	.15661 .01300 .1.27781 .1.42143
GranPromAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	.030 .	.869 .	3.310 3.310	6 5.999	.016 .016	.23509 .23509	.07103 .07103	.06130 .06129 .40888 .40889
RBCAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	2.099 .	.198 .	2.842 2.842	6 3.464	.029 .055	.30889 .30889	.10868 .10868	.04296 .01219 .57481 .62996
HtcAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1.739 .	.235 .	2.914 2.914	6 3.490	.027 .051	.34224 .34224	.11746 .11746	.05481 .00357 .62966 .68804
MVCAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	.174 .	.691 .	3.508 3.508	6 5.589	.013 .014	.04711 .04711	.01343 .01343	.01425 .01365 .07998 .08057
MCHAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	.407 .	.547 .	.097 .097	6 5.350	.926 .926	.00498 .00498	.05103 .05103	-.11990 -.12367 .12985 .13362
MHCHAjCont	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1.389 .	.283 .	-.700 -.700	6 4.512	.510 .519	-.04157 -.04157	.05941 .05941	-.18694 -.19939 .10380 .11625

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
BazoRecAj	Inter-grupos	.082	3	.027	.826	.491
	Intra-grupos	.895	27	.033		
	Total	.977	30			
HigRecAj	Inter-grupos	.046	3	.015	2.432	.087
	Intra-grupos	.170	27	.006		
	Total	.215	30			
CorazRecAj	Inter-grupos	.032	3	.011	.862	.473
	Intra-grupos	.331	27	.012		
	Total	.363	30			

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
HbAjCont	Inter-grupos	.180	3	.060	1.783	.174
	Intra-grupos	.911	27	.034		
	Total	1.091	30			
FerrAjCont	Inter-grupos	.519	3	.173	2.094	.124
	Intra-grupos	2.231	27	.083		
	Total	2.750	30			
WBCAjCont	Inter-grupos	1.233	3	.411	2.073	.127
	Intra-grupos	5.352	27	.198		
	Total	6.585	30			
LinfAjCont	Inter-grupos	1.019	3	.340	1.694	.192
	Intra-grupos	5.417	27	.201		
	Total	6.436	30			
LinfPromAjCont	Inter-grupos	.017	3	.006	1.692	.192
	Intra-grupos	.090	27	.003		
	Total	.107	30			
GranAjCont	Inter-grupos	4.540	3	1.513	2.979	.049
	Intra-grupos	13.718	27	.508		
	Total	18.257	30			
GranPromAjCont	Inter-grupos	.665	3	.222	1.744	.182
	Intra-grupos	3.429	27	.127		
	Total	4.094	30			
RBCAjCont	Inter-grupos	.267	3	.089	2.543	.077
	Intra-grupos	.944	27	.035		
	Total	1.210	30			
HtcAjCont	Inter-grupos	.176	3	.059	1.737	.183
	Intra-grupos	.910	27	.034		
	Total	1.086	30			
MVCAjCont	Inter-grupos	.018	3	.006	6.675	.002
	Intra-grupos	.024	27	.001		
	Total	.041	30			
MCHAjCont	Inter-grupos	.013	3	.004	3.941	.019
	Intra-grupos	.030	27	.001		
	Total	.043	30			
MHCHAjCont	Inter-grupos	.002	3	.001	4.069	.017
	Intra-grupos	.004	27	.000		
	Total	.005	30			

GranAjCont**MCHAjCont****HSD de Tukey^{a,,b}**

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
3.00	8	.9539	
1.00	7	1.0056	
4.00	8	1.0855	
2.00	8	1.8832	
Sig.		.073	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.
- b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

HSD de Tukey^{a,,b}

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4.00	8	.9480	
2.00	8	.9492	
3.00	8	.9594	.9594
1.00	7		1.0001
Sig.		.907	.100

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.
- b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

MVCAjCont**MHCHAjCont****HSD de Tukey^{a,,b}**

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4.00	8	.9381	
2.00	8	.9435	
3.00	8	.9681	.9681
1.00	7		1.0000
Sig.		.219	.177

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.
- b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

HSD de Tukey^{a,,b}

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3.00	8	.9908	
1.00	7	1.0000	1.0000
2.00	8	1.0061	1.0061
4.00	8		1.0097
Sig.		.067	.371

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.
- b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) GpoRec	(J) GpoRec	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
GranAjCont	2.00	1.00	.87758	.36890	.062	-.0375	1.7926
	3.00	1.00	-.05169	.36890	.998	-.9667	.8634
	4.00	1.00	.07989	.36890	.992	-.8352	.9949
MVCAjCont	2.00	1.00	-.05645 [*]	.01537	.003	-.0946	-.0183
	3.00	1.00	-.03182	.01537	.116	-.0699	.0063
	4.00	1.00	-.06181 [*]	.01537	.001	-.0999	-.0237
MCHAjCont	2.00	1.00	-.05097 [*]	.01722	.017	-.0937	-.0083
	3.00	1.00	-.04077	.01722	.064	-.0835	.0019
	4.00	1.00	-.05214 [*]	.01722	.014	-.0949	-.0094
MHCHAjCont	2.00	1.00	.00612	.00599	.607	-.0087	.0210
	3.00	1.00	-.00918	.00599	.302	-.0240	.0057
	4.00	1.00	.00969	.00599	.263	-.0052	.0246

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

GranProm

HSD de Tukey^{a,,b}

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
3.00	8	.7250	
1.00	7	.7643	
4.00	8	.8250	
2.00	8	1.4312	
Sig.		.073	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

MCVProm

HSD de Tukey^{a,,b}

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4.00	8	54.7500	
2.00	8	55.0625	
3.00	8	56.5000	56.5000
1.00	7		58.3571
Sig.		.219	.177

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

MCHProm

HSD de Tukey^{a..b}

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4.00	8	20.3250	
2.00	8	20.3500	
3.00	8	20.5687	20.5687
1.00	7		21.4429
Sig.		.907	.100

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

MCHCProm

HSD de Tukey^{a..b}

GpoRec	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3.00	8	36.4125	
1.00	7	36.7500	36.7500
2.00	8	36.9750	36.9750
4.00	8		37.1063
Sig.		.067	.371

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.724.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Comparaciones múltiples

t de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) GpoRec	(J) GpoRec	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
GranProm	2.00	1.00	.66696	.28036	.062	-.0285	1.3624
	3.00	1.00	-.03929	.28036	.998	-.7347	.6562
	4.00	1.00	.06071	.28036	.992	-.6347	.7562
MCVProm	2.00	1.00	-3.29464*	.89684	.003	-5.5192	-1.0700
	3.00	1.00	-1.85714	.89684	.116	-4.0817	.3675
	4.00	1.00	-3.60714*	.89684	.001	-5.8317	-1.3825
MCHProm	2.00	1.00	-1.09286*	.36923	.017	-2.0087	-.1770
	3.00	1.00	-.87411	.36923	.064	-1.7900	.0418
	4.00	1.00	-1.11786*	.36923	.014	-2.0337	-.2020
MCHCProm	2.00	1.00	.22500	.22016	.607	-.3211	.7711
	3.00	1.00	-.33750	.22016	.302	-.8836	.2086
	4.00	1.00	.35625	.22016	.263	-.1899	.9024

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.