



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de Ciencias e Ingeniería “Alberto Cazorla Talleri”

“EFECTO DE LA SOBREINGESTA DE SULFATO FERROSO SOBRE  
EL HEMATOCRITO, LA GLUCEMIA E HISTOLOGÍA DEL HÍGADO Y  
CIEGO EN RATONES NORMALES Y OBESOS”

Tesis para optar por el título profesional de  
Licenciada en Nutrición

**Autor**

Jeannett Mariela Rivera Manhualaya

**Asesor**

Dr. Manuel Enrique Gasco Tantachuco.

**Co asesor:**

Dr. Gustavo Francisco Gonzales Rengifo

Lima, Perú

2024

## **Dedicatoria:**

A mis padres y familia por el apoyo para lograr mi objetivo.

Al Dr. Gustavo Francisco Gonzales Rengifo por ser un gran apoyo en mi investigación, por ser mentor, maestro y guía para cumplir con mis objetivos.

Al Dr. Manuel Enrique Gasco Tantachuco por sus enseñanzas en el campo de investigación.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Gustavo F. Gonzales Rengifo; jefe de laboratorio de Endocrinología y Reproducción, por haberme permitido culminar mi trabajo de investigación.

A la Dra. Vilma y la Dra. Diana por sus enseñanzas en el tema estadístico.

A la carrera de Nutrición por su apoyo en brindarme recursos y por el apoyo en la difusión de mi investigación.

Al departamento Académico de Ciencias Biológicas y Fisiológicas.

## EFFECTO DE LA SOBREINGESTA DE SULFATO FERROSO SOBRE EL HEMATOCRITO, LA GLUCEMIA E HISTOLOGÍA DEL HÍGADO Y CIEGO EN RATONES NORMALES Y OBESOS

### ORIGINALITY REPORT

<b>8%</b> SIMILARITY INDEX	<b>7%</b> INTERNET SOURCES	<b>3%</b> PUBLICATIONS	<b>0%</b> STUDENT PAPERS
-------------------------------	-------------------------------	---------------------------	-----------------------------

### PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<b>hdl.handle.net</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>2</b>	<b>www.slideshare.net</b> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>3</b>	<b>Karen Briley-Sæbø. "Long-term imaging effects in rat liver after a single injection of an iron oxide nanoparticle based MR contrast agent", Journal of Magnetic Resonance Imaging, 10/2004</b> Publication	<b>&lt;1%</b>
<b>4</b>	<b>pesquisa.bvsalud.org</b> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<b>dadun.unav.edu</b> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>www.jove.com</b> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>Stuart J. McLachlan, Marie R. Morris, Maria A. Lucas, Ricardo A. Fisco et al. "Phase I clinical</b>	<b>&lt;1%</b>

## Glosario de términos

<b><i>ADH:</i></b>	Anemia por deficiencia de hierro
<b><i>DH:</i></b>	Deficiencia de hierro
<b><i>Hamp:</i></b>	Hepcidina
<b><i>Fe:</i></b>	Hierro
<b><i>FeSo<sub>4</sub>:</i></b>	Sulfato Ferroso
<b><i>Minsa:</i></b>	Ministerio de salud
<b><i>ONU:</i></b>	Organización de Naciones Unidas
<b><i>Fp:</i></b>	Ferroportina
<b><i>Tr:</i></b>	Transferrina
<b><i>mg/kg Fe:</i></b>	miligramo por kilogramo de hierro
<b><i>Ve:</i></b>	Vesículas extracelulares
<b><i>mg Fe/día:</i></b>	Miligramo de hierro por día
<b><i>DGA:</i></b>	Dieta alta en grasas
<b><i>EHGNA:</i></b>	Esteatosis Hepática no alcohólica
<b><i>RT:</i></b>	Receptor 1 de transferrina
<b><i>TFR:</i></b>	Deficiente de transferrina de hepatocitos
<b><i>mg/Kg/día:</i></b>	Miligramo por kilogramo por día
<b><i>mg:</i></b>	Miligramo
<b><i>ml:</i></b>	Mililitro
<b><i>Slc39a14:</i></b>	Familia portadores de solutos 39 y 14
<b><i>Aβ y fosfo-τ:</i></b>	Proteínas beta amiloides y tau
<b><i>I-6:</i></b>	Interleucina 6
<b><i>ROS:</i></b>	Especies reactivas de oxígenos

## ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
III. JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	13
V. HIPÓTESIS.....	13
VI. OBJETIVO GENERAL.....	13
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
X. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	29
XI. RESULTADOS.....	30
XII. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	40
XIII. DISCUSIÓN.....	53
XIV. FORTALEZAS DEL ESTUDIO.....	62
XV. LIMITACIONES.....	62
XVI. CONCLUSIONES.....	63
XVII. RECOMENDACIONES.....	63
XVIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
XIX. ANEXOS.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página.
Tabla 1: Alimento balanceado de ratones sanos (no obeso).....	16
Tabla 2: Alimento para la inducción de obesidad.....	16
Tabla 3: Variables para el estudio de ratones normales y obesos.....	20
Tabla 4: Histología del hígado.....	25
Tabla 5: Histología del ciego .....	27
Tabla 6: Pesos iniciales y finales en ratones no obesos y obesos.....	30
Tabla 7: Niveles de hematocrito en ratones no obesos y obesos .....	32
Tabla 8: Niveles de glucosa (mg/dl) en ratones no obesos y obesos.....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura N°1. Fase de experimentos en grupo obesidad y no obesos.....	17
Figura N°2. Flujograma experimental.....	18
Figura N°3. Valores de peso expresados en delta.....	31
Figura N°4. Valores de hematocrito expresados en delta.....	33
Figura N°5. Valores de Glucosa expresados en delta.....	35
Figura N°6. Peso de ciego (gr) en diferentes grupos.....	36
Figura N°7. Peso de hígado (gr) en diferentes grupos.....	37
Figura N°8. Correlación de Dosis de FESO <sub>4</sub> con % de incremento de glucemia en ratones obesos en el tiempo 0, 15 y 30.....	38
Figura N°9. Correlación de Dosis de FESO <sub>4</sub> con % de incremento de hematocrito en ratones obesos y no obesos en el tiempo 0, 15 y 30.....	39
Figura N°10. Histología del subgrupo Sanos, control.....	41
Figura N°11. Histología del hígado, subgrupo Sanos, 1 mg Fe/Kg Pc.....	41
Figura N°12. Histología del hígado, subgrupo Sanos, 2 mg Fe/Kg Pc.....	42
Figura N°13. Histología del hígado, subgrupo Sanos, 4 mg Fe/Kg Pc.....	42
Figura N°14. Histología del hígado, subgrupo Sanos, 5 mg Fe/Kg Pc.....	43
Figura N°15. Histología del hígado, subgrupo Obesos, control.....	44
Figura N°16. Histología del hígado, subgrupo Obesos, 1 mg Fe/Kg Pc.....	44



Figura N°17. Histología del hígado, subgrupo Obesos, 2 mg Fe/Kg Pc.....	45
Figura N°18. Histología del hígado, subgrupo Obesos, 4 mg Fe/Kg Pc.....	45
Figura N°19. Histología del hígado, subgrupo Obesos, 5 mg Fe/Kg Pc.....	46
Figura N°20. Histología del ciego, subgrupo Sanos, control.....	47
Figura N°21. Histología del ciego, subgrupo Sanos, 1 mg Fe/Kg Pc.....	48
Figura N°22. Histología del ciego, subgrupo Sanos, 2 mg Fe/Kg Pc.....	48
Figura N°23. Histología del ciego, subgrupo Sanos, 4 mg Fe/Kg Pc.....	49
Figura N°24. Histología del ciego, subgrupo Sanos, 5 mg Fe/Kg Pc.....	49
Figura N°25. Histología del ciego, subgrupo Obesos, control.....	50
Figura N°26. Histología del ciego, subgrupo Obesos, 1 mg Fe/Kg Pc.....	51
Figura N°27: Histología del ciego, subgrupo Obesos, 2 mg Fe/Kg Pc.....	51
Figura N°28. Histología del ciego, subgrupo Obesos, 4 mg Fe/Kg Pc.....	52
Figura N°29. Histología del ciego, subgrupo Obesos, 5 mg Fe/Kg Pc.....	52

## RESUMEN

La anemia es un problema de salud pública. Por ello muchos países recomiendan la suplementación preventiva de hierro en formulaciones orales en poblaciones con y sin anemia. No se tiene claro cuáles son las posibles ventajas en suplementar a sujetos sanos. **Objetivo:** Evaluar el peso, la morfología y la histología del hígado y ciego, así como los niveles de la glucemia y hematocrito frente a diferentes dosis de sulfato ferroso administrados por vía oral en ratones no obesos y obesos adultos. **Metodología:** Se utilizaron ratones macho de la especie *Mus musculus*, de la cepa BALB-C no obesos y un grupo sometido a obesidad. Grupo 1 (n= 20). El grupo de ratones no obesos (n=20) y obesos (n=20) está conformado por los siguientes subgrupos. Los ratones (obesos o no obesos) recibieron 0, 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg durante 30 días. La Medición de Glucosa y Hematocrito se realizó a los 0, 15 y 30 días del tratamiento. Los pesos y la histología del ciego y el hígado se llevaron a cabo a los 30 días de tratamiento. **Resultados:** El peso corporal incrementó más en obesos con mayor dosis de sulfato ferroso que en no obesos ( $p<0.05$ ). El peso del hígado ( $p<0.05$ ) y del ciego como marcador de la morfología fue mayor en el grupo de obesos a diferencia de los no obesos. El hígado presentó mayores alteraciones histológicas en ratones obesos que en ratones no obesos. El ciego presentó mayores alteraciones histológicas en ratones obesos respecto a ratones no obesos. Los niveles de la glucemia frente a diferentes dosis de sulfato administrados por vía oral fueron mayores en ratones obesos que en ratones no obesos ( $p<0.05$ ). Los niveles de hematocrito se incrementaron en el grupo obeso a comparación del grupo no obeso ( $p<0.05$ ). La dosis mínima a partir del cual se altera el peso del ratón y de los órganos al final del tratamiento con Sulfato Ferroso en ratones no obesos fue de 5 mg Fe/Kg y en obesos machos fue de 2 mg Fe/Kg peso corporal. La dosis mínima a partir del cual se altera la glucemia al final del tratamiento con sulfato ferroso en controles fue de 5 mg Fe/Kg y en obesos machos fue de 2 mg Fe/Kg. **Conclusiones:** La dosis 4 y 5 mg Fe/Kg producen alteración en la morfología, peso, histología de hígado y ciego y en los niveles de la glucemia y hematocrito en mayor proporción en los ratones obesos que en los controles no obesos.

**Palabras claves:** Sobrecarga de hierro, Hpcidina, Obesidad, Sobre ingesta de hierro.

## ABSTRACT

Anemia is a public health problem, so many countries recommend preventive iron supplementation in oral formulations in both anaemic and non-anaemic populations. The potential advantages of supplementation in healthy subjects are unclear. **Objective:** To evaluate the weight, morphology and histology of the liver and cecum, as well as blood glucose and haematocrit levels against different doses of orally administered sulphate in non-obese adult mice, as well as in obese adult mice. **Methodology:** Non-obese BALB-C strain male *Mus musculus* mice and a group subjected to obesity were used. The non-obese (n= 20) and obese (n=20) mice group consisted of the following subgroups. The mice (obese or non-obese) received 0, 1, 2, 4 and 5 mg Fe/kg for 30 days. Glucose and haematocrit were measured 0, 15 and 30 days after treatment. Weights and histology of the cecum and liver were performed at 30 days of treatment. **Results:** Body weight increased more in obese patients with higher doses of ferrous sulfate than in non-obese patients ( $p<0.05$ ). The weight of the liver ( $p<0.05$ ) and the cecum as a marker of morphology was higher in the obese group than in the non-obese group. Liver showed greater histological alterations in obese mice than in non-obese mice. Cecum showed greater histological alterations in obese mice compared to non-obese mice. Blood glucose levels versus different doses of sulfate administered orally were higher in obese mice than in non-obese mice ( $p<0.05$ ). Hematocrit levels were increased in the obese group compared to the non-obese group ( $p<0.05$ ). The minimum dose from which mouse and organ weight is altered at the end of Ferrous Sulfate treatment in non-obese mice was 5 mg Fe/kg and in obese males was 2 mg Fe/kg body weight. The minimum dose from which blood glucose is altered at the end of treatment with ferrous sulfate in controls was 5 mg Fe/kg and in obese males it was 2 mg Fe/kg. **Conclusions:** Doses of 4 and 5 mg Fe/kg produced alterations in morphology, weight, liver and cecum histology, and blood glucose and hematocrit levels in a higher proportion in obese mice than in non-obese controls.

**Key words:** Iron overload, Hepcidin, Obesity, Iron over intake.

## I. INTRODUCCIÓN

La anemia es una condición de alta prevalencia pues afecta al 30% en la población mundial [1]. Se estima que en el mundo el 29.9% y 36.9% de las mujeres en edad fértil y gestantes respectivamente tienen anemia [2][3]. En el caso de los infantes entre 6 y 59 meses de edad se reporta una cifra de 39.8% [4].

Según la OMS, la deficiencia de hierro (DH) es la causa más común de anemia (ADH) seguido de la anemia inflamatoria (AI) [5]. La OMS reporta que el 50% de los casos relacionados a anemia tienen DH, 42% tiene AI y 8% tiene deficiencia de otros micronutrientes y hemoglobinopatías hereditarias [6].

Basado en la descripción de causas de anemia por la OMS, la mayoría sino todos los países del orbe hacen intervenciones con suplementación con hierro (SH) o fortificación de alimentos para contrarrestar la DH y la ADH. Los países que han implementado estas normativas de suplementación complementaria de hierro son los países de América Latina incluido el Perú. La suplementación a la población se hace con fortificaciones orales, como sales ferrosas, micronutrientes o jarabes. La implementación de soluciones o fórmulas comestibles está dirigido a niños, gestantes y mujeres en edad fértil como un tratamiento preventivo [7][8].

En un estudio sistemático se encontró que la fracción de anemia atribuible a la deficiencia de hierro no es el 50% de los casos, sino que tiene una cifra que no supera el 25%, lo cual no coincide con lo reportado por la OMS [9].

En las poblaciones alto andinas que se encuentran ubicadas a gran altura, la OMS recomienda corregir el punto de corte de hemoglobina por cada 1000 msnm, debido a que la hemoglobina aumenta con la altura [10]. Sin embargo, en un estudio en la región alto andina de Puno, con niños suplementados con formulaciones ferrosas y micronutrientes, se reportó que el 21.97% era atribuible a la deficiencia de hierro y el 50% a otras causas [11].

La situación de anemia en el Perú no ha cambiado en los últimos 10 años y es preocupante; debido a que se ha incrementado la prevalencia de anemia en niños y

niñas; así, la prevalencia en infantes de 6 a 35 meses de edad y de 6 a 59 meses en el año 2022 es de 42.4% y 33.6% superior 3 p.p.p a lo reportado años atrás [12]. La suplementación con hierro no está siendo una solución a la anemia en el Perú, debido a la baja adherencia, a errores en los criterios para el diagnóstico de la anemia, o debido a que la anemia es un problema multicausal.

El hierro es un elemento esencial que se oxida fácilmente, y que se encuentra en forma férrica o en forma ferrosa. En un escenario de carga de hierro por vía oral, el ion ferroso ingresa fácilmente al enterocito lo cual al ser requerido ingresa a la circulación donde cumple sus funciones [13]. Se requiere 1 mg de hierro diario en el organismo para suplir las pérdidas que pueden ocurrir por la descamación entérica, pérdida en el sudor y en el caso de las mujeres por la menstruación [14]. El hierro que se encuentra en exceso es almacenado en los tejidos dado que no existe un sistema de excreción activa en mamíferos. Cuando el hierro almacenado en los tejidos supera un cierto nivel (sobrecarga de hierro) genera estrés oxidativo en las células e inflamación comprometiendo la correcta función orgánica [15].

En ratas suplementadas con hierro en agua potable por vía oral, generó la acumulación de hierro y estrés oxidativo en las mitocondrias con la liberación de radicales hidroxilos por la reacción tipo Fenton, y desarrollo de patologías como hepatomegalia y disfunción del bazo [16].

Así como existen alteraciones morfológicas de órganos como en el hígado y bazo, se va a alterar la histología en los tejidos. En el hígado, los niveles altos en hierro hacen que la secreción de las vesículas extracelulares (VE), de los hepatocitos se incrementen de hierro y que se origine una DH en los hepatocitos debido al sistema regulador de las células de Kupffer; sin embargo genera una sobrecarga de hierro en células vecinas como las células estrelladas del hígado; esta sobrecarga de hierro produce en el organismo especies reactivas de oxígeno. Este incremento de hierro en VE está relacionado al síndrome metabólico [17].

En situaciones críticas de crecimiento como en la etapa de la infancia y en la etapa de la gestación, se produce una alta demanda de absorción de hierro por lo cual es crucial

evitar el exceso de hierro en la dieta, de lo contrario esto puede conducir a una sobrecarga de hierro que se va a manifestar en la vida futura [18].

Cuando hay un exceso de hierro en la dieta, y si una buena cantidad del mismo no es absorbida en el duodeno, pasan al intestino grueso donde son utilizados por enteropatógenos que alteran la microbiota intestinal produciendo disbiosis [19].

La absorción de hierro en el organismo es regulada por una hormona importante; la hepcidina, la hormona es producida en el hígado y tiene un papel regulador en la homeostasis del hierro ya que impide su paso desde el enterocito duodenal a la circulación. Para esta regulación al incrementarse los niveles de la hepcidina se envía una señal a la ferroportina, único exportador de hierro, que inactiva su función [20][21]. Por el contrario, al disminuir los niveles circulantes de hepcidina aumenta la absorción de hierro al activarse la ferroportina.

En ratas, un alto nivel de hepcidina impide el paso de hierro y genera ferroptosis en las células [22].

En situaciones normales de eritropoyesis, el eritroblasto produce la eritroferrona, hormona que inhibe la secreción de la hepcidina, y permite el paso del hierro exportado por la ferroportina que se ubica en la membrana basolateral del enterocito duodenal; este hierro es transportado al eritroblasto por la transferrina y con ello el proceso de eritropoyesis continúa [18].

En un estudio de revisión, se evidenció los efectos secundarios de la suplementación con formulaciones ferrosas. Estos efectos secundarios infieren en que las sales ferrosas tienen efectos negativos en el tracto gastrointestinal. Las dosis del tratamiento fueron de 20-222 mg Fe/día y 400 mg Fe/día y en ambas dosis se describen efectos adversos de la suplementación con hierro [23].

El eje hepcidina-ferroportina se encarga de la correcta homeostasis de hierro, y en situaciones de exceso de hierro este mecanismo se agrava. Este eje pierde su equilibrio cuando se genera una sobreexpresión o una resistencia a la hepcidina por la inflamación sistémica [24]. En escenarios de enfermedades como hemocromatosis hereditaria,

talasemia y anemia falciformes, hay una interrupción del eje Hecpidina - ferroportina [25]. La sobrecarga de hierro se asocia a patologías como enfermedades cardiovasculares, esteatosis hepática no alcohólica, obesidad, diabetes y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson [26][27].

La obesidad es una de las pandemias del siglo XXI. Se estima que para el 2030 en el mundo 650 millones de personas adultas padecerán de obesidad, y en los niños la cifra superará los 39 millones [28]. En el Perú el tema de obesidad es una enfermedad preocupante, los adultos presentan una prevalencia de 25.6% de obesidad [29].

La inflamación de bajo grado también puede afectar la disposición de hierro en los tejidos. La obesidad es un estado de inflamación de bajo grado y se ha sugerido que puede afectar la homeostasis de hierro. Esta inflamación va a sobreexpresar la hepcidina lo que va a generar una menor acción de esta y afectando la correcta homeostasis del hierro [30].

La obesidad está asociada a diabetes mellitus tipo II [31], y en los últimos años se ha sugerido una asociación entre una mayor reserva de hierro en los tejidos y la presencia de diabetes mellitus tipo II. Se sugiere que el estado inflamatorio de la obesidad debe producir una elevación de la hepcidina sérica y con ello inhibir la absorción intestinal de hierro de una dieta normal.

Se ha demostrado que las células beta del páncreas son dependientes de hierro para un correcto mantenimiento de la homeostasis, pero debido a que el sistema se encuentra en una condición de síndrome metabólico, algunas proteínas encargadas del transporte de hierro se vuelven deficientes, lo cual provocará una acumulación de hierro en los órganos y un efecto perjudicial en la secreción de la insulina lo que puede desencadenar la diabetes mellitus tipo II [32].

En ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (AG) e inducidas a una sobrecarga de hierro, con un tratamiento de Sulfato ferroso (10 gr Fe por Kg de dieta) se evaluó cuáles son los efectos de la sobrecarga de hierro y qué relación existe con la enfermedad del Hígado graso no-alcohólico (EHGNA); es así que a una mayor AG y una sobrecarga de

hierro; se exagera la acumulación de lípidos y genera un daño oxidativo en el hígado [33]. El artículo menciona que reduciendo los niveles de hierro y con el control de una DAG; se evitará la disfunción metabólica de los lípidos y reducirá las probabilidades de generar EHGNA. La dieta y la cantidad de grasa que se consume a diario también es un factor relevante para exagerar la sobrecarga de hierro.

El incremento de hierro en el organismo puede ocasionar la desregularización en el control de la grasa intestinal. El eje adipocito-enterocito interviene en el control de la grasa intestinal cuando existen niveles bajos de hierro. Los ratones que carecen del receptor 1 de transferrina (RT) se encuentran protegidos de los desórdenes metabólicos inducidos por la dieta alta en grasa. Niveles bajos de hierro celular tienen un impacto positivo en la salud del tejido adiposo blanco y puede disminuir absorción de lípidos del intestino a pesar de una dieta alta en grasa [34].

Las concentraciones séricas como los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol se incrementan a una mayor ingesta del hierro en la dieta, además de afectar la histología del hígado y riñón. En un estudio con ratas macho inducidos a una sobrecarga de hierro por sulfato ferroso la histología del riñón se vio comprometida; con la presencia de congestión capilar del glomérulo moderada y congestión vascular de los túbulos medulares. En el hígado se encontró infiltración de células inflamatorias en la vena porta, balonamiento de hepatocitos y vacuolización del citoplasma. El extracto hidroalcohólico de jengibre atenuó los daños histológicos producidas por el sulfato ferroso [35].

En un estudio de sobrecarga de hierro, las ratas fueron inducidas a una sobrecarga de hierro por sulfato ferroso, (30 mg FESO<sub>4</sub>/Kg) por vía intraperitoneal, otro grupo fue el control que recibió agua destilada 1 ml agua/día, y un tercer grupo recibió sulfato ferroso (30 mg/Kg) y lisinopril (1 mg/Kg). En comparación entre grupos, fue el grupo tratado con sulfato ferroso el que tuvo efectos críticos en los marcadores hepáticos y una alteración en la histología del hígado. En las secciones del hígado se encontró núcleos agrandados e hinchazón, vacuolación citoplasmática, y apoptosis celular. Se encontraron la infiltración de células inflamatorias en la vena portal [36].



En modelos animales de ratones knockout deficiente de transferrina de hepatocitos (TFR), la alimentados con una dieta alta en hierro indujo a la acumulación de este metal en el hígado y a desarrollar esteatosis hepática. La modulación del mecanismo del inhibidor de ferroptosis ferrostatina-1 y la eliminación de la expresión hepática de Slc39a14 logra revertir los efectos de la acumulación de hierro y por tanto no se desarrolla la esteatosis hepática [37].

En animales, se evaluó los posibles agentes quelantes del hierro, por ello se indujo a ratas adultas a una sobrecarga de hierro (0.5 g de sulfato ferroso/Kg de peso corporal) y el agente quelante en este estudio fue el té verde que se le administró 500 g/Kg de peso corporal; dicho tratamiento fue 2 horas antes al tratamiento de Sulfato ferroso. Ambos tratamientos fueron por vía oral por un mes. En este estudio se evidenció que el agente quelante de Té verde bajó ligeramente los niveles de amilotransferasa mas no los niveles de hierro en sangre [38]. Aquí, podemos inferir que la acumulación de hierro no necesariamente podrá ser controlado con un agente quelante del hierro y que estos daños y acumulación de hierro en los órganos como el hígado difícilmente se pueda revertir.

A medida que avanza la edad en animales y humanos los niveles de hierro corporal aumentan, por ello se realizó una evaluación en ratones jóvenes y viejos alimentados con una dieta alta en hierro para observar si los marcadores de  $\beta$  amiloide se alteran. El estudio concluyó que los ratones viejos presentaron cambios degenerativos en la expresión de  $A\beta$  y fosfo- $\tau$  a diferencia de los ratones jóvenes. Se puede inferir con este estudio que el nivel de hierro corporal a medida que avanza la edad más la administración de hierro en la dieta va a generar una sobrecarga de hierro y afectar el correcto funcionamiento de marcadores como los de beta amiloides [39].

Se ha estudiado los efectos de las dosis máximas de hierro 4 mg/Kg Fe y 5 mg/Kg Fe en ratas jóvenes, sin embargo, no se ha estudiado cuales son las posibles dosis mínimas que pueden causar el exceso de hierro en el organismo [40].

No se conoce cuál sería la situación frente a la obesidad de la administración creciente de dosis de hierro elemental en la dieta sobre el nivel de hematocrito, la glicemia y la histología de ciertos órganos en un modelo de ratones.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **2.1 Planteamiento del problema**

Ante la alta prevalencia de anemia en el Perú y en el mundo, las normas de los diferentes gobiernos obligan a suplementar con hierro a niños y gestantes anémicos y no anémicos y ello puede exponer a un riesgo de sobrecarga de hierro particularmente en la población no anémica. Más aún, muchos países incluidos el Perú tienen programas de fortificación de alimentos con hierro.

La suplementación preventiva con hierro consiste en formulaciones orales ya sean jarabes, polvos multi-micronutrientes o tabletas de hierro. La cantidad que se utiliza para suplementar a niños es de 27 a 40 mg de hierro por día; y en el caso de madres gestantes supera los 180 mg de hierro por día, lo que excede en demasía la cantidad que se requiere para suplir los requerimientos diarios para absorción duodenal [12].

No se conocen los posibles efectos de la suplementación de hierro en pacientes no anémicos. El sulfato ferroso es uno de los suplementos de hierro más utilizados, por su fácil disponibilidad y su bajo costo en sus presentaciones tanto en tabletas como en jarabe. Las sales ferrosas son de baja tolerabilidad oral; causantes de problemas gastrointestinales y genera el aumento de especies reactivas de oxígeno en personas anémicas y no-anémicas.

Un ensayo aleatorizado evaluó los efectos del sulfato ferroso vs el gluconato ferroso en niños de 6 a 24 meses suplementados con 2 mg/Kg/día. Los niveles de hemoglobina y ferritina fueron mayores en el grupo de gluconato ferroso, por tanto, los autores

concluyen que el gluconato ferroso funcionó para prevenir la ADH, sin embargo, se presentaron efectos secundarios en ambos grupos, como estreñimiento, náuseas y vómitos [41].

Según Gambaro y col. la suplementación con sulfato ferroso por una semana alteró la variabilidad citomolecular y generó peroxidación lipídica en el hígado. Dicho estudio fue en pacientes pediátricos donde evaluaron que la suplementación con vitamina E tuvo algún efecto protector y que atenuó algunos efectos del sulfato ferroso [42].

Por otro lado, las tasas de sobrepeso y de obesidad están en constante aumento en nuestro país tanto en infantes como en mujeres adultas, lo que puede ser un factor de riesgo para sobrecarga de hierro en los tejidos. En un inicio se postuló [43] acerca de que los niños que padecían obesidad tenían ADH por no cuidar su estilo de alimentación, lo cual atribuía la deficiencia de hierro a una dieta alta en alimentos procesados.

La obesidad está ligada a un ambiente inflamatorio crónico de bajo grado, esto puede mediar al incremento de la hepcidina lo cual va a evitar la absorción del hierro, pero a su vez reteniendo hierro en los tejidos lo que lo expone a estrés oxidativo y la inflamación tisular [15].

El incremento de hierro en la dieta y en un estado de obesidad, la hepcidina va a evitar la salida de hierro de los tejidos de almacenamiento, lo cual va a conducir a una sobrecarga de hierro en los órganos diana. En una revisión sistemática donde buscaron una relación entre obesidad y ADH, la interleucina 6 (IL-6) se relaciona con la sobreexpresión de la hepcidina por tanto se desarrolla una anemia inflamatoria más no una ADH [44].

Por lo anteriormente expuesto la problemática detectada es que hay una tendencia a aumentar las tasas de sobrepeso y obesidad no solo en el Perú sino en el mundo, y que hay una alta exposición a nivel mundial a exceso de hierro en la ingesta oral lo que podría

afectar la disponibilidad de hierro en los tejidos particularmente cuando se administra a una población que inicialmente no es anémica.

La presente tesis evalúa la ingesta de dosis crecientes de hierro oral en un modelo murino que servirá como antecedente para estudiar más a fondo las consecuencias de una sobreingesta de hierro en un estado inflamatorio como es la obesidad.

### III. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio se justifica que en un escenario de inflamación de bajo grado como es el caso de la obesidad, la ingesta de hierro en diferentes dosis puede afectar mucho más que animales no obesos, la funcionalidad de los tejidos como el hígado y el colon ambos que interactúan normalmente con el hierro.

En la actualidad, el Perú es uno de los países que tiene una alta prevalencia de anemia por deficiencia de hierro (ADH) en niños de 6 a 35 meses de edad con 42.4% [12]. El gobierno Peruano ha realizado programas de suplementación preventiva de hierro para tratar esta problemática. Sin embargo estos esfuerzos no han logrado controlar la anemia, es más se reportó que en el 2022 la prevalencia de anemia en niños en el Perú aumentó 6 puntos porcentuales.

Esta suplementación preventiva de hierro no evalúa cuales son los posibles efectos en suplementar a niños con anemia o en aquellos que se encuentran sin anemia; además de no tener en cuenta una correcta evaluación si es que requieren el hierro. En la actualidad se sigue suplementando con formulaciones orales como el Sulfato Ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) a niños y a madres gestantes.

Hsu (2022) ha encontrado que la sobre ingesta de hierro está relacionada a una sobrecarga de hierro a nivel sistémico [26]. También Rochette 2022 ha reportado que el hierro libre genera especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que puede causar un daño a macromoléculas y al ADN [45].

El incremento de una dieta desequilibrada, alta en grasas y azúcares incrementará la grasa visceral, que se encuentra asociado a la cascada de inflamación, lo que activará las interleucinas pro inflamatorias. Estas citoquinas se comportan como moduladores de la secreción de hepcidina [46].

En una revisión sobre la sobrecarga de hierro y el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II, se reporta que la acumulación de hierro en los tejidos puede ocasionar una disfunción en los adipocitos y con ello aumenta la masa grasa; esto genera la obesidad y un estado inflamatorio. Dicha cascada de inflamación está relacionada a la diabetes mellitus tipo II [47].

En un estudio aleatorizado simple ciego en humanos, evaluaron la suplementación con hierro en mujeres con obesidad y sobrepeso. Este estudio tuvo un grupo control y un grupo con intervención para la pérdida de peso. Los parámetros evaluados fueron hemoglobina, hierro sérico, proteína C reactiva, ferritina sérica y Hpcidina. Se encontró una correlación de la pérdida de peso con la disminución de los marcadores de hierro en el grupo de intervención [48].

La sobrecarga de hierro afecta a personas sanas sin anemia. En un escenario de inflamación crónica de bajo grado como lo es la obesidad se quiere investigar cuales serían los posibles efectos y en qué dosis de hierro afectaría más al hematocrito y a los niveles de glucemia y la histología en tejidos de hígado y ciego en animales de experimentación frente a animales no obesos que actuarían como grupo control.

La sobre ingesta de hierro en los animales está relacionada con una sobrecarga de hierro en los tejidos, no se conoce a qué dosis podrá afectar la característica de los tejidos como ciego e hígado.

Por ello el presente estudio tiene como objetivo principal evaluar la histología de hígado y ciego, además de evaluar cómo se alteran los niveles de glucosa en sangre y hematocrito. Este efecto dosis-respuesta va a depender de las diferentes dosis utilizadas por un tiempo de 30 días en ratones machos adultos obesos y no obesos.

#### **IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El sulfato ferroso administrado a diferentes dosis altera la morfología, peso e histología de hígado y ciego, así como los niveles de glucosa sanguínea y del hematocrito en un grupo de ratones adultos sanos y en ratones adultos obesos?

#### **V. HIPÓTESIS**

La dosis 4 y 5 mg Fe/Kg produce alteración en la morfología, peso, histología de hígado y ciego y en los niveles de la glucemia y hematocrito en mayor proporción en los ratones obesos que en los controles no obesos.

#### **VI. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el peso, la morfología y la histología del hígado y ciego, así como los niveles de la glucemia y hematocrito frente a diferentes dosis de sulfato ferroso administrados por vía oral en ratones no obesos adultos, así como en ratones adultos obesos.

#### **VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la dosis mínima a partir del cual se altera el peso del ratón y de los órganos al final del tratamiento con sulfato ferroso en no obesos y en obesos.
- Evaluar la dosis mínima a partir del cual se altera la glucemia al final del tratamiento con sulfato ferroso en ratones no obesos y en obesos.

- Evaluar la dosis mínima de sulfato ferroso a partir del cual se altera el hematocrito en ratones macho adultos no obesos y en obesos.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Animales de experimentación

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron ratones de la especie ***Mus musculus***, de la cepa BALB-C machos de tres meses de edad. Los animales se obtuvieron del bioterio central de la Universidad Peruana Cayetano Heredia ubicado en el LID (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia).

Los ratones se dividieron en cinco grupos de cuatro ratones cada uno, donde se mantuvieron a condiciones de temperatura (18°C-26°C) y humedad estándar (30% - 70%). El ciclo de luz-oscuridad se controló con un temporizador respetando las 12 horas luz-oscuridad. Para el mantenimiento de los ratones, se tuvo en cuenta la cantidad máxima de ratones por jaula.

En el estudio se colocó 4 ratones por jaula; estos fueron ubicados en jaulas de polipropileno con un área de piso de 76.78 cm<sup>2</sup>, con una altura de 12.7cm para ratones con peso promedio de 25 gr.

Los ratones fueron alimentados con agua y alimento balanceado (*ad libitum*) para roedores (Alimento de la Universidad Agraria)

El estudio experimental se llevó a cabo desde el mes de febrero hasta abril de 2023, para la ejecución del proyecto (código SIDISI 209691) y procedimientos como la eutanasia se contó con la aprobación (Carta N° 001-01-23) por parte del comité de ética de animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## 8.2 Diseño experimental

El estudio tuvo una muestra de 40 ratones de la cepa BALB/C. Se formaron dos grandes grupos de 20 ratones cada uno, con el primer grupo conformado de ratones no obesos (S)(no obesos) y el segundo grupo de ratones obesos (OB) (anexo°3: Figura N°1).

Grupo 1 (n= 20). El grupo de ratones no obesos está conformado por los siguientes subgrupos.

Sub-grupo 1 (n=4), el grupo control que recibió 1 ml de agua destilada por 30 días

Sub-grupo 2 (n=4), que recibió una dosis mínima de 1 mg Fe/Kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), con un volumen de 0.01 ml Fe por 30 días.

Sub-grupo 3 (n=4): que recibió una dosis de 2 mg Fe/kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), con un volumen de 0.02 ml Fe por 30 días.

Sub-grupo 4 (n=4), que recibió una dosis de 4 mg Fe/kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), con un volumen de 0.04 ml Fe por 30 días.

Sub-grupo 5 (n=4), que recibió una dosis de 5mg Fe/kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), con un volumen de 0.05 ml Fe por 30 días

Grupo 2 (n=20). Para inducir el estado de obesidad se utilizó una dieta alta en grasa (DAG) compuesta por 33% dieta estándar, 33% leche Nestlé, 7% sacarina (aditivo edulcorante artificial) y 27% de agua.

Esta dieta alta en grasa se preparó para este estudio, fue administrada por vía oral [49]. La inducción a obesidad se determinó a partir de los 40 días del aumento de peso >40gr y con el control del nivel de colesterol.

Sub-grupo 1 (n= 4) Obesidad (OB) El grupo control recibió 1 ml de agua destilada por 30 días.

Sub-grupo 2 (n= 4) OB + 1 mg Fe/Kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), recibió 0.01 ml Fe por 30 días.



Sub-grupo 3 (n= 4) OB + 2 mg Fe/Kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), recibió 0.02 ml Fe por 30 días.

Sub-grupo 4 (n= 4) OB + 4 mg Fe/Kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), recibió 0.04 ml Fe por 30 días.

Sub-grupo 5 (n= 4) OB + 5 mg Fe/Kg (Fe elemental de sulfato ferroso por Kg de peso corporal), recibió 0.05 ml Fe por 30 días.

La administración de sulfato ferroso se realizó por vía orogástrica. Los volúmenes se aplicaron por las mañanas de 9 a 10 am para ambos grupos.

Tabla N°1 Alimento balanceado para ratones sanos (no obesos).

<b>Valor nutricional</b>	<b>Mcal/Kg</b>
<b>Proteínas</b>	17
<b>Lisina</b>	0.92
<b>Met-Cis</b>	0.98
<b>Grasa</b>	6
<b>Calcio</b>	0.63
<b>Fósforo disponible</b>	0.37
<b>Fibra</b>	4
<b>Humedad</b>	13

Valor nutricional del alimento balanceado para ratones.

Tabla N°2: Alimento preparado para inducción a obesidad.

<b>Tipo de Dieta: Hipercalórica</b>	<b>Cal/Kg</b>
<b>% Proteínas</b>	27.60%
<b>% Grasas</b>	25.20%
<b>% Hidratos de carbono</b>	32.70%

Valor nutricional del alimento hipercalórico preparado

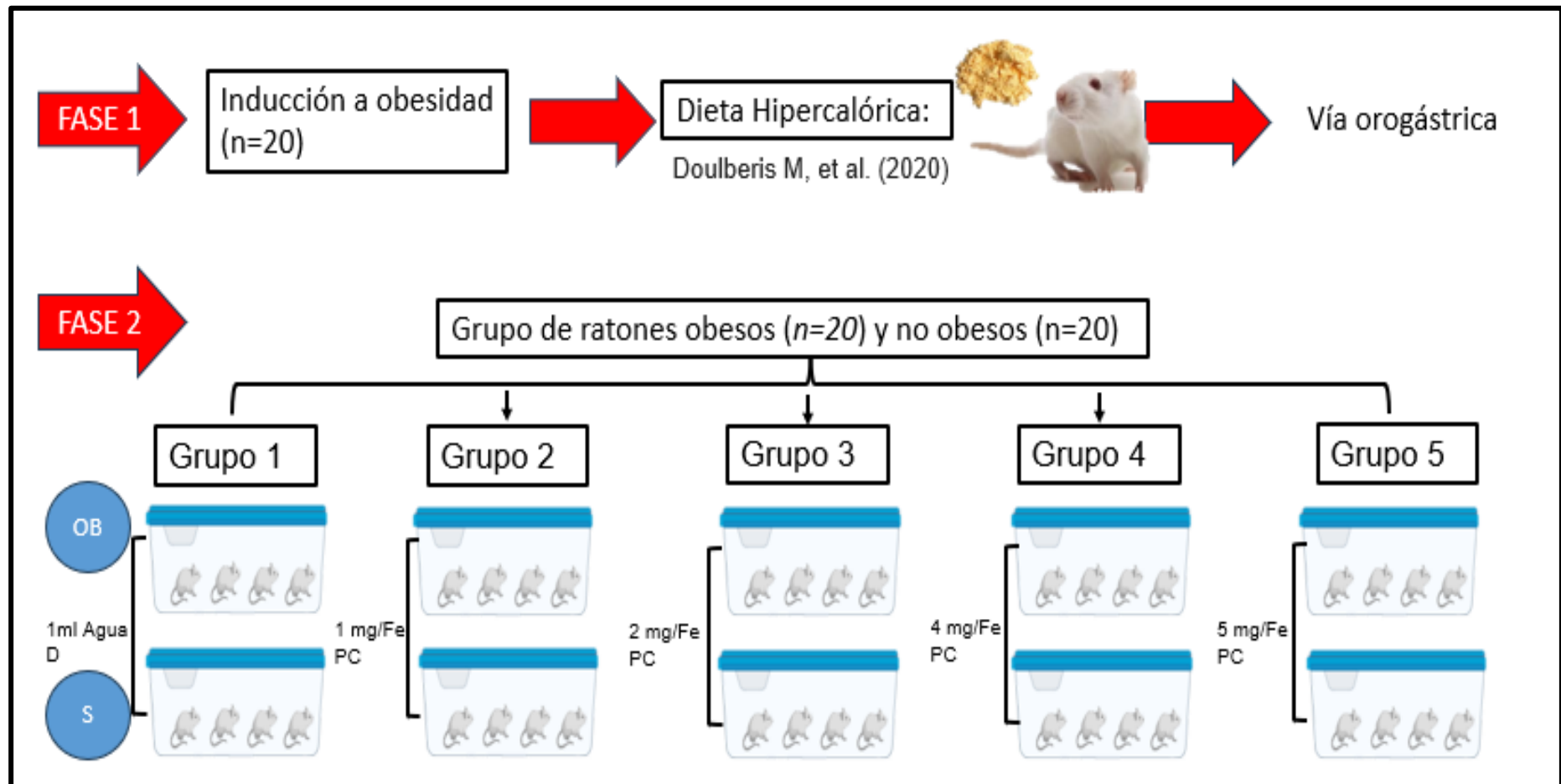
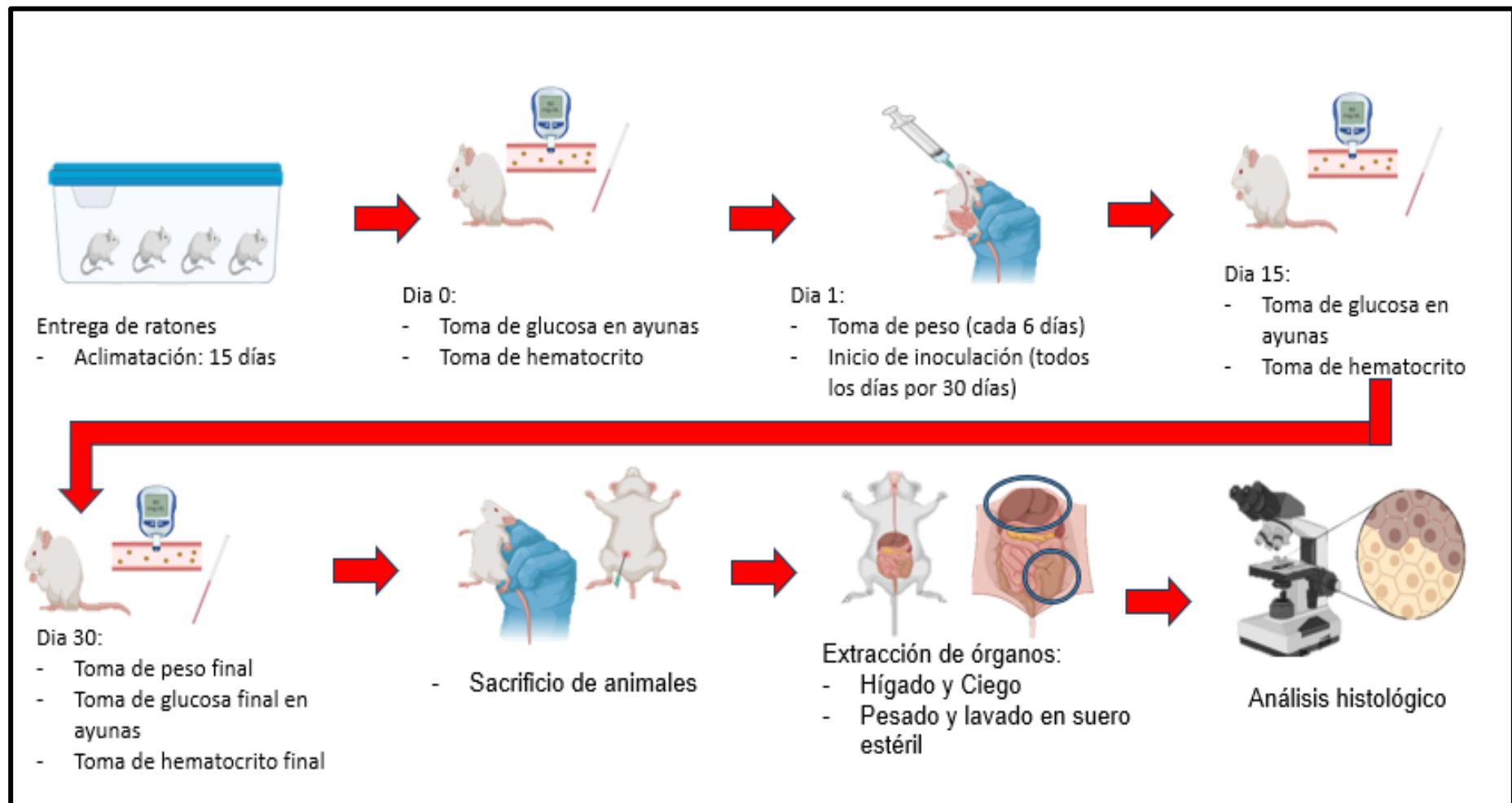


Figura 1. Fases de experimentos de ambos grupos de ratones no obesos e inducidos a obesidad.



**Figura 2.** Flujo experimental de ratones no obesos y obesos

### 8.3 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue calculado con la fórmula para grupos independientes: [50].

$$n_e = \frac{\left( Z_{\alpha/2} + Z_{\beta} \right)^2 * S^2}{d^2}$$

Donde:

$Z_{\alpha}$  = nivel de significancia 95%

$Z_{\beta}$  = poder del estudio 80%

$S^2$  = varianza del grupo de referencia

$d$  = diferencia que se desea detectar

Tomando los datos de un artículo que evaluaron glucosa e histología [51], y reemplazando en la fórmula:

$$S = 2.20$$

$$d = 3 \qquad n = ((1.96+0.84)^2 * (2.20)^2) / (3)^2 = 4$$

Por lo tanto: 4 animales por grupo

Total, serian 4 x 10 (grupos) = 40 ratones

## 8.4 Variables

Tabla 3. Variables, definición operacional, valores, tipos de variables y escala para el estudio de ratones normales y obesos.

<i>Variables</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Valores.</i> [52]	<i>Tipo de variable</i>	<i>Escala</i>
Peso del animal peso de órganos	Peso del animal	Peso con la balanza	Peso (gramos) en el día 1 al día 30	Dependiente cuantitativa-continua	De razón
Peso de órganos	peso del hígado y ciego	Peso con la balanza milimétrica de precisión	Peso (gramos) en el día 30	Dependiente cuantitativa- continua	De razón
Glucosa basal (Ayuno de 12 horas)	Medición de glucosa en sangre venosa de la cola luego de un periodo de ayuno de 12 horas	Niveles de glucosa en sangre Días 0, 15, 30.	97 mg/dl	Dependiente cuantitativa- continua	De razón
Niveles de hematocrito	Porcentaje de glóbulos rojos en sangre	Porcentaje de glóbulos rojos/ total de sangre Días 0, 15, 30.	43%	Dependiente cuantitativa- continua	De razón
Desorden de cordones radiados de hepatocitos	histología del hígado	Presencia de desorden en la arquitectura histológica	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal
Núcleos centrales vesiculares agrandados	Histología del hígado	Presencia de desorden en la arquitectura histológica	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal

Vena central de hepatocitos congestionada	Histología del hígado	Presencia de desorden en la arquitectura histológica	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal
Infiltración de células inflamatorias en el hígado	Histología del hígado	Presencia de células inflamatorias	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal
Estructura de lobulillo hepático desintegrado	Histología del hígado	Presencia de desorden en la arquitectura histológica	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal
Lesión de la cripta	Histología del ciego	Presencia de desorden en la arquitectura histológica	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal
Índice de lesión del ciego	Histología del ciego	Presencia de desorden en la arquitectura histológica	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal
Células inflamatorias del ciego	Histología del ciego	Presencia de células inflamatorias del ciego	Presente-Ausente	Dependiente, cualitativa	Nominal
Suplementación con sulfato ferroso	Formulación oral en presentación de jarabe	Si: "1". Recibe suplementación No: "0". No recibe suplementación	0 a 5 mg de hierro elemental en sulfato ferroso/Kg	Independiente, continua discreta	Nominal

## **8.5 Dosis de tratamiento y modo de suplementación**

La dosis utilizada para el tratamiento para los animales fue la dosis máxima recomendada (5 mg Fe/Kg peso corporal), que es una dosis proporcional a la dosis que usan los humanos (250-300 mg Fe /kg PC.). En este experimento usamos las dosis crecientes de 1 a 5 mg Fe/Kg [40] [53].

El  $\text{FeSO}_4$  utilizado en el experimento fue el jarabe con lote N° 87441833 Y RS EN-04557; la dosificación del jarabe de  $\text{FeSO}_4$  por cada 100 ml equivale a 300 mg de Fe elemental, se encontró descrito en el inserto del fármaco.

El tratamiento con sulfato ferroso se realizó por vía orogástrica con una sonda de ratón reusable de 15G y una jeringa descartable. Se utilizaron dos sondas distintas con diferentes jeringas reusables. Una sonda para administrar el sulfato ferroso y la otra para administrar agua.

El tratamiento de  $\text{FeSO}_4$  se dio todos los días hasta cumplir el mes del tratamiento. Con este experimento se evaluó el efecto de la dosis respuesta en un tiempo corto de tratamiento. Antes de iniciar el experimento se pesó a todos los animales de ambos grupos para identificar el peso inicial, para posteriormente recibir la suplementación de hierro en el horario de 10 am a 12 horas.

## **8.6 Medida de glucemia basal y hematocrito**

Para la toma de sangre se mantuvo un mismo horario para todos los grupos. Se siguió el procedimiento de Donovan y col 2016., donde se extrajo la sangre venosa de la cola del ratón. Este procedimiento se realizó al inicio, a la mitad y al final del tratamiento (día 0,15 y 30). Para extraer sangre se usó una jaula de restricción para insertar al ratón e impedir que realice movimientos, con la ayuda de un bisturí se le realizó un pequeño corte en la última porción de la cola, se estimuló la salida de la sangre y para poder detener el sangrado se hizo presión en la zona del corte.

Se colectó 0.5 ml de sangre con ayuda de un capilar, se obtuvieron dos capilares, para después ser centrifugados en la centrífuga de capilares. Finalizando en la toma de lectura de hematocrito [54].

Sólo para la medida de glucemia basal se dejó a los animales en ayunas la noche anterior por 12 horas, para realizar el procedimiento se siguió los pasos de la extracción de la sangre venosa de la cola y con la ayuda de un capilar se insertó una gota de sangre a la tira reactiva insertada al glucómetro de la serie 000667777. Se calibró la medida de glucosa por cada uso y al momento de insertar la gota de sangre se detuvo el sangrado de la cola con la ayuda de una gasa estéril [55]. Se tomó lectura del resultado y finalizando el procedimiento se devolvió a los animales a sus jaulas con agua y comida.

Se extrajo sangre venosa al inicio, a la mitad y final del tratamiento (día 0, día 15 y día 30) para evitar manipular la zona muy seguido evitando posibles daños.

### **8.7 Procesamiento de órganos y tejidos**

Al término del tratamiento los animales fueron anestesiados con una dosis de Halatal de acuerdo al peso del animal. Fueron anestesiados por la vía intraperitoneal con 40 mg/Kg, de peso. En el procedimiento se evaluó constantemente el estado del animal siguiendo los parámetros de reclinado, pérdida de reflejo de enderezamiento y la evaluación de la frecuencia respiratoria. [56].

Al momento de ser sacrificados, se les administró a los animales una dosis letal que es una dosis de doble anestésico Halatal (45 mg/Kg). Después del sacrificio los órganos de hígado y ciego fueron extirpados. Los órganos fueron pesados en una balanza analítica SERIE 0000112 para posteriormente ser colocados para el procedimiento de fijación en formol tamponado al 10%.

El proceso de fijación duró 24 horas. A temperatura ambiente se procedió a realizar la inclusión y bloque en parafina, para después cortar porciones con longitudes de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de espesor. Para el proceso de desparafinado se colocó las muestras en una placa a temperatura de 58°C por cinco minutos. Se realizó el procedimiento de aclarado con la



muestra por tres minutos. Al culminar el proceso de rehidratación se procedió a la tinción de las láminas con el portaobjetos. La tinción usada fue la de hematoxilina y eosina (H & E) [57].

### **8.8 Lectura y análisis histológico**

El análisis histológico se llevó a cabo con el uso de un microscopio NIKON serie 000001551, conectado a una cámara acoplada al microscopio. Las láminas fueron vistas a una resolución de 10X y 40X, siendo observadas en el computador.

Se determinó en el órgano del ciego características cualitativas en la morfología de la célula del ciego, ausencia de lesión; superficial; lesiones hemorrágicas submucosas con pequeñas erosiones; y lesiones hemorrágicas severas y algunas lesiones invasivas.

En cuanto a la lesión de la cripta se evaluó cambios cualitativos como: cripta intacta; pérdida del tercio inferior de la cripta; pérdida de los dos tercios inferiores de la cripta; pérdida de toda la cripta con el epitelio superficial intacto; pérdida de toda la cripta y epitelio superficial (erosión) [40].

En el hígado se determinó características cualitativas como cordones radiados de hepatocitos, núcleos centrales ventriculares, vena central, infiltración de células inflamatorias y estructura del lobulillo hepático [58].

En la figura A se observa secciones histológicas teñidas con Hematoxilina y Eosina (H & E) del artículo de Das y col 2014. Diferencian el grupo control del grupo tratado con hierro.

Tabla N°4. Histología del hígado

Histología del hígado

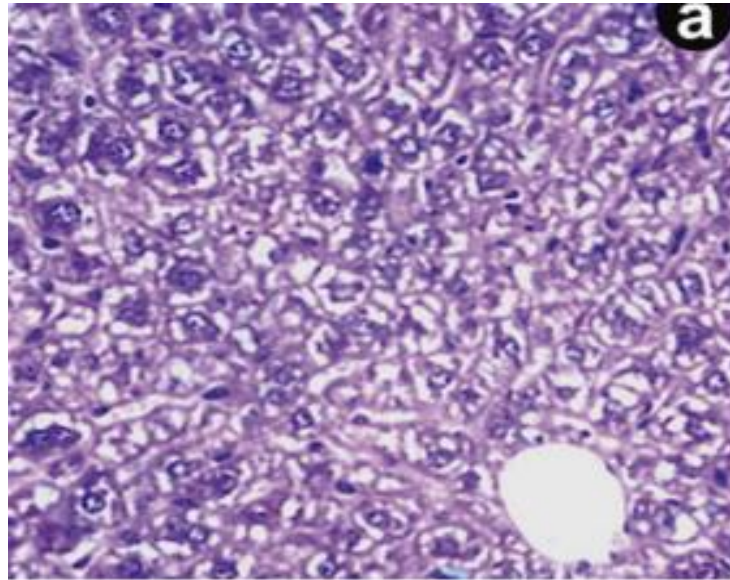


Figura A. Se muestra la estructura de células ordenadas de hepatocito normal, con una vena central descongestionada (normal) (Amplificación a 40X). Fuente: Das y col, 2014.

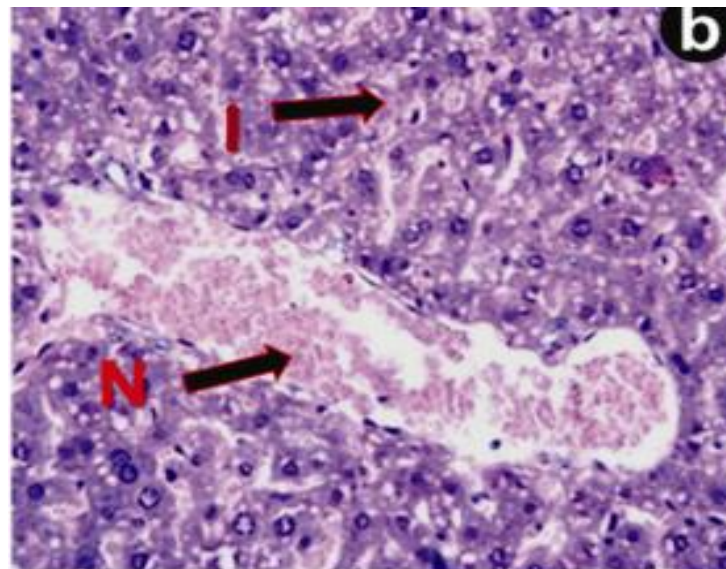


Figura B. Tratamiento de sobrecarga de hierro con 100 mg de Hierro dextrano/Kg. Muestra necrosis (N), inflamación (I) y la pérdida de la forma de los hepatocitos (Amplificación a 40X). Fuente: Das y col, 2014.

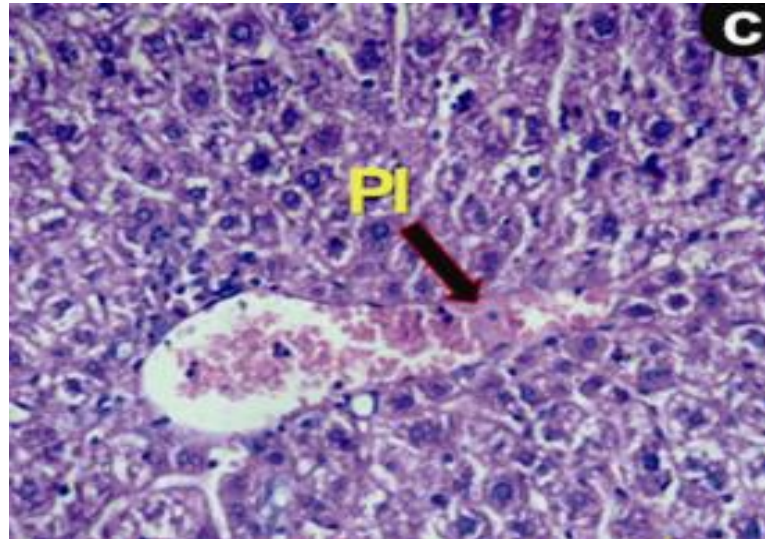


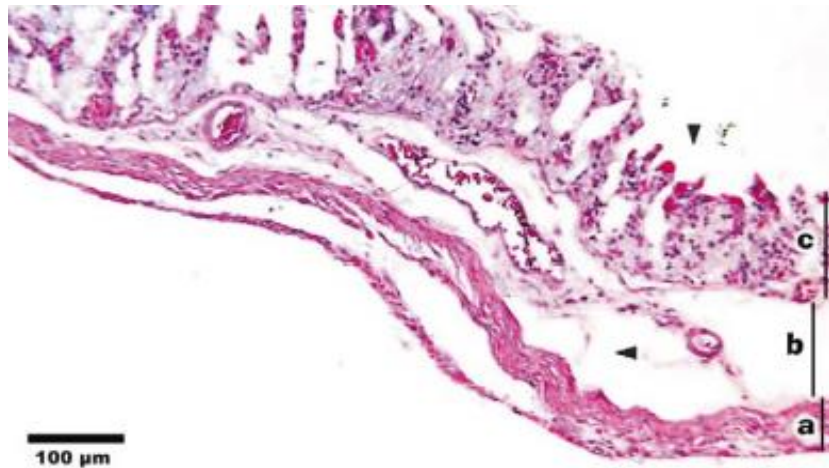
Figura C Tratamiento de sobrecarga de hierro con 100 mg de Hierro dextrano/Kg. Muestra Inflamación Portal (PI). (Amplificación a 40X). Fuente: Das y col, 2014.

Tabla N°5. Histología del ciego.

Histología del ciego



D) Histología representativa del ciego: Uniformidad de la capa muscular (a), submucosa (b) y mucosa (c) [59].



E) Histología del ciego con agentes de contraste portadores de gas (ACG): Las puntas de flecha indican edema y engrosamiento de la submucosa (b) y congestión,

dilatación de vasos, hemorragia e inflamación de la mucosa (c). La capa muscular (a) es normal [59].

## IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se tomó en cuenta las variables independiente como 0, 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg de peso corporal y las variables dependientes (Peso del animal a diferentes tiempos, peso de órganos al final del experimento, glucosa a diferentes tiempos, hematocrito a diferentes tiempos, desorden de cordones radiados de hepatocitos, Núcleos centrales vesiculares agrandados, vena portal congestionada, infiltración de células inflamatorias en el hígado, estructura del lobulillo hepático desintegrado, lesión de la cripta, índice de lesión del ciego, células inflamatoria en el ciego y suplementación con sulfato ferroso.

Los datos se ingresaron a una base de Excel para después realizar el análisis en un paquete estadístico Stata V.17. Cuando se comparan más de dos grupos se usó el análisis de varianza (ANOVA). Para la evaluación de resultados de efectos significativos se usaron pruebas post-hoc de Scheffé.

Cuando se evalúan dos muestras (ej. obesos vs no obesos) se usó la prueba t de Student.

Las correlaciones entre tratamiento y las variables peso corporal, glucemia y hematocrito se hicieron con la prueba de análisis de correlación de Pearson.

Se tomaron como significativo el valor de  $P < 0.05$  y se utilizaron variables continuas como la media  $\pm$  error estándar:  $(X \pm EE)$ .

## **X. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Para el inicio del estudio, se obtuvo la aprobación por el Comité de Ética del uso de animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia DC: 001-01-2023. Para asegurar el bienestar de los animales, todas las evaluaciones y procedimientos en animales tuvieron que cumplir el requisito de aprobación según la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Consejo Nacional de Investigación, 1996); por ello se tuvo en cuenta el entrenamiento de trabajar con animales previo al estudio.

Al culminar el estudio los animales fueron sometidos a eutanasia; siguiendo la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

## XI. RESULTADOS

### 11.1 Peso de los animales

Los animales de ambos grupos (obesos y no obesos) que recibieron la dosis creciente de hierro de 0, 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg de peso corporal, aumentaron de peso al final de los treinta días de tratamiento. (Tabla 6).

El delta del peso corporal (Peso final menos peso inicial) se incrementa proporcionalmente a la dosis de hierro administrada, siendo menor cuando se inocula 0 mg Fe/Kg de peso corporal y mayor cuando se inocula 5 mg Fe/Kg de peso corporal ( $p < 0.05$ ). El delta de peso fue similar en normales como en obesos (figura 3).

**Tabla 6:** Pesos iniciales y finales en ratones controles no obesos y obesos según nivel de hierro inoculado.

Grupo	mg Fe/Kg	Peso inicial	Peso final
		Gramos	Gramos
		<b>M ± EE</b>	<b>M ± EE</b>
Obesos	0	40.75±0.47	41±0.57
	1	40.75±0.47	42±0.81
	2	40.5±0.28	42.5±0.5
	4	41.75±0.25	44.25±0.345
	5	41.25±0.47	46.25±0.24*
No-Obesos	0	28±0.47	28.25±0.25
	1	28.25±0.64	29.75±0.25
	2	34.25±0.25	35.25±0.25
	4	33±1.29	36±1.08
	5	32.25±0.85	36±0.81

Los datos son medias (M) y error estándar (EE).

El peso final se mide después de treinta días de tratamiento. \*  $p < 0.05$  respecto a la dosis control no obeso vs la dosis 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg del grupo obeso.

Hubo una diferencia entre las dosis 1 mg Fe/kg vs 2 mg Fe/Kg, 2mg Fe/Kg vs 4 mg Fe/Kg y 4mg Fe/Kg vs 5 mg Fe/Kg del grupo de obesos. En el grupo no obeso,  $P < 0.05$  respecto a la dosis control no obeso vs la dosis 1, 2, 4 mg Fe/kg y 5 mg Fe/Kg del grupo no obeso.

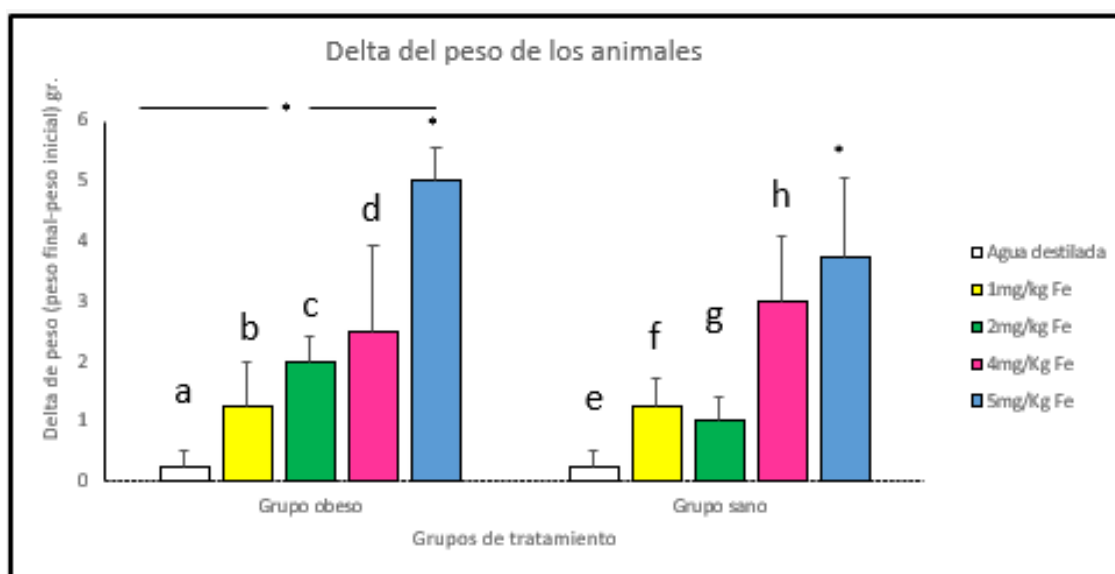


Figura 3. Delta del peso de los animales (g) de grupo de obesos y no obesos en el tratamiento con hierro. Los valores son expresados como media y error estándar. Delta del peso es peso final menos peso inicial.

El peso corporal final de los animales corresponde al peso observado luego de los 30 días de tratamiento tanto en obesos como en no obesos. \* $P < 0.05$  respecto al delta de pesos con 0 (agua destilada), 1, 2 y 4 mg Fe/Kg. Las dosis **b**, **c**, **d** y 5 mg Fe/Kg del grupo obesos es  $P < 0.05$  respecto a (**a**). La dosis (**b**) es  $P < 0.05$  respecto **a c**, **c** es  $P < 0.05$  respecto a (**d y d**) es  $P < 0.05$  respecto a 5 mg Fe/Kg. Las dosis **f**, **g**, **h** y 5 mg Fe/Kg del grupo no obeso es  $P < 0.05$  respecto a **e**. **f** es  $P < 0.05$  respecto a (**g**), **g** es  $P < 0.05$  respecto a (**h**) y **h** es  $P < 0.05$  respecto a 5 mg Fe/Kg.



### Diferencia entre pesos de ratones obesos y no obesos para cada tratamiento

El peso del grupo Control OB (agua destilada) no es diferente al peso del grupo control (agua destilada) de no obesos ( $P>0.05$ ). Los ratones obesos tratados con la dosis 1 mg Fe/Kg tiene un peso similar respecto a 1 mg Fe/Kg en no obesos ( $P>0.05$ ). Los ratones obesos que recibieron la dosis 2 mg Fe/Kg OB aumentaron más de peso con respecto a los ratones no obesos que la dosis 2 mg Fe/Kg ( $P<0.05$ ).

La dosis 4 mg Fe/Kg en no obesos es no significativo ( $P>0.05$ ) respecto a 4 mg Fe/Kg en OB. Los ratones obesos que recibieron la dosis de 5mg Fe/Kg en OB aumentaron más de peso con respecto a los ratones no obesos que recibieron 5 mg Fe/Kg ( $P<0.05$ ).

### 11.2 Niveles de hematocrito

El hematocrito al inicio del estudio fue igual en obesos que en controles ( $P>0.05$ ).

El hematocrito entre grupos de obesidad y no obesos varió significativamente al final del tratamiento ( $p<0.05$ ). A dosis altas de hierro se incrementó los niveles de hematocrito en ambos grupos (Tabla 7) siendo mayor el incremento en obesos; así en ratones obesos con 5 mg Fe/Kg tuvo un valor de 64.55% y en ratones no obesos con la misma dosis de hierro, un hematocrito de 59.5% ( $p<0.05$ ).

**Tabla 7:** Niveles de hematocrito expresados en media, error estándar.

Grupo	mg Fe/Kg	Hematocrito inicial	Hematocrito final
		<b>M ± EE</b>	<b>M ± EE</b>
Obesos	0	55.75±1.58	56.5±3.10
	1	56.5±3.69	59.25±0.95
	2	55.5±3.78	59.75±2.87
	4	57.25±1.70	61±1.15
	5	56.5±1.91	64.5±1.73 *

No-Obesos	0	55±1.58	54.75±3.10
	1	54.75±1.75	56.25±2.49
	2	55±1.08	58.25±0.85
	4	55.25±0.85	59.25±1.10
	5	54.5±1.04	59.5±0.64

Los datos son expresados en media y error estándar

$p < 0.05$  respecto a la dosis control no obeso vs la dosis 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg del grupo obeso. Hubo una diferencia entre las dosis 1 mg Fe/Kg vs 2 mg Fe/Kg, 2mg Fe/Kg vs 4 mg Fe/Kg y 4mg Fe/Kg vs 5 mg Fe/Kg del grupo de obesos.  $P < 0.05$  respecto a la dosis control no obeso vs la dosis 1, 4 y 5 mg Fe/Kg del grupo de no obesos.

En la tabla 7 Los niveles de hematocrito (%) en el grupo obeso es mayor \* $P < 0.05$  respecto al grupo de no obesos.

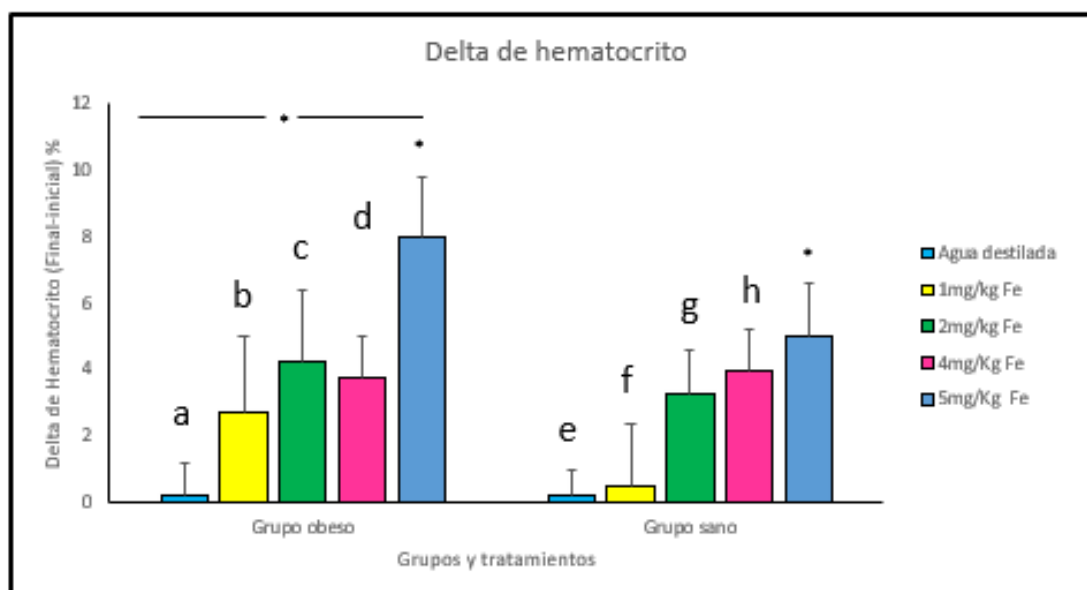


Figura 4. Valores de hematocrito expresados en delta. Niveles de hematocrito (%) de los grupos experimentales (obeso y no obeso).

Los valores expresados son medias y error estándar. \* $p < 0.05$  respecto a las otras dosis. Las dosis 1 (**b**), 2 (**c**), 4 (**d**) y 5 mg Fe/Kg del grupo obesos es  $P < 0.05$  respecto al control del grupo obesos. La dosis 1 mg Fe/Kg (**b**) es  $P < 0.05$  respecto a 2 mg Fe/Kg (**c**); 2 mg

Fe/Kg **(c)** es  $P < 0.05$  respecto a 4 mg Fe/Kg **(d)**; 4 mg Fe/Kg **(d)** es  $P < 0.05$  respecto a 5 mg Fe/Kg. Las dosis 1 **(f)**, 2 **(g)**, 4 **(h)** y 5 mg Fe/Kg del grupo no obeso es  $P < 0.05$  respecto al control **(e)**. La dosis 1 **(f)** es  $P < 0.05$  respecto a 2 mg Fe/Kg **(g)**; 2 mg Fe/Kg **(g)** es  $P < 0.05$  respecto a 4 mg Fe/Kg **(h)**; 4 mg Fe/Kg **(h)** es  $P < 0.05$  respecto a 5 mg Fe/Kg.

Los niveles de hematocrito en la dosis 5 mg Fe/Kg en los ratones no obesos es significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) respecto a dosis menores (1,2,4 mg Fe/Kg; **f, g, h**).

#### **Diferencia entre hematocritos de ratones obesos y no obesos para cada tratamiento.**

Los ratones obesos (OB) que recibieron la dosis **(b)** aumentaron más el hematocrito respecto a los ratones no obesos (S) que recibieron la dosis **(f)** ( $P < 0.05$ ).

Los ratones obesos (OB) que recibieron la dosis **(c)** aumentaron más el hematocrito respecto a los ratones no obesos (S) que recibieron la dosis **(g)** ( $P > 0.05$ )

Los ratones obesos (OB) que recibieron la dosis **(d)** es  $P > 0.05$  respecto a la dosis **(h)**

Los ratones obesos (OB) que recibieron la dosis de 5mg Fe/Kg OB aumentaron más el hematocrito respecto a los ratones no obesos (S) que recibieron la dosis de 5mg Fe/Kg ( $P < 0.05$ ).

#### 11.3 Niveles de glucosa en ayunas

En los diferentes tratamientos se incrementó los niveles de glucosa al final del estudio. (Tabla 8)

**Tabla 8:** Niveles de glucosa (mg/dl) expresados en media y error estándar en ratones no obesos y obesos que reciben dosis diferentes de hierro.

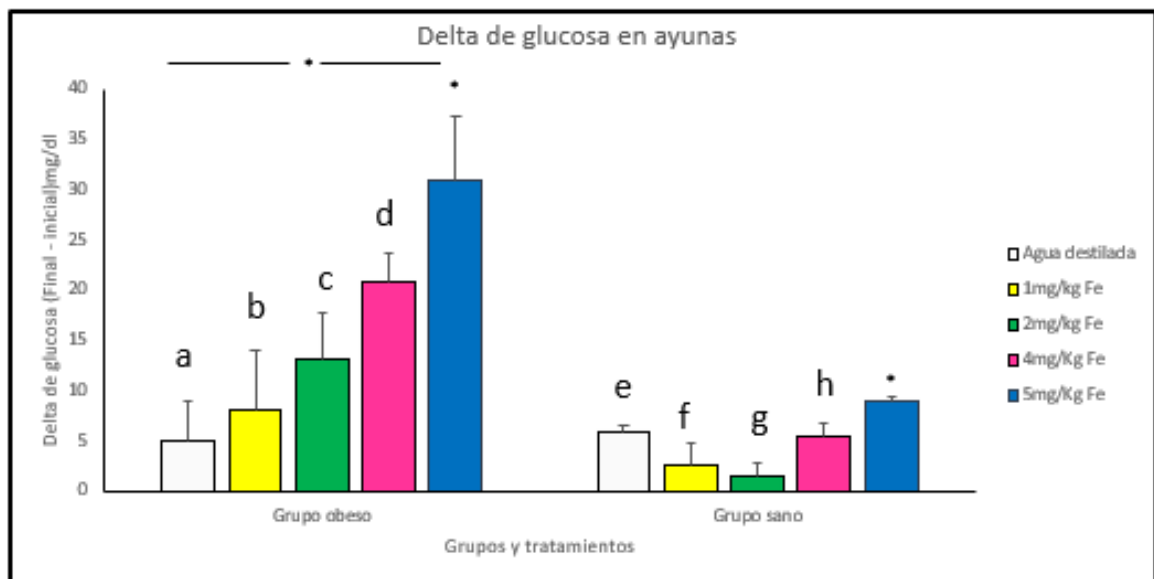
Grupo	mg/Kg Fe	Glucosa inicial	Glucosa final
		mg/dl	mg/dl
		<b>M ± EE</b>	<b>M ± EE</b>
Obesos	0	75.25±2.49	80.25±3.98
	1	77±2.67	85±4.14

	2	84.75±1.08	97.65±4.11
	4	79.25±2.16	100±2.73
	5	80.75±2.56	111.75±6.16 *
No-Obesos	0	75.25±1.10	81±1.29
	1	83±2.67	85.5±1.04
	2	84.75±1.88	86.25±1.03
	4	86.25±1.31	91.75±1.31
	5	87±1.47	96±1.82

Los valores son media, error estándar.

$p < 0.05$  respecto a la dosis control no obeso vs la dosis 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg del grupo obeso. Hubo una diferencia entre las dosis 1 mg Fe/Kg vs 2 mg Fe/Kg, 2mg Fe/Kg vs 4 mg Fe/Kg y 4mg Fe/Kg vs 5 mg Fe/Kg del grupo de obesos.  $P < 0.05$  respecto a la dosis control no obeso vs la dosis 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg del grupo no obeso.

En la tabla 8 los niveles de glucosa en ayunas del grupo obeso que recibieron 5 mg Fe/Kg son significativamente mayores ( $*P < 0.05$ ) con respecto al grupo no obeso.



**Figura 5.** Valores de Glucosa expresados en delta

Figura 5: Delta de los Niveles de glucosa en ayunas (mg/dL) de los grupos de ratones obesos y controles según nivel de hierro elemental recibido durante 32 días. Los valores expresados son media y error estándar.

El incremento en los niveles de glucosa en ayunas del grupo no obeso es significativamente menor ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo de ratones con obesidad.

Las dosis **b**, **c**, **d** y 5 mg Fe/Kg del grupo obesos es  $P < 0.05$  respecto al control (**a**). La dosis (**b**) es  $P < 0.05$  respecto a (**c**), **c** es  $P < 0.05$  respecto a (**d**) y **d** es  $P < 0.05$  respecto a 5 mg Fe/Kg.

Las dosis **f**, **g**, **h** y 5 mg Fe/Kg del grupo no obeso es  $P < 0.05$  respecto al control del grupo no obeso. La dosis (**f**) es  $P < 0.05$  respecto a (**g**), **g** es  $P < 0.05$  respecto a (**h**) y **h** es  $P < 0.05$  respecto a 5 mg Fe/Kg.

#### 11.4 Peso del ciego

El peso del ciego varió al final del estudio entre grupos. El peso de ciego en la dosis 5 mg/Kg fue significativamente mayor en ambos grupos ( $P < 0.05$ ).

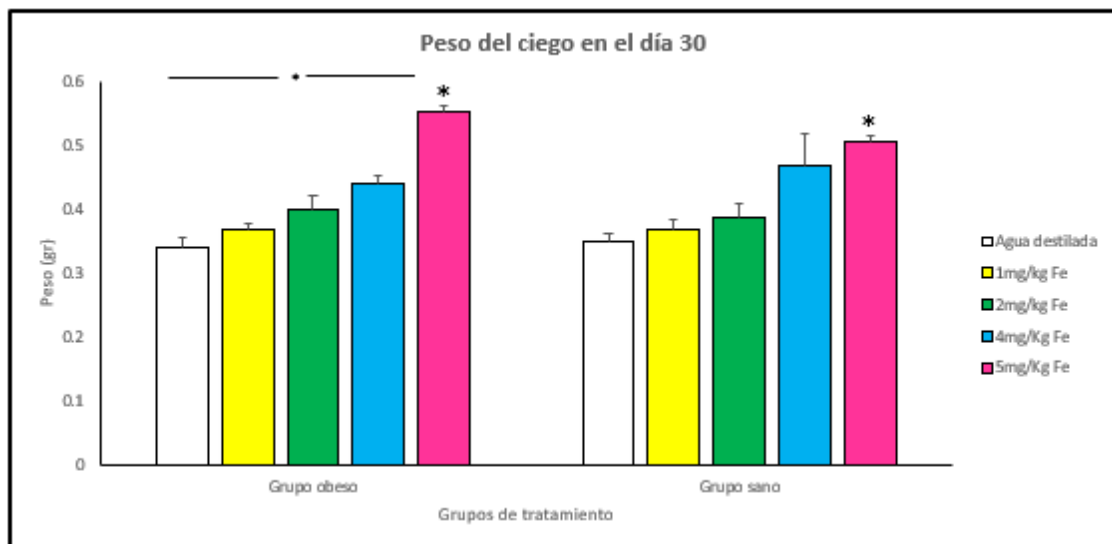
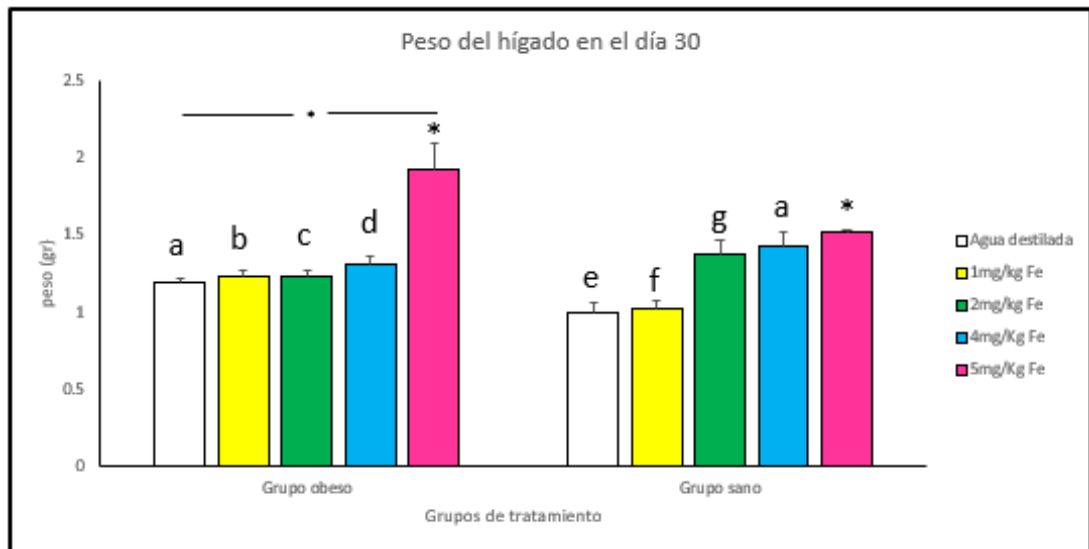


Figura 6. Peso de ciego (gr) en diferentes grupos.

Los valores son expresados en media y error estándar. En el grupo no obeso \*P<0.05 a grupo control, 1mg Fe/Kg, 2 mg Fe/Kg, 4 mg Fe/Kg. En el grupo Obesos \*P<0.05 a grupo control, 1mg Fe/Kg, 2 mg Fe/Kg y 4 mg Fe/Kg.

### 11.5 Peso del hígado

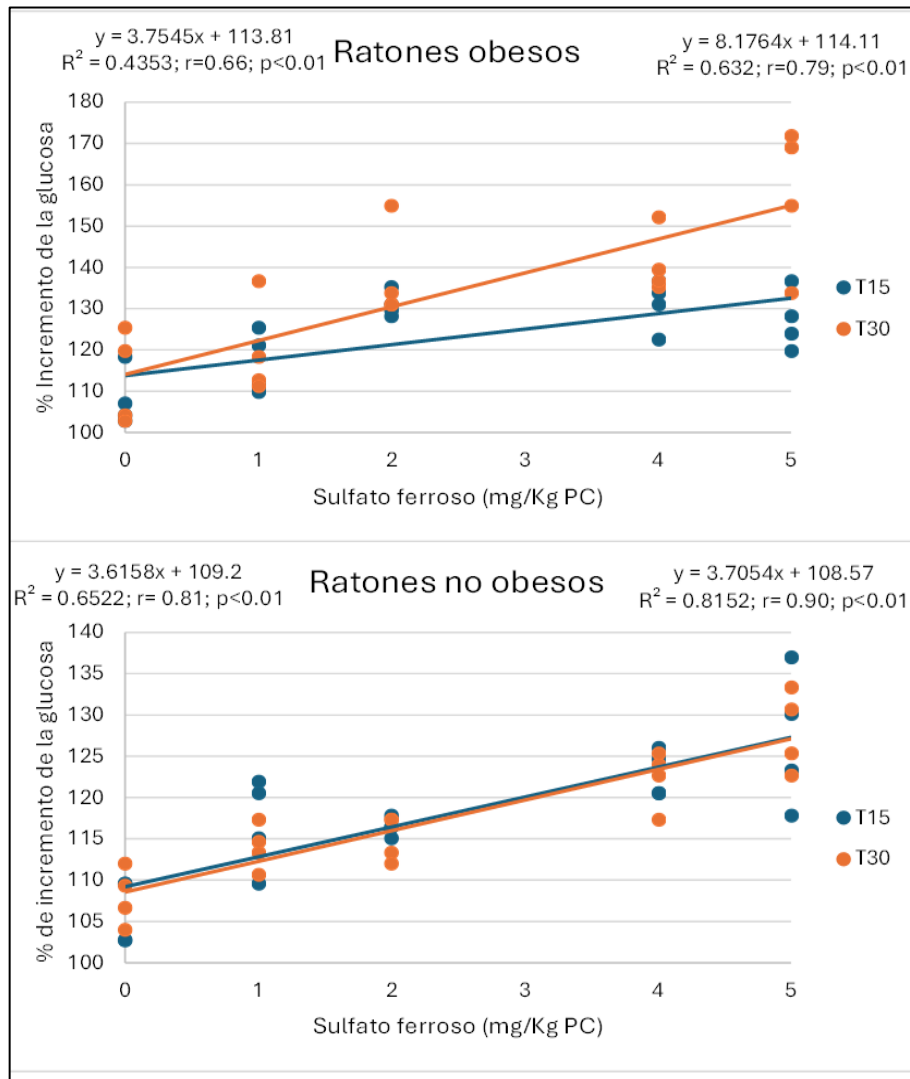
El peso del hígado varió de manera significativa en el grupo de obesidad. Se observa un incremento del peso de hígado de manera consecutiva dependiendo de las dosis crecientes de tratamiento.



**Figura 7.** Peso de hígado (gr).

Los valores son expresados en media y error estándar. En el grupo de no obeso, la dosis 5mg Fe/Kg es \*P<0.05 respecto a grupo control, 1,2,4 mg Fe/Kg. El grupo de obesidad, la dosis 5mg Fe/Kg es \*P<0.05 respecto al grupo control, 1, 2 y 4 mg Fe/Kg.

## Glucemia en ratones Obesos y normales

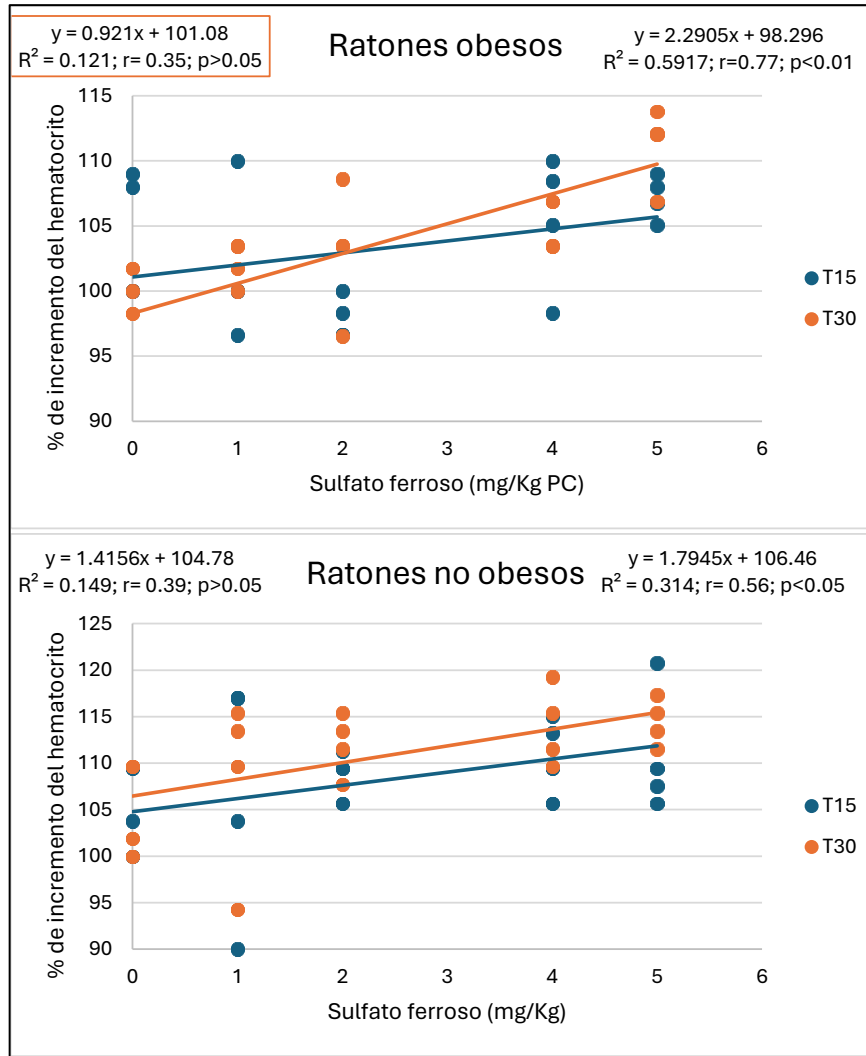


**Figura N°8:** Correlación de Dosis de  $\text{FESO}_4$  con % de incremento de glucemia en ratones obesos en el tiempo 0, 15 y 30

Incremento porcentual en glucosa en ratones obesos (Superior) y no obeso (inferior) que recibieron sulfato ferroso por vía oral en dosis de 0,1 ,2 ,4 y 5 mg/kg Fe por 15 a 30 días. Tiempo 0: 100%

En el tiempo 15, el grupo de obesidad es  $P < 0.01$  respecto al tiempo 0. En el tiempo 30, el grupo de obesidad es  $P < 0.01$  respecto al tiempo 0

## Hematocrito en ratones Obesos y no obeso



**Figura N°9:** Correlación de Dosis de  $\text{FESO}_4$  con % de incremento de hematocrito en ratones obesos y no obeso en el tiempo 0, 15 y 30

Incremento porcentual del hematocrito en ratones obesos (superior) y no obesos (inferior) que recibe sulfato ferroso por vía oral en dosis de 0,1,2,4 y 5 mg/Kg Fe por 15 o 30 días. Tiempo 0: 100%

En el tiempo 15, el grupo no obesos es  $P > 0.05$  respecto al tiempo 0. En el tiempo 30, el grupo no obesos es  $P < 0.01$  respecto al tiempo 0.



## XII. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

En el análisis histológico del hígado en los grupos de no obesos y obesos, se encontró en el grupo de obesidad diferencias en la arquitectura y un desarreglo en la histología del hígado respecto al grupo de ratones no obeso.

### a. Análisis histológico del hígado

#### 12.1.1 Análisis Histológico en grupo no obeso (S)

En el grupo de ratones no obeso (S), el sub grupo control, 1mg/Kg Fe, 2mg/Kg Fe presentan una histología de hígado normal; presentan una vena portal normal, triada portal normal, vena central normal, y cordones radiados normales.

En el grupo de ratones no obeso en el subgrupo de 4 mg Fe/Kg y 5 mg Fe/Kg, presentan cambios en su histología con respecto al subgrupo control, 1 mg Fe/Kg y 2 mg Fe/Kg.

En el sub grupo 4 mg Fe/Kg y 5 mg Fe/Kg la histología presenta vena portal parcialmente congestionada, triada portal congestionado, vena central parcialmente congestionada y cordones radiados normales.

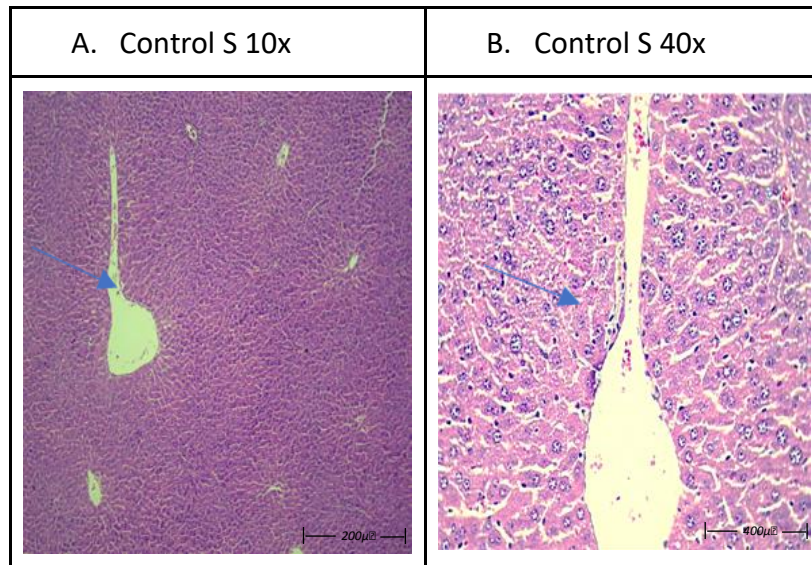


Figura N°10. Histología del subgrupo control: A) Flecha azul: Presenta células ordenadas. B) flecha azul: presenta vena central y C) vena portal normales.

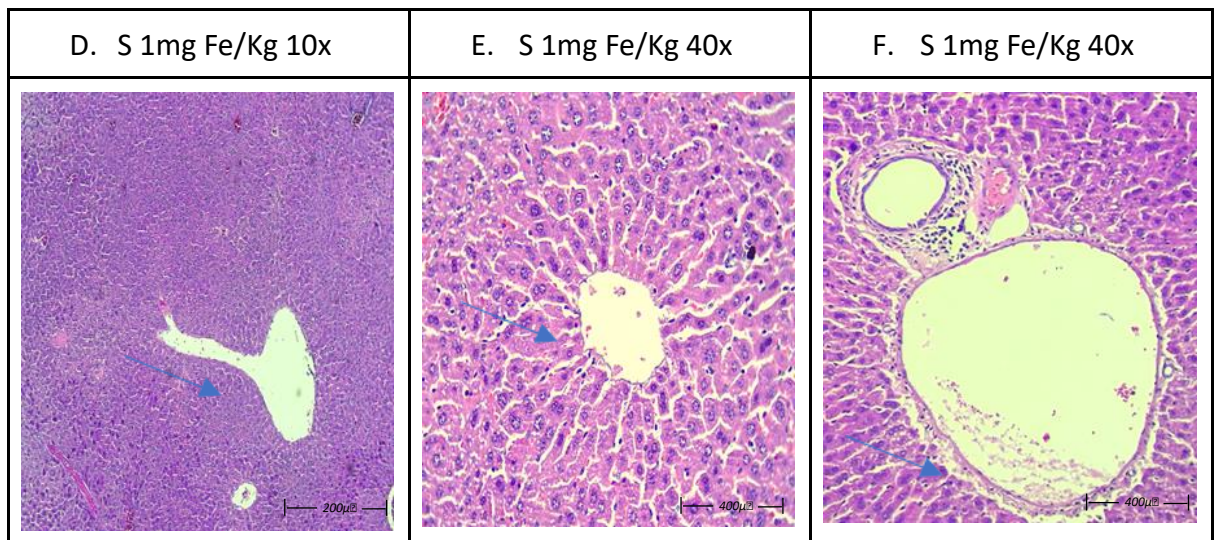


Figura N°11. Histología del subgrupo 1 mg Fe/Kg D) Flecha azul: Presenta células ordenadas, E) Vena central y F) Tríada portal y vena portal normales.

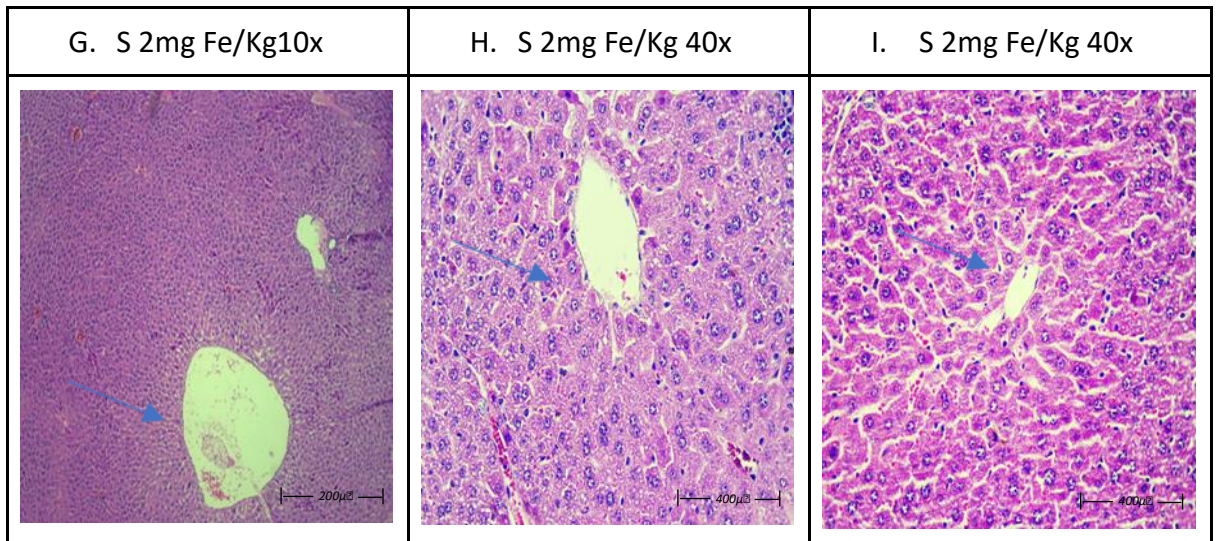


Figura N°12. Histología del subgrupo 2 mg Fe/Kg: Flecha azul G) Presenta células ordenadas, H) vena central triada portal y I) Vena portal normales.

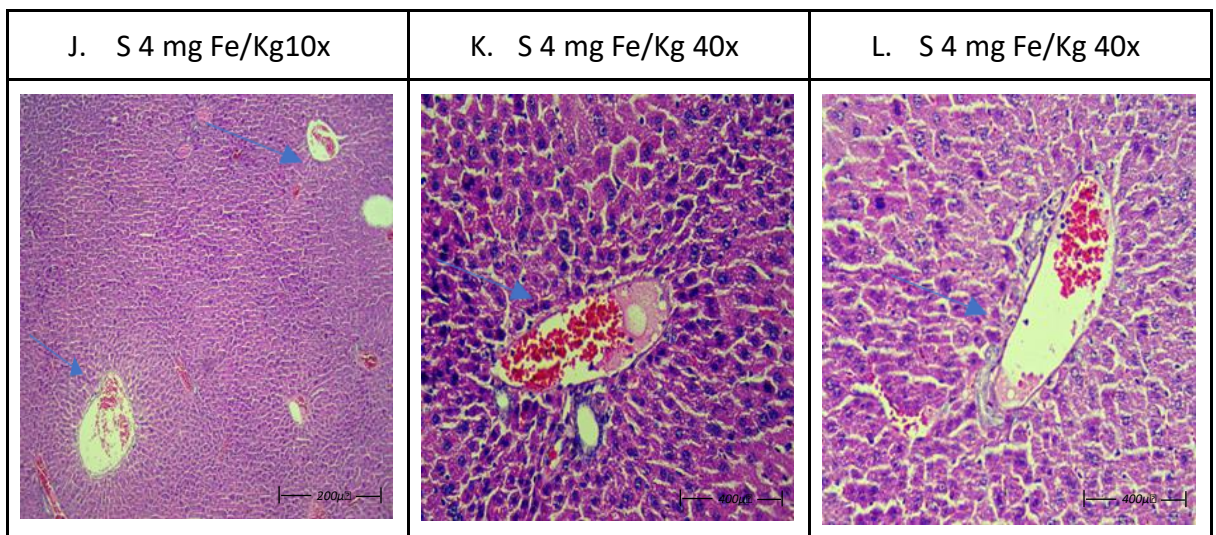


Figura N°13. Histología del subgrupo 4 mg Fe/Kg: Flecha azul J) Presenta células desordenadas, vena central congestionada, K) tríada portal y L) Vena portal congestionada.

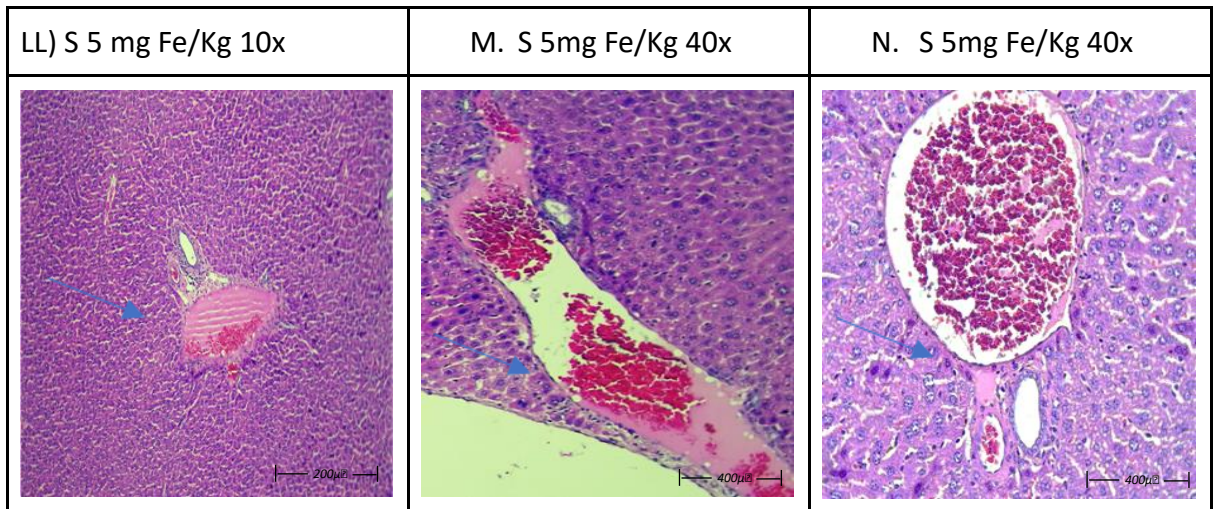


Figura N°14. Histología del subgrupo 5 mg Fe/Kg: Flecha azul LL) Presenta células y tríada portal desordenadas y congestionada, M) vena portal congestionada y N) vena central congestionada.

### 12.1.2 Análisis Histológico en grupo obeso (OB)

La histología del grupo Obesidad (OB) respecto a la dosis control, 1mg Fe/Kg presenta una vena central y portal normales. La vena central y los cordones de Remak se encuentran en disposición radial.

En el grupo obesidad en las dosis 2, 4 y 5 mg Fe/Kg, presenta vena central, triada portal y vena portal congestionada. La disposición radial de los cordones de Remak se ha perdido. Se presentan células inflamatorias, pérdida de la forma de los hepatocitos y acumulación de grasa.

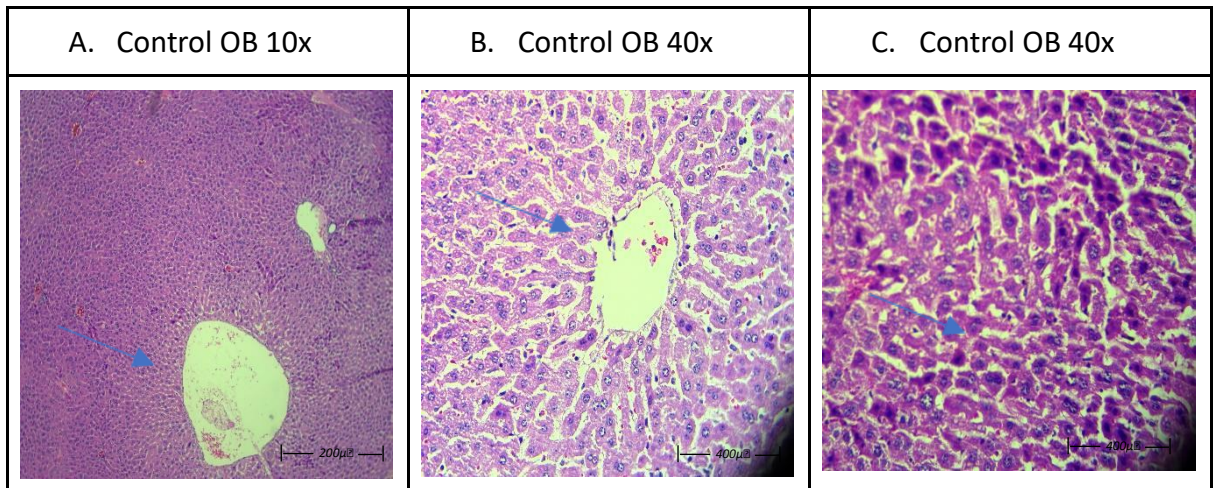


Figura N°15. Flecha azul A) y B) Vena central normal y C) disposición de cordones radiados normales.

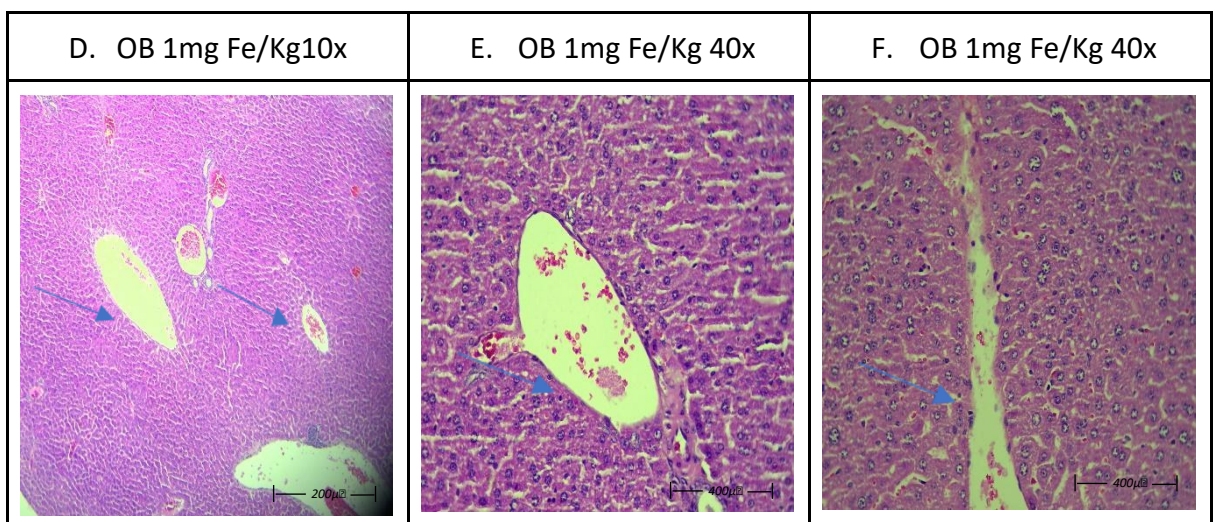


Figura N°16. Flecha azul: D) y E) Vena central con congestión parcial , F) vena portal con congestión parcial.

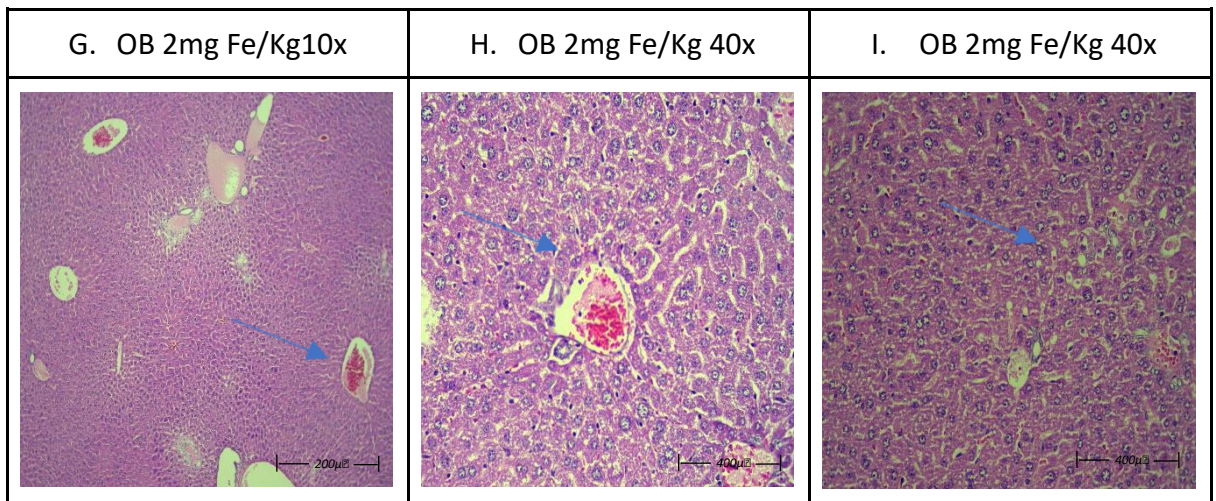


Figura N°17. Fecha azul: G) Vena central congestionada, H) Triada portal congestionada, I) Presencia de acumulación de grasa.

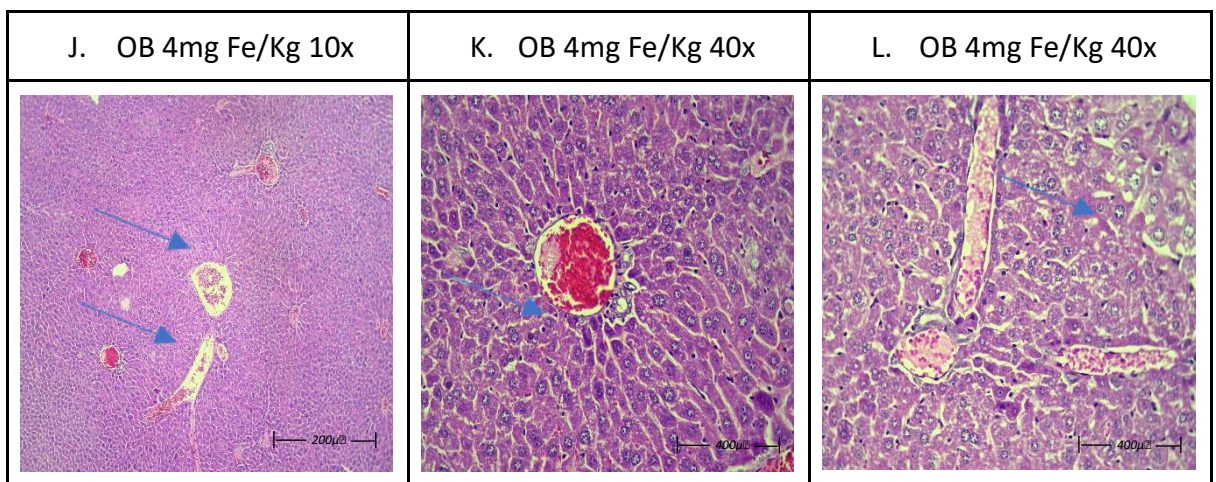


Figura N°18. Fecha azul: J) Vena central y vena portal congestionada, k) Triada portal congestionada, L) disposición de cordones radiados desordenados, presencia de acumulación de grasa y de inflamación portal.

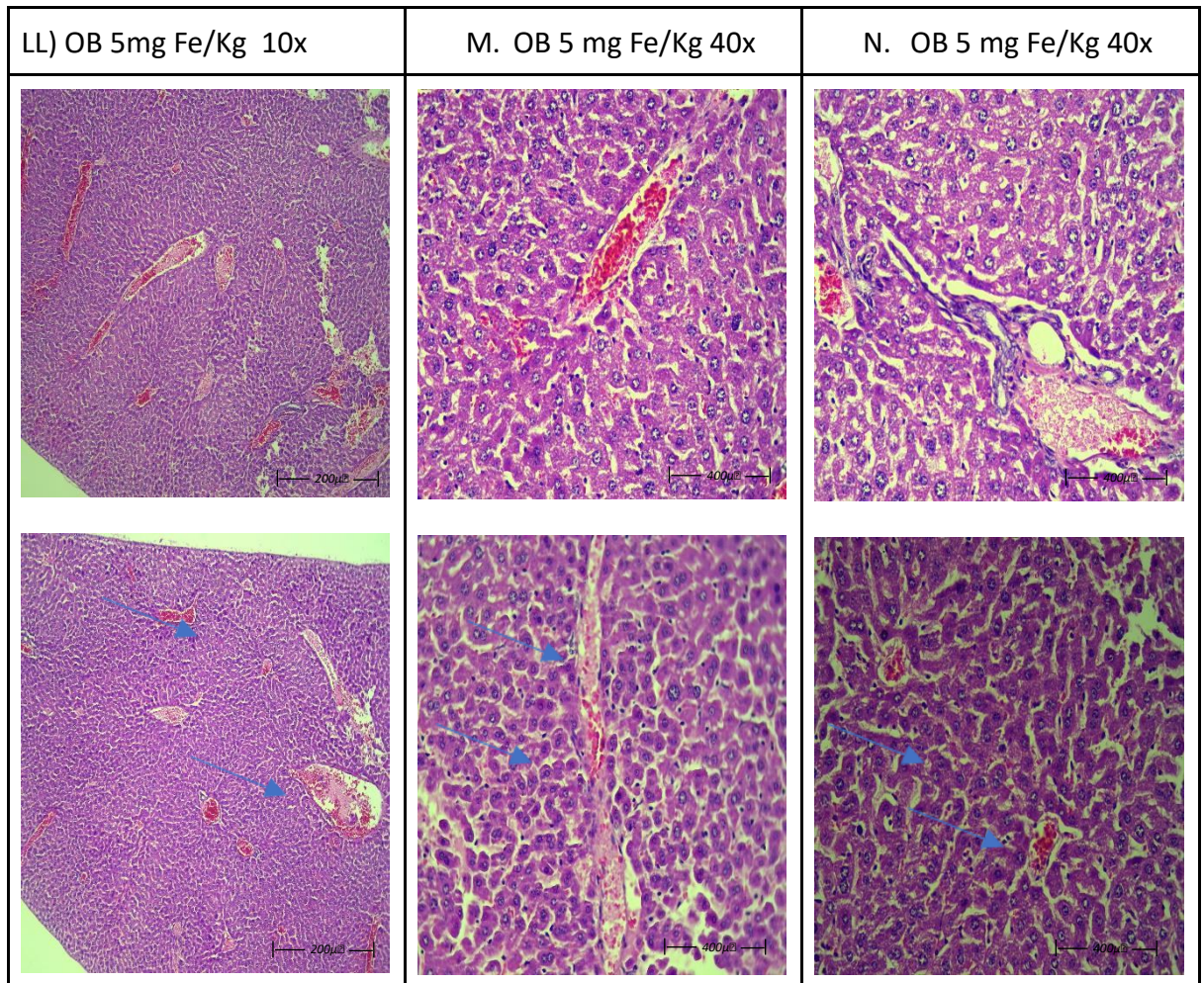


Figura N°19. Flecha azul: LL) Vena central, vena portal y triada portal severamente congestionada. Desarreglo de la arquitectura histológica, M) Rotura de vena central y vena portal, presencia de células inflamatorias, O) Estructura de la triada portal alterada, disposición radial alterada, presencia de acumulación de grasa e infiltración de células inflamatorias.

## 12.2 Análisis histológico del ciego

En la descripción de la histología del ciego se encontró cambios en la estructura del ciego en el grupo de obesos con respecto al grupo no obesos.

### 12.2.1 Análisis Histológico en grupo no obeso(S) no obesos.

En el grupo de ratones no obesos, en el sub grupo control, 1,2 y 4 mg Fe/Kg, se encuentra estructuras normales de las criptas de Lieberkuhn, células de la mucosa, capa muscular circular y capa muscular longitudinal, en el intersticio se encuentran células redondas normales.

En el grupo de ratones no obesos, en el sub grupo 5 mg Fe/Kg presenta alteración en el epitelio de la mucosa y un desordenamiento del epitelio.

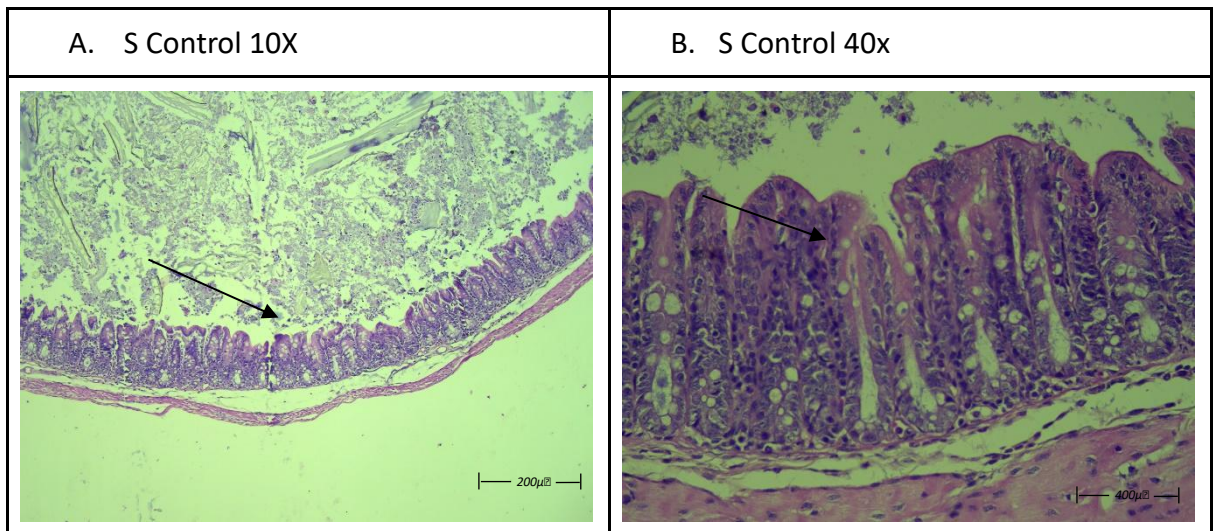


Figura N°20. Flecha: A) Estructura de ciego ordenada, B) Criptas, mucosa, lámina propia y submucosa organizadas.



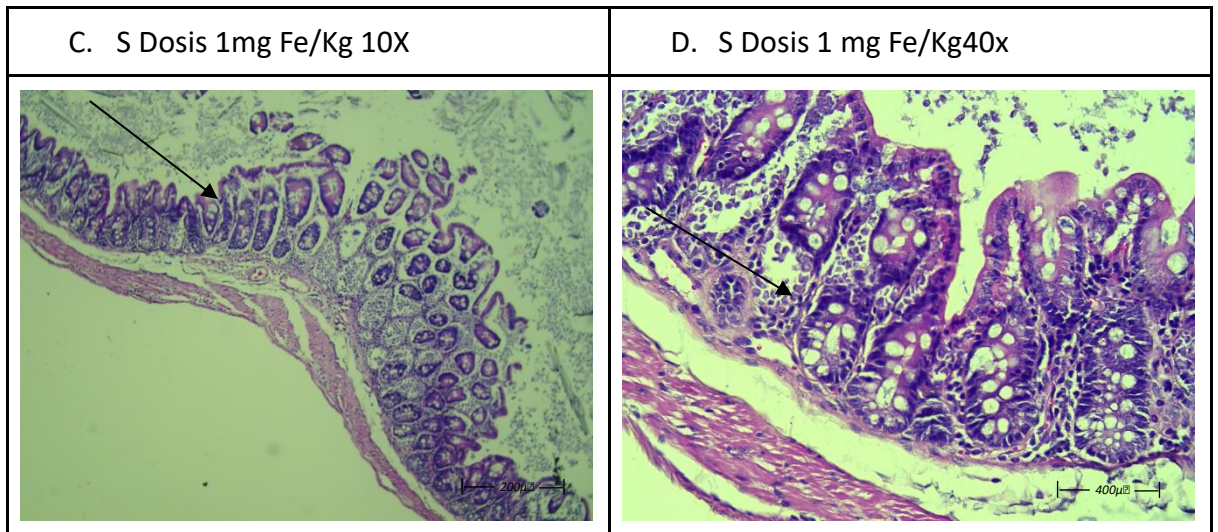


Figura N°21. Flecha: C) Presenta una histología normal, D) Estructura de las criptas, capa muscular lisa y capa muscular circular normales.

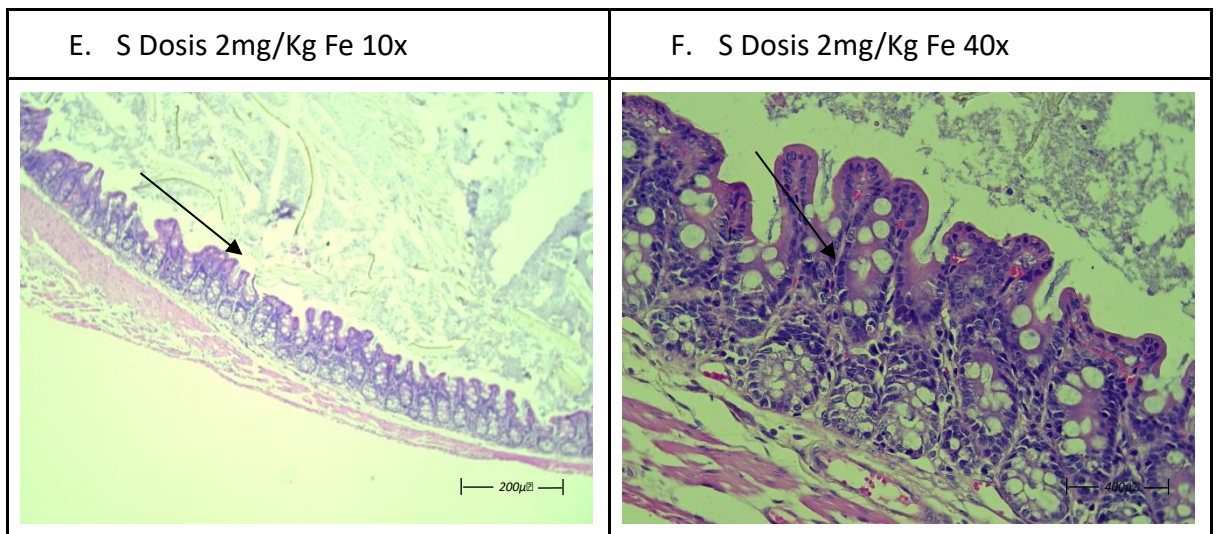


Figura N°22. Flecha: E) Ordenamiento normal del ciego F) Epitelio de la mucosa normal con algunas formaciones vacuolares. Criptas y lámina de la submucosa normales.

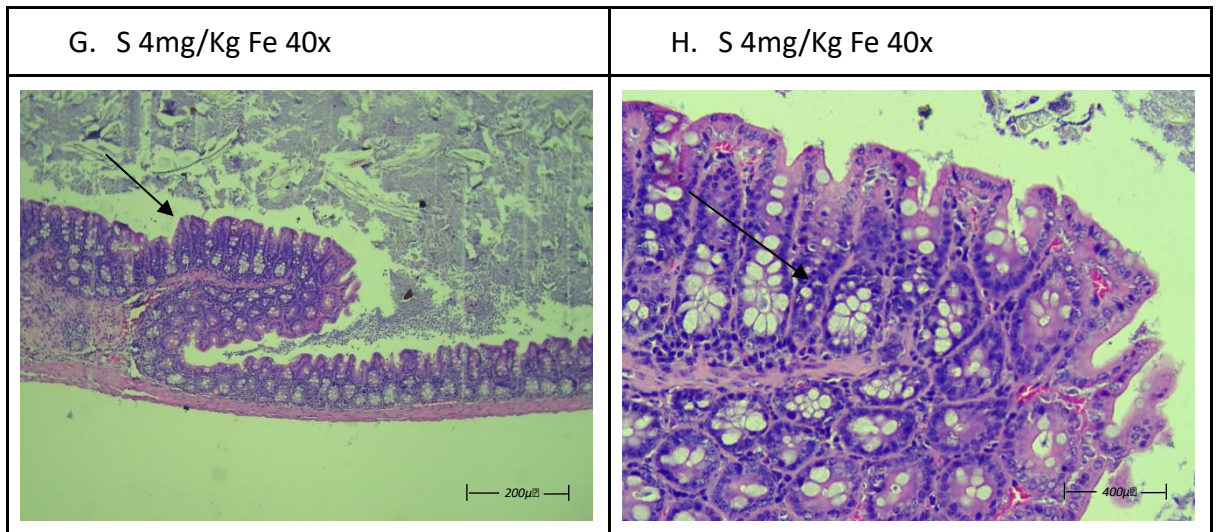


Figura N°23. Flecha: G) Histología normal de ciego, H) Epitelio de la mucosa normal con formaciones vacuolares. Criptas y lámina muscular circular y liso normales.

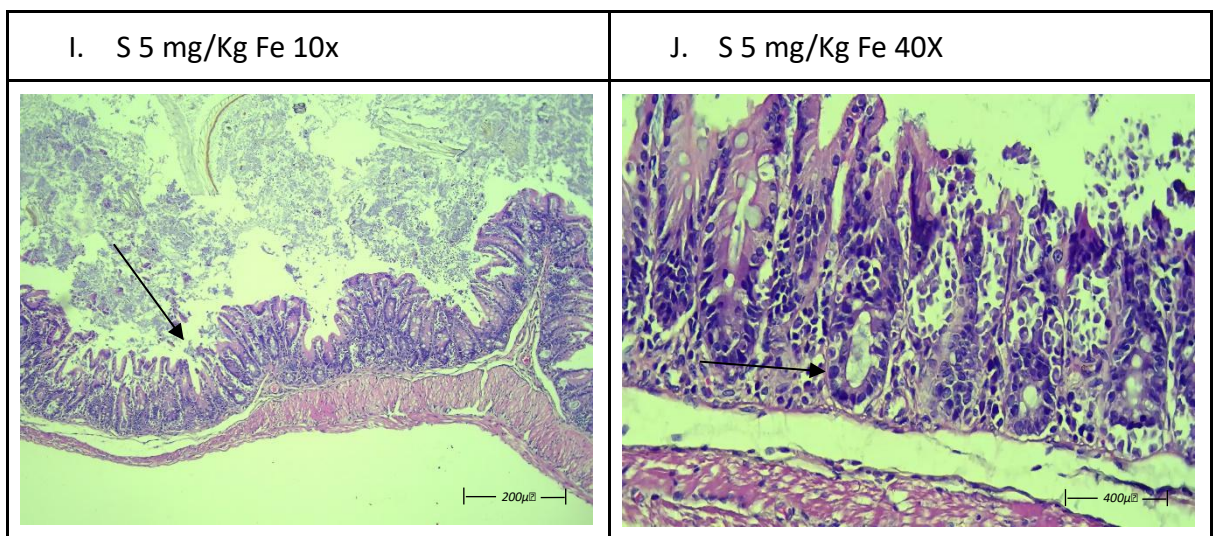


Figura N°24. Flecha: I) Estructura del ciego normal, J) Pérdida de estructura del epitelio de la mucosa, alteración de la estructura en las criptas.

### 12.2.2 Análisis Histológico en grupo obeso (OB)

En el grupo control y las dosis 1 mg/Kg Fe se encontró una arquitectura normal, conservando las estructuras de criptas de Lieberkuhn, células de la mucosa, capa muscular circular y capa muscular longitudinal.

En el grupo de ratones obesos, sub grupo 2, 4 y 5 mg/Kg Fe podemos encontrar pérdida de la estructura de la cripta, incremento de grosor de la capa muscular longitudinal y circular.

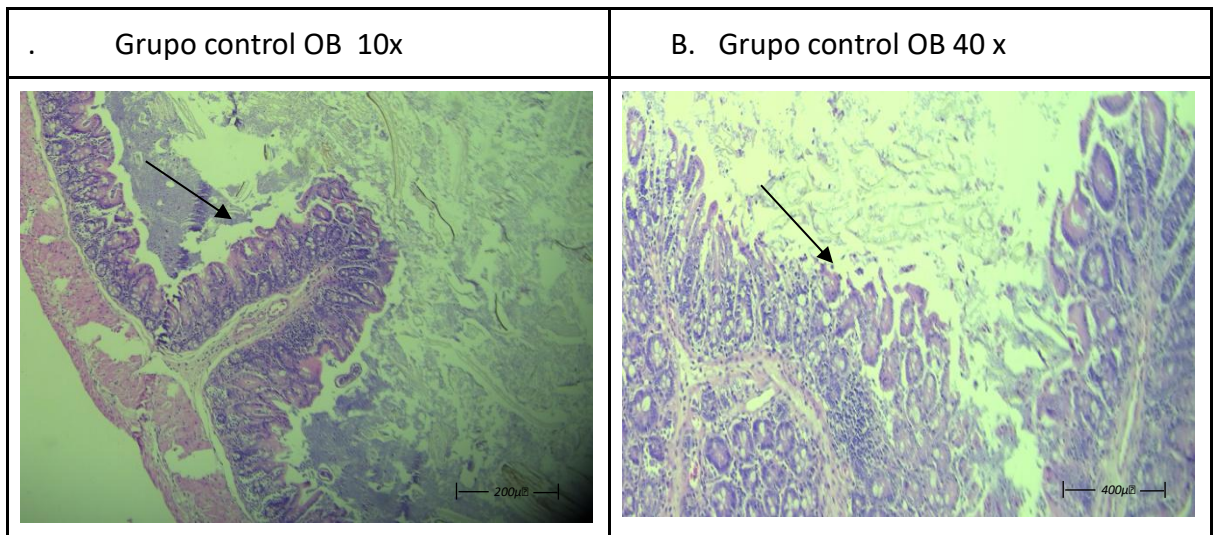


Figura N°25 Flecha: A) Histología de ciego normal B) Criptas, lámina propia y capa de la mucosa normales.

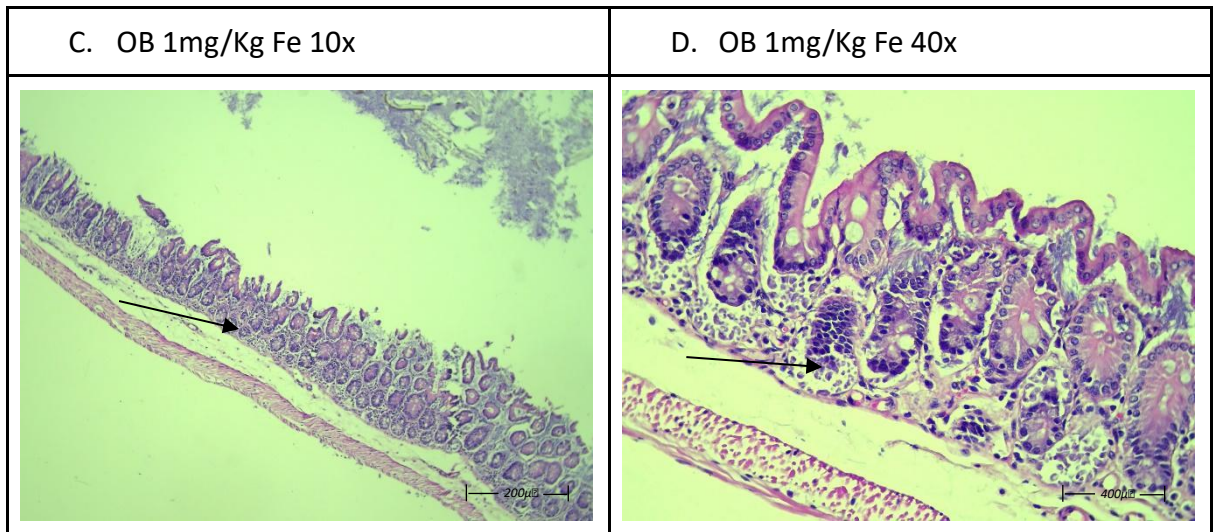


Figura N°26. Flecha: C) Histología del ciego normal, D) Criptas, lámina propia y capa de la mucosa normales.

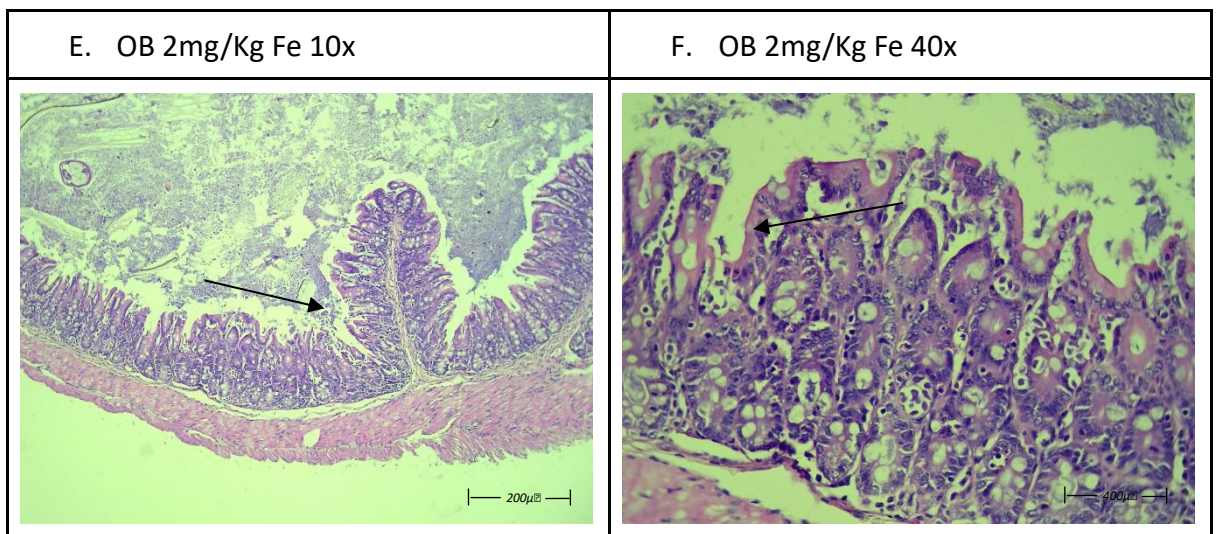


Figura N°27. Flecha: E) Histología del ciego normal, F) Displasia de las criptas y edema de la submucosa.

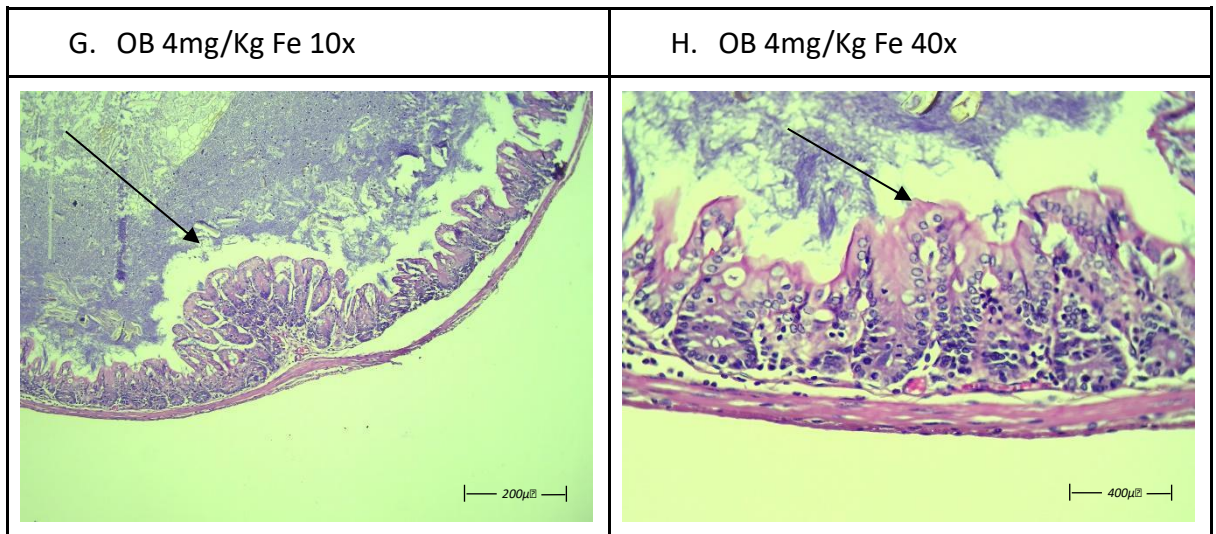


Figura N°28. Flecha: G) Histología del ciego alterada, H) Denudación del epitelio superficial, infiltrado inflamatorio celular denso en la lámina propia y pérdida de estructuras de criptas.

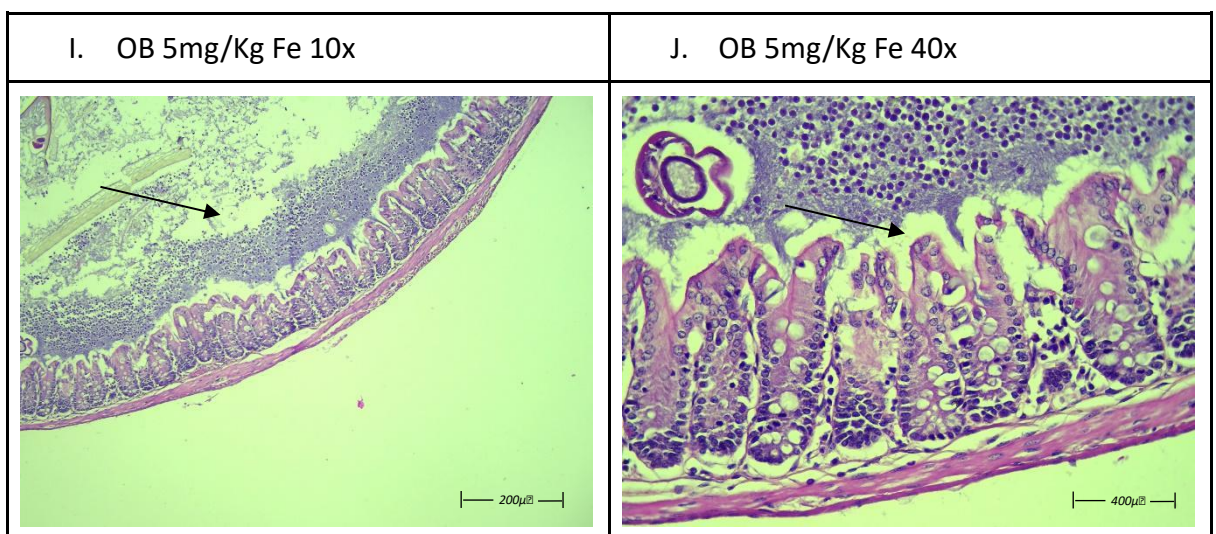


Figura N°29. Flecha. I) Histología del ciego alterada, J) Mucosa duodenal se muestra ligeramente homogenizada, pérdida de estructuras de criptas. Se observa epitelio

mucoso con núcleos sueltos e incremento de grosor de la capa muscular longitudinal y circular.

### **XIII.DISCUSIÓN**

Los resultados del presente estudio demuestran que la ingesta de hierro particularmente a dosis mayores (4-5 mg Fe/Kg peso corporal) si afecta la glicemia y el hematocrito y la histología del ciego y del hígado indicando que el hierro a mayor dosis probablemente ingresa a los tejidos lo que podría llevar a una sobrecarga de hierro. Esta situación parece ser de mayor gravedad en condiciones de obesidad.

La obesidad se asocia a inflamación crónica de bajo grado [60], por lo que se asume que esta inflamación mantiene el hierro en los tejidos de reserva y al parecer la dieta continúa contribuyendo con mayor hierro para dicha reserva aumentando la carga del metal. Esto sin embargo no ha podido ser medido en esta tesis, por lo que en futuros estudios se debería evaluar la carga de hierro en los tejidos.

El peso de los órganos es mayor en ratones inducidos a obesidad o sobrepeso, alimentados con una dieta alta en grasas, que en los grupos de ratones con una dieta estándar y calificados como ratones sanos o no obesos. Esta acumulación de grasa exacerba los pesos del hígado, generado por una inflamación metabólica [61].

En esta tesis se trabajó ratones obesos y no obesos, a quienes se les administró dosis crecientes de sulfato ferroso (0, 1, 2, 4 y 5 mg Fe/Kg). Los resultados del efecto dosis respuesta del sulfato ferroso en un ambiente inflamatorio como la obesidad sugieren una sobreingesta de hierro en órganos como el hígado y ciego tal como lo ha evidenciado Toblli y col. 2015. Ello sin embargo debe ser confirmado en estudios posteriores.

## **EFFECTOS EN EL CIEGO**

Nuestro estudio demuestra que el peso del ciego aumenta conforme se incrementa la dosis de Fe administrada a los ratones. Esto ocurre en obesos y no obesos pero mayor en obesos. Lo mismo se aprecia cuando se hace el estudio histológico, en el grupo de ratones inducidos a obesidad a altas dosis de 4 y 5 mg/kg de Fe hay más cambios histológicos como el engrosamiento de la capa submucosa y mucosa y la desintegración de las criptas de Lieberkühn. Cuando hay exceso de hierro en la dieta y parte importante no es absorbida a nivel duodenal, el exceso de hierro llega a nivel del colon y puede estar afectando su función [62]. Igualmente se sabe que, a nivel del colon, el hierro en exceso puede ser utilizado por las bacterias enteropatógenas produciendo una disbiosis [63].

En un estudio experimental se estudió la deficiencia y la sobrecarga de hierro en ratones y como la suplementación con hierro produce enterocolitis. Los resultados encontrados explican que la sobrecarga de hierro produce colitis (inflamación del colon) y alteró la histología con una acumulación de hierro en las células del ciego. El exceso de hierro induce a un incremento de interleucinas inflamatorias TNF-alfa e IL-1. Esta sobrecarga alteró la microbiota intestinal con el incremento de bacterias perjudiciales como *Tuzzerella* y *Dubosiella* [64]. Tal como lo demuestran los resultados en este estudio en el análisis histológico del ciego, hubo la alteración de la capa submucosa en altas dosis de hierro en los grupos de 4 y 5mg Fe/kg en el grupo de ratones obesos.

La sobrecarga de hierro indujo a una ferroptosis de las células del ciego que fueron cargadas con exceso de hierro alterando la histología de las células [65]. En nuestro estudio comparamos la histología del ciego en el grupo inducido a obesidad con tratamiento de 5 mg hierro/Kg, donde hubo una alteración en la histología del ciego.

Liu (2023) en ratones describió que el incremento de la ingesta de hierro generó un aumento de los niveles de glucosa y esta a su vez aumentó a los marcadores colonoides tumorales. El paso de hierro va relacionado al transportador de glucosa Glut 1 y Piruvato deshidrogenasa Kinasa que puede ser causante principal de generar tumores en el ciego.

El estudio histológico mostró la aparición de adenomas en las células del ciego a una mayor sobrecarga de hierro [66].

De este estudio se puede inferir que reduciendo los niveles de hierro va a generar un control en la glucosa evitando el mayor paso de glucosa por Glut-1, por tanto, no se generará colonoides tumorales. En nuestro estudio se encontró menores niveles de glucosa del grupo de ratones no obesos a comparación del grupo de obesidad que presentan un alto contenido de glucosa luego de la exposición a las mayores dosis de hierro. Justamente el grupo de obesos con mayor ingesta de Fe muestra la mayor alteración histológica del colon.

En nuestro estudio se definió que con dosis mayores de hierro en el grupo de obesidad se incrementaron las alteraciones histológicas a diferencia del grupo de ratones no obesos donde existiendo la alteración, esta fue menor en magnitud.

En estudios experimentales en lechones anémicos, los autores buscaron evaluar los efectos de la suplementación de hierro por vía oral y parenteral y si ocurría una disbiosis intestinal. Los resultados resaltan que la sobrecarga de hierro indujo a un desequilibrio en la microbiota intestinal: Proteobacteria y Escherichia-Shigella y Fusobacterium en lechones suplementados por vía oral y parenteral [67]. Se reportó una correlación entre Fusobacterium, Fusobacteria y Proteobacteria con la carga de hierro en los órganos de ciego y bazo. De la misma manera, en los resultados de nuestro estudio se encuentran que la sobreingesta de hierro afecta la estructura del hígado y ciego.

Este estudio se compara con el presente trabajo por evidenciar la alteración de la arquitectura de las vellosidades intestinales en el colon por una sobrecarga de hierro, además de la correlación entre la sobrecarga de hierro y el incremento de hierro en órganos como bazo y colon.



## EFFECTOS EN EL HÍGADO

El peso del hígado se ve afectado en obesos desde antes del tratamiento con hierro y estos aumentan mucho más particularmente a 5 mg Fe/Kg. Igualmente, la histología del hígado se ve afectada, particularmente a mayor dosis de hierro en hígado de ratones obesos.

La suplementación con 30 mg hierro/Kg en ratas sanas genera sobrecarga de hierro en el hígado, alteración en la histología del hígado evidenciado por la acumulación del hierro que genera el agrandamiento de los hepatocitos, lobulillo hepático desintegrado, alteración de la vena portal e infiltración de células inflamatorias [37].

Igualmente, se ha reportado que la acumulación de hierro en el hígado generado por el exceso en la ingesta de hierro propia de las formulaciones orales, está relacionada con dislipidemias [68].

Los resultados descritos se han podido confirmar con nuestro estudio, donde el peso del hígado aumenta y hay una alteración en la histología del hígado de los animales de experimentación en particular durante la obesidad y a dosis de 5 mg Fe/Kg PC menores a los evaluados previamente [35,68].

Igualmente, en ratas albinas macho que reciben 60 mg/kg de sulfato ferroso [69] se encontró un grave daño hepático, donde la histología del hígado es alterada. En la tinción de Pearls hay una acumulación de hierro en las células hepáticas. En la tinción de H&E aparece una congestión de la vena central, desordenamiento de los cordones hepáticos, degeneración hepatocelular y aparición de células inflamatorias. Los niveles altos de hierro son perjudiciales y generan acumulación de hierro en los tejidos.

En la actualidad existen diversos estudios con propuestas de protección contra los efectos negativos del sulfato ferroso. El tratamiento con dos extractos *Alnus incana* (L.)

y *Moench* tuvieron un efecto protector comparado con el grupo de sulfato ferroso. En el presente estudio se encontró similitud con algunos cambios histológicos con H&E en el hígado con la suplementación de hierro. Sin embargo, no son del todo claro qué efectos tiene seguir suplementando hierro en un tratamiento prolongado. El uso de algunos extractos naturales podría proteger a los tejidos dañados por la sobreingesta de hierro.

## **EFFECTOS SOBRE LA GLUCOSA**

El hierro ingerido en mayores concentraciones generó un incremento de glucosa basal en sangre. Estos resultados se observaron en las dosis de 4 y 5 mg Fe/Kg de ambos grupos, siendo mayor el efecto en el grupo de obesos.

La obesidad y el sobrepeso están asociados a un incremento de hepcidina, que puede deberse al estado inflamatorio de baja intensidad que genera la obesidad o por la presencia de valores más altos de hierro en los tejidos [70].

En ratones deficientes de hepcidina (HAM) y en ratones no obesos suplementados con una dieta alta en grasas por 24 semanas (6 meses), la tolerancia a la glucosa resultó afectada en ambos grupos. No hubo una alteración del peso en el grupo HAM; en el grupo de ratones no obesos hubo mayor daño y acumulación de lípidos en el hígado con una mayor infiltración de células inflamatorias [46]. El exceso de grasa produce inflamación lo que conlleva a niveles muy bajos o deficientes de hepcidina, por lo tanto, habría una mayor absorción de hierro lo que conlleva a una sobrecarga de hierro al organismo.

El autor infiere que en un estado de inflamación como es el caso de la obesidad y la diabetes va a generar una alteración en la homeostasis del hierro, y que por acción de la hepcidina va a evitar la salida del hierro de los tejidos y va a generar una acumulación de hierro en el hígado, alterando su histología y generando inflamación y estrés oxidativo a nivel hepático. Los niveles de glucosa van a permanecer elevados durante mayor tiempo en la sangre debido a que el hígado es capaz de almacenar este

carbohidrato en sus hepatocitos, lo cual generará la alteración en la homeostasis de hierro.

Este hallazgo se contrasta con lo encontrado en nuestro estudio; el incremento de los niveles de hematocrito y el incremento de los niveles de glucosa fueron uno de los hallazgos más importantes, seguido de la alteración de la vesícula congestionada y una inflamación portal en el hígado.

En ratas obesas no diabéticas y ratas diabéticas, se evaluó la alteración histológica y la homeostasis del hierro. En ambos grupos se presentó una alteración histológica similar, y se demostró que la histología del hígado se alteró. Se encontró inflamación en la vena portal, y se vio comprometida la arquitectura de los hepatocitos mostrando una forma moteada en la vena central. En el grupo de ratas con obesidad no diabéticas y de ratas diabéticas se observó esteatosis y fibrosis hepática. Los marcadores de hierro como ferritina, receptor soluble de transferrina y hepcidina se vieron afectados en ambos grupos de estudio [71].

Otros estudios han reportado que la sobreingesta de azúcar más la sobrecarga de hierro por cuatro meses en ratas no interfiere con el aumento de peso ni altera los niveles de glucosa, además tuvieron en cuenta evaluar el daño al ADN y encontraron que no hubo diferencia con el grupo control. El autor resalta que el grupo con solo sobrecarga de hierro tuvo un valor significativo en el incremento del daño al ADN [72].

Este experimento en ratas con sobrecarga de azúcar y hierro difiere de los resultados encontrados en el estudio, cabe resaltar que utilizaron dosis mínimas de hierro y el autor hace énfasis en que controlando las cantidades de hierro puede ayudar a controlar los niveles de glucosa y el control del peso.

Este es un aspecto a tomar en cuenta para definir que la ingesta de hierro puede ser útil hasta cierto nivel y por encima de ello puede generar carga y sobrecarga de hierro en los tejidos.

Las políticas gubernamentales de suplementar con hierro y fortificar alimentos con hierro pueden resultar contraproducente sobre todo cuando se administra a niños y a gestantes no anémicas. La norma del MINSA del 2017 da un mandato imperativo de suplementar con hierro a todos los niños y gestantes sean o no anémicos. También la sobreingesta de hierro puede llevar al incremento de glucosa en sangre sobretodo en poblaciones de niños y adultos obesos.

## **EFFECTOS SOBRE EL HEMATOCRITO**

La obesidad, una enfermedad inflamatoria puede generar anemia por inflamación conocida también como anemia por enfermedad crónica [73].

Sin embargo, en experimentos con ratas inducidas a obesidad, el exceso de peso y el aumento de la masa grasa, paradójicamente va a incrementar los niveles de hematocrito. Se ha sugerido que el tipo de alimentación también es un factor importante en el incremento de los niveles de hematocrito [74].

En nuestro estudio los ratones inducidos a obesidad y suplementados con hierro a altas dosis se incrementan los niveles de hematocrito indicando que el hierro en exceso en la ingesta oral está ingresando al organismo favoreciendo la eritropoyesis.

Aunque es posible pensar que el mayor hematocrito en obesos es debido a hemoconcentración, también nuestros propios resultados demuestran que el hematocrito en obesos aumenta a medida que aumenta la dosis de hierro.

En las dosis bajas de hierro se vio tanto en animales no obesos y obesos un menor incremento del hematocrito luego de 32 días de tratamiento.

En un estudio aleatorizado los marcadores de hierro como ferritina y la transfusión de sangre alogénica (TSA) se incrementaron ante un IMC alto [75], lo que confirma nuestros hallazgos.

## OBESIDAD E INFLAMACIÓN

En un ambiente inflamatorio como en la obesidad, las citoquinas pro inflamatorias incrementan los niveles de la hepcidina, el regulador principal de la absorción del hierro por vía del intestino. Esta cascada inflamatoria al activar la hepcidina va a generar la acumulación de hierro en las células reticuloendoteliales [76] y evitar su salida a la circulación. Igualmente inhibe la absorción duodenal de hierro. La hepcidina al impedir el paso del hierro va a generar que las células almacenadoras dependientes de hierro se saturen de hierro generando daño.

En un estudio de casos y controles los hombres obesos tuvieron mayor expresión de la hepcidina, proteína C reactiva (PCR) e Interleucina 6 (IL-6). Las citocinas proinflamatorias como la IL-6 fueron mayores a diferencia del grupo de no obeso y el grupo de mujeres [77].

En una evaluación de una dieta muy inflamatoria y una dieta menos inflamatoria, los resultados evidencian que una dieta muy inflamatoria disminuye la capacidad total de unión del hierro. En el estudio se infiere que una dieta inflamatoria puede incrementar la cantidad de hierro y evita la unión del hierro a la transferrina [78]. En nuestro estudio utilizamos una dieta hipercalórica para incrementar el peso de los ratones y volverlos obesos, luego del tratamiento con hierro se observó la alteración de la histología y los niveles de glucosa y hematocrito

Las enfermedades como esteatosis hepática se han visto afectadas por la acumulación de hierro en el hígado, por ello investigaron si el hierro en exceso va a afectar a la enfermedad de hígado graso no alcohólico y que se desarrolle la esteatosis hepática. En un estudio en ratas se dividió en grupos por alimentos alto de grasa, alto en hierro y grasas y alto en hierro (0.50 gramos %) durante 30 semanas. La esteatosis, los marcadores inflamatorios y la presencia de células inflamatorias y macrófagos en el hígado se incrementaron en el grupo que recibió una dieta alta en grasas y en el grupo de dieta alta en grasas y en hierro [79]. Este estudio demuestra que el factor de obesidad

va a incrementar más los niveles de hierro sistémico y va a alterar la histología. Nuestro estudio cuya dosis máxima 5 mg Fe/Kg está muy por debajo de lo publicado en el estudio previo [79] no ha mostrado esteatosis hepática, pero sí daño en el tejido hepático asociado a niveles altos de glucosa en sangre particularmente en el grupo de obesidad.

En un estudio con ratones se evaluó los efectos del hierro en ratones obesos, se administró 9 mg Fe/Kg y se trabajó con un grupo control, hierro, dieta alta en grasa y dieta alta en grasas más hierro. Los niveles de glucosa no se alteraron, además de que no hubo un aumento de peso en los grupos de dieta alta en grasas, hierro y dieta alta en hierro y grasas. En el hígado hubo una reducción de lípidos, lo que causó ferroptosis y hubo peroxidación lipídica. Esta sobrecarga evitó la esteatosis hepática y explica que hubo una supresión de genes relacionados a la lipogénesis y este ayudó a evitar el aumento de la adiposidad y por tanto no hubo un aumento de peso [80]. En nuestro estudio una dosis de 5mg/kg de peso corporal fue suficiente para causar alteración, sin embargo, en este estudio no se aprecia un resultado similar, lo que podría deberse a que la cantidad administrada a estos animales fue dentro de su dieta estandarizada diaria y hierro no administrado directamente como en el presente trabajo de investigación.

El hematocrito se afecta a los 30 días, pero no a los 15 días. La glucemia se afecta desde los 15 días demostrando que es un efecto asociado más a la función del hígado como ha sido establecido en otros estudios.

En nuestro estudio, en el análisis de la variación del tiempo en la glucosa y el hematocrito, una posibilidad de aumento del hematocrito es a través de la hemoconcentración. La hemoconcentración es un efecto de la obesidad. Sin embargo, en nuestro estudio se puede descartar este efecto de la obesidad, debido a que el hematocrito se eleva también en el grupo no obeso. Este efecto sobre el hematocrito podría deberse al efecto en la eritropoyesis que tendría el hierro que ingresa al organismo.

La dosis utilizada de hierro puede generar un efecto benéfico y no producir alteraciones en llegar a una esteatosis, a dosis mínimas se puede conseguir no agravar la enfermedad

de obesidad. El estudio es similar a los hallazgos encontrados en nuestro estudio, donde utilizamos dosis mínimas crecientes y se encontró que en las dosis mínimas (1-2 mg Fe/Kg) no hubo un efecto en la alteración de la histología del hígado y ciego además de mantener niveles normales de glucosa.

#### **XIV. FORTALEZAS DEL ESTUDIO**

El estudio incluye la evaluación de un grupo de ratones a quienes se ha generado obesidad y a partir de ese estado se ha controlado con un grupo control, y a pesar de ese estado inflamatorio, el uso de diferentes dosis de hierro muestra un efecto en elevar el hematocrito y la glucemia y afectar la histología del ciego y del hígado.

El estudio tiene la fortaleza de poder controlar variable que no pueden hacerse en humanos, y permite observar que la obesidad no está protegiendo contra un ingreso de exceso de hierro.

#### **XV. LIMITACIONES**

Las limitaciones del estudio es que no se ha podido valorar el estado del hierro midiendo hepcidina, ferritina sérica, receptor soluble de transferrina, con lo cual nos hubiera dado mayores luces para determinar los mecanismos de acción por lo que el hierro causa daño a nivel de los tejidos hepáticos y del bazo.

Igualmente, se requiere conocer cuánto hierro hay en los tejidos para saber exactamente cuánto está ingresando de hierro a los tejidos de acuerdo a cada dosis inoculada durante el tratamiento a los animales experimentales.

## **XVI. CONCLUSIONES**

- La dosis mínima a partir del cual se altera el peso del ratón y de los órganos al final del tratamiento con Sulfato Ferroso en ratones no obesos fue de 5 mg Fe/Kg y en obesos machos fue de 2 mg Fe/Kg peso corporal.
- La dosis mínima a partir del cual se altera la glucemia al final del tratamiento con sulfato ferroso en controles fue de 5 mg Fe/Kg y en obesos machos fue de 2 mg Fe/Kg
- La dosis mínima del sulfato ferroso a partir del cual se altera el hematocrito del tratamiento con sulfato ferroso en ratones normales es de 5 mg Fe/Kg y obesos es de 1mg Fe/Kg y 5 mg Fe/Kg.

## **XVII. RECOMENDACIONES**

- Realizar un hemograma completo para futuros trabajos de investigación.
- Evaluar el contenido de hierro en los tejidos de hígado y ciego a futuro.
- Incluir el método de inducción a obesidad utilizado en el presente trabajo a futuros trabajos de investigación.
- Llevar un adecuado control de la ingesta de hierro en el alimento en futuras investigaciones.



## XVIII. REFERENCIAS

1. Kulkarni A, Khade M, Arun S, Badami P, Kumar GRK, Dattaroy T, Soni B, Dasgupta S. An overview on mechanism, cause, prevention and multi-nation policy level interventions of dietary iron deficiency. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62(18):4893-4907.
2. World Bank. Prevalence of anemia among women of reproductive age (%). <https://data.worldbank.org/indicator/SH.ANM.ALLW.ZS>. 2016.
3. World Bank. Prevalence of anemia among pregnant women (%). <https://data.worldbank.org/indicator/SH.PRG.ANEM>. 2016.
4. World Bank. Prevalence of Anemia among Children (%). <https://data.worldbank.org/indicator/SH.ANM.CHLD.ZS>. 2016.
5. Kumar A, Sharma E, Marley A, Samaan MA, Brookes MJ. Iron deficiency anaemia: pathophysiology, assessment, practical management. *BMJ Open Gastroenterol.* 2022 Jan;9(1): e000759.
6. Madu AJ, Ughasoro MD. Anaemia of Chronic Disease: An In-Depth Review. *Med Princ Pract.* 2017;26(1):1-9
7. Fairweather-Tait S, Sharp P. Iron. En: *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier; 2021. p. 219–50.
8. Chaparro CM, Suchdev PS. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Aug;1450(1):15-31.
9. Petry N, Olofin I, Hurrell RF, Boy E, Wirth JP, Moursi M, Donahue Angel M, Rohner F. The Proportion of Anemia Associated with Iron Deficiency in Low, Medium, and High Human Development Index Countries: A Systematic Analysis of National Surveys. *Nutrients.* 2016 Nov 2;8(11):693.

10. Centers for Disease Control (CDC). CDC criteria for anemia in children and childbearing-aged women. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1989 Jun 9;38(22):400-4
11. Choque-Quispe BM, Paz V, Gonzales GF. Proportion of anemia attributable to iron deficiency in high-altitude infant populations. *Ann Hematol.* 2019 Nov;98(11):2601-2603.
12. National Institute of Statistics and Informatics (2022). <https://www.gob.pe/institucion/inei/informes-publicaciones/4233597-peru-encuesta-demografica-y-de-salud-familiar-endes-2022>
13. Pasricha S-R, Tye-Din J, Muckenthaler MU, Swinkels DW. Iron deficiency. *Lancet.* 2021;397(10270):233–48.
14. Ems T, St Lucia K, Huecker MR. Biochemistry, Iron Absorption. 2023 Apr 17. In: StatPearls
15. Mu Q, Chen L, Gao X, Shen S, Sheng W, Min J, Wang F. The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease. *Sci Bull (Beijing).* 2021 Sep 15;66(17):1806-1816.
16. Badria FA, Ibrahim AS, Badria AF, Elmarakby AA. Curcumin attenuates iron accumulation and oxidative stress in the liver and spleen of chronic iron-overloaded rats. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134156.
17. Gao H, Jin Z, Bandyopadhyay G, Wang G, Zhang D, Rocha KCE, Liu X, Zhao H, Kisseleva T, Brenner DA, Karin M, Ying W. Aberrant iron distribution via hepatocyte-stellate cell axis drives liver lipogenesis and fibrosis. *Cell Metab.* 2022 Aug 2;34(8):1201-1213.e5.
18. Lönnerdal B, Georgieff MK, Hernell O. Developmental physiology of iron absorption, homeostasis, and metabolism in the healthy term infant. *J Pediatr.* 2015;167(4):S8–14.

19. Seyoum Y, Baye K, Humblot C. Iron homeostasis in host and gut bacteria – a complex interrelationship. *Gut Microbes*. 2021;13(1)
20. Srole DN, Ganz T. Estructura, función y fisiología de la eritroferrona: homeostasis del hierro y más. *Fisiol de células J*. 2021 julio;236(7):4888-4901.
21. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin and Iron in Health and Disease. *Annu Rev Med*. 2023 Jan 27;74:261-277.
22. Zhao Y, Zhao J, Ma H, Han Y, Xu W, Wang J, Cai Y, Jia X, Jia Q, Yang Q. High Hepcidin Levels Promote Abnormal Iron Metabolism and Ferroptosis in Chronic Atrophic Gastritis. *Biomedicines*. 2023 Aug 22;11(9):2338
23. Tolkien Z, Stecher L, Mander AP, Pereira DI, Powell JJ. Ferrous sulfate supplementation causes significant gastrointestinal side-effects in adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015 Feb 20;10(2):e0117383
24. Rametta R, Dongiovanni P, Pelusi S, Francione P, Iuculano F, Borroni V, Fatta E, Castagna A, Girelli D, Fargion S, Valenti L. Hepcidin resistance in dysmetabolic iron overload. *Liver Int*. 2016 Oct;36(10):1540-8.
25. Ginzburg YZ. Eje hepcidina-ferroportina en salud y enfermedad. *Vitam Horm*. 2019;110:17-45.
26. Hsu CC, Senussi NH, Fertrin KY, Kowdley KV. Iron overload disorders. *Hepatol Commun*. 2022 Aug;6(8):1842-1854.
27. Elstrott B, Khan L, Olson S, Raghunathan V, DeLoughery T, Shatzel JJ. The role of iron repletion in adult iron deficiency anemia and other diseases. *Eur J Haematol*. 2020;104(3):153–61
28. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight>.

29. Instituto Nacional de Estadística e Informática-Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (ENDES), Perú: Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles (2013 - 2022). Lima- Perú; 2014-2023.
30. Marku A, Galli A, Marciani P, Dule N, Perego C, Castagna M. Metabolismo del hierro en la función y disfunción de las células beta pancreáticas. *Células*. 22 de octubre de 2021; 10 (11): 2841.
31. Harrison AV, Lorenzo FR, McClain DA. Iron and the Pathophysiology of Diabetes. *Annu Rev Physiol*. 2023 Feb 10;85:339-362.
32. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R, Yin X, Xu Q. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Apr 21;14:1161521.
33. Zhang L, Dai X, Wang L, Cai J, Shen J, Shen Y, Li X, Zhao Y. Iron overload accelerated lipid metabolism disorder and liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Front Nutr*. 2022 Oct 11;9:961892.
34. Zhang Z, Funcke JB, Zi Z, Zhao S, Straub LG, Zhu Y, Zhu Q, Crewe C, An YA, Chen S, Li N, Wang MY, Ghaben AL, Lee C, Gautron L, Engelking LJ, Raj P, Deng Y, Gordillo R, Kusminski CM, Scherer PE. Adipocyte iron levels impinge on a fat-gut crosstalk to regulate intestinal lipid absorption and mediate protection from obesity. *Cell Metab*. 2021 Aug 3;33(8):1624-1639.e9.
35. Gholampour F, Behzadi Ghiasabadi F, Owji SM, Vatanparast J. El efecto protector del extracto hidroalcohólico de jengibre ( *Zingiber officinale* Rosc.) contra los daños funcionales e histológicos inducidos por el hierro en el hígado y el riñón de rata. *Avicena J Phytomed*. 2017 noviembre-diciembre;7(6):542-553.
36. Raffoul J, Allaham S, Almanadili A, Chamaa S. Lisinopril protects the liver against functional disorders and histological damages induced by ferrous sulfate in rats. *IJPSR*, 2022; Vol. 13(10): 4178-4186.

37. Yu Y, Jiang L, Wang H, Shen Z, Cheng Q, Zhang P, Wang J, Wu Q, Fang X, Duan L, Wang S, Wang K, An P, Shao T, Chung RT, Zheng S, Min J, Wang F. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis. *Blood*. 2020 Aug 6;136(6):726-739.
38. Wasito H, Baroroh HN, Sandiani YR. Effect of ethanol extract of green tea (*Camellia sinensis*) to lowering iron level in ferrous sulfate induced male rats. *Acta Pharm Indo*. 2020; 8(2):53. Disponible en: <http://jos.unsoed.ac.id/index.php/api/article/view/3226>
39. Chen M, Zheng J, Liu G, Zeng C, Xu E, Zhu W, Anderson GJ, Chen H. High Dietary Iron Disrupts Iron Homeostasis and Induces Amyloid- $\beta$  and Phospho- $\tau$  Expression in the Hippocampus of Adult Wild-Type and APP/PS1 Transgenic Mice. *J Nutr*. 2019 Dec 1;149(12):2247-2254.
40. Toblli JE, Cao G, Angerosa M. Ferrous sulfate, but not iron polymaltose complex, aggravates local and systemic inflammation and oxidative stress in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2015 May 7;9:2585-97.
41. Falahati V, Ghasemi A, Ghaffari K, Eghbali A, Khodabakhshi S, Almasi-Hashiani A, Sadeghi-Sedeh B, Shanbehzadeh M. Comparison of the effect of ferrous sulfate and ferrous gluconate on prophylaxis of iron deficiency in toddlers 6-24 months old: A randomized clinical trial. *J Educ Health Promot*. 2022 Nov 26;11:368.
42. Gambaro RC, Seoane A, Padula G. Vitamin E protective effects on genomic and cellular damage caused by paediatric preventive supplementation for anaemia: an experimental model. *Br J Nutr*. 2023 Feb 14;129(3):468-477.
43. Seltzer CC, Mayer J. SERUM IRON AND IRON-BINDING CAPACITY IN ADOLESCENTS. II. COMPARISON OF OBESE AND NONOBESE SUBJECTS. *Am J Clin Nutr*. 1963 Dec;13:354-61.

44. Berton PF, Gambero A. Hecpidina e inflamación asociada con la deficiencia de hierro en la obesidad infantil: una revisión sistemática. *J Pediatr (Río J)*. 1 de agosto de 2023: S0021-7557(23)00084-0.
45. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 27;24(1):449.
46. James JV, Varghese J, John NM, Deschemin JC, Vaulont S, McKie AT, Jacob M. Insulin resistance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat diet are attenuated in the absence of hepcidin. *J Nutr Biochem*. 2023 Jan;111:109175.
47. Hilton C, Sabaratnam R, Drakesmith H, Karpe F. Iron, glucose and fat metabolism and obesity: an intertwined relationship. *Int J Obes (Lond)*. 2023 Jul;47(7):554-563.
48. Alshwaiyat NM, Ahmad A, Al-Jamal HAN. Effect of diet-induced weight loss on iron status and its markers among young women with overweight/obesity and iron deficiency anemia: a randomized controlled trial. *Front Nutr*. 2023 May 22;10:1155947.
49. Doulberis M, Papaefthymiou A, Polyzos SA, Katsinelos P, Grigoriadis N, Srivastava DS, Kountouras J. Rodent models of obesity. *Minerva Endocrinol*. 2020 Sep;45(3):243-263.
50. Cohen, J. (1998) *Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale
51. Song JX, An JR, Chen Q, Yang XY, Jia CL, Xu S, Zhao YS, Ji ES. Liraglutide attenuates hepatic iron levels and ferroptosis in db/db mice. *Bioengineered*. 2022 Apr;13(4):8334-8348.
52. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB, Ruhren R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environ Health*. 1986;18(2):161-88.

53. Punj S, Ghafourian K, Ardehali H. Iron deficiency and supplementation in heart failure and chronic kidney disease. *Mol Aspects Med.* 2020 Oct;75:100873.
54. Donovan J, Brown P. Care and handling of laboratory mice. *Curr Protoc Microbiol.* 2013 Nov 5;31:A.3N.1-A.3N.18.
55. Rozman J, Rathkolb B, Neschen S, Fuchs H, Gailus-Durner V, Klingenspor M, Wolf E, Hrabě de Angelis M. Glucose tolerance tests for systematic screening of glucose homeostasis in mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2015 Mar 2;5(1):65-84.
56. Adams S, Pacharinsak C. Anestesia y analgesia en ratones. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2015 2 de marzo; 5 (1): 51-63.
57. Mark M, Teletin M, Antal C, Wendling O, Auwerx J, Heikkinen S, Khetchoumian K, Argmann CA, Dgheem M. Histopathology in mouse metabolic investigations. *Curr Protoc Mol Biol.* 2007. Chapter 29(1):Unit 29B.4
58. Das A, Chaudhuri D, Ghate NB, Panja S, Chatterjee A, Mandal N. Protective effect of *Clerodendrum colebrookianum* leaves against iron-induced oxidative stress and hepatotoxicity in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol.* 2015 May;53(5):281-91.
59. Rasmussen H, Dirven HA, Grant D, Johnsen H, Midtvedt T. Etiology of cecal and hepatic lesions in mice after administration of gas-carrier contrast agents used in ultrasound imaging. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 May 1;188(3):176-84.
60. Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity.* 2022 Jan 11;55(1):31-55
61. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, Gruben N, Youssef SA, de Bruin A, Hofker MH, Kleemann R, Koonen DP, Heeringa P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY).* 2015 Apr;7(4):256-68.
62. Vir P, Kaur J, Mahmood A. Effect of chronic iron ingestion on the development of brush border enzymes in rat intestine. *Toxicol Mech Methods.* 2007;17(7):393-9.

63. Malesza IJ, Bartkowiak-Wieczorek J, Winkler-Galicki J, Nowicka A, Dzięciołowska D, Błaszczuk M, Gajniak P, Słowińska K, Niepolski L, Walkowiak J, Mądry E. The Dark Side of Iron: The Relationship between Iron, Inflammation and Gut Microbiota in Selected Diseases Associated with Iron Deficiency Anaemia-A Narrative Review. *Nutrients*. 2022 Aug 24;14(17):3478.
64. Gu K, Wu A, Yu B, Zhang T, Lai X, Chen J, Yan H, Zheng P, Luo Y, Luo J, Pu J, Wang Q, Wang H, Chen D. Iron overload induces colitis by modulating ferroptosis and interfering gut microbiota in mice. *Sci Total Environ*. 2023 Dec 20;905:167043. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167043. Epub 2023 Sep 17. PMID: 37717771.
65. Seiwert N, Adam J, Steinberg P, Wirtz S, Schwerdtle T, Adams-Quack P, Hövelmeyer N, Kaina B, Foersch S, Fahrner J. Chronic intestinal inflammation drives colorectal tumor formation triggered by dietary heme iron in vivo. *Arch Toxicol*. 2021 Jul;95(7):2507-2522.
66. Liu Z, Villareal L, Goodla L, Kim H, Falcon DM, Haneef M, Martin DR, Zhang L, Lee HJ, Kremer D, Lyssiotis CA, Shah YM, Lin HC, Lin HK, Xue X. Iron promotes glycolysis to drive colon tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2023 Dec;1869(8):166846.
67. Dong Z, Liu S, Deng Q, Li G, Tang Y, Wu X, Wan D, Yin Y. Role of iron in host-microbiota interaction and its effects on intestinal mucosal growth and immune plasticity in a piglet model. *Sci China Life Sci*. 2023 Sep;66(9):2086-2098. doi: 10.1007/s11427-022-2409-0. Epub 2023 Jul 28. PMID: 37530911.
68. Lo JO, Benson AE, Martens KL, Hedges MA, McMurry HS, DeLoughery T, Aslan JE, Shatzel JJ. The role of oral iron in the treatment of adults with iron deficiency. *Eur J Haematol*. 2023 Feb;110(2):123-130.
69. Abo-Elghiet F, Mohamed SA, Yasin NAE, Temraz A, El-Tantawy WH, Ahmed SF. The effect of *Alnus incana* (L.) Moench extracts in ameliorating iron overload-induced hepatotoxicity in male albino rats. *Sci Rep*. 2023 May 11;13(1):7635.
70. Mahmmod M, Sarhat E. HEPCIDIN AND FERRITIN MODULATED IN OBESE MALE. *Georgian Med News*. 2023 Nov;(344):114-118.



71. Yu Y, Jiang L, Wang H, Shen Z, Cheng Q, Zhang P, Wang J, Wu Q, Fang X, Duan L, Wang S, Wang K, An P, Shao T, Chung RT, Zheng S, Min J, Wang F. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis. *Blood*. 2020 Aug 6;136(6):726-739.
72. Zhang L, Dai X, Wang L, Cai J, Shen J, Shen Y, Li X, Zhao Y. Iron overload accelerated lipid metabolism disorder and liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Front Nutr*. 2022 Oct 11;9:961892.
73. Zhang Z, Funcke JB, Zi Z, Zhao S, Straub LG, Zhu Y, Zhu Q, Crewe C, An YA, Chen S, Li N, Wang MY, Ghaben AL, Lee C, Gautron L, Engelking LJ, Raj P, Deng Y, Gordillo R, Kusminski CM, Scherer PE. Adipocyte iron levels impinge on a fat-gut crosstalk to regulate intestinal lipid absorption and mediate protection from obesity. *Cell Metab*. 2021 Aug 3;33(8):1624-1639.e9.
74. Zhao Y, Zhao J, Ma H, Han Y, Xu W, Wang J, Cai Y, Jia X, Jia Q, Yang Q. High Hepcidin Levels Promote Abnormal Iron Metabolism and Ferroptosis in Chronic Atrophic Gastritis. *Biomedicines*. 2023 Aug 22;11(9):2338
75. Zhou Z, Zhang H, Chen K, Liu C. Iron status and obesity-related traits: A two-sample bidirectional Mendelian randomization study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Feb 14;14:985338.
76. Cavaliere G, Cimmino F, Trinchese G, Catapano A, Petrella L, D'Angelo M, Lucchin L, Mollica MP. From Obesity-Induced Low-Grade Inflammation to Lipotoxicity and Mitochondrial Dysfunction: Altered Multi-Crosstalk between Adipose Tissue and Metabolically Active Organs. *Antioxidants (Basel)*. 2023 May 29;12(6):1172.
77. Hassan A-K. IS HEPCIDIN INDUCED ANEMIA IN OBESE INDIVIDUAL. *Ann. For. Res*. 2022 65(1): 1680-1687

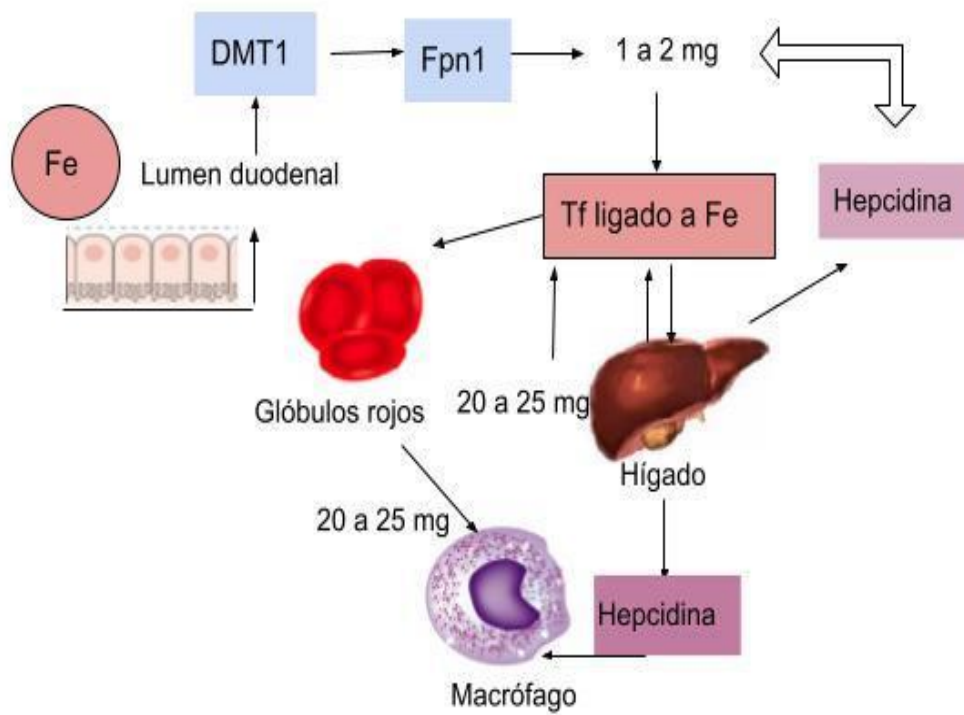
78. Doherty JL, Larvie DY, Shivappa N, Hebert JR, Armah SM. Inflammatory diets are associated with lower total iron binding capacity in sera of young adults. *Int J Vitam Nutr Res.* 2023 Feb;93(1):9-17.
79. Atarashi M, Izawa T, Miyagi R, Ohji S, Hashimoto A, Kuwamura M, Yamate J. Dietary Iron Supplementation Alters Hepatic Inflammation in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients.* 2018 Feb 4;10(2):175.
80. Ma W, Jia L, Xiong Q, Du H. Iron Overload Protects from Obesity by Ferroptosis. *Foods.* 2021 Aug 1;10(8):1787.

## XIX. ANEXOS

Anexo N°1: Toma de peso de los animales



Anexo N°2: Mecanismo de absorción del hierro



Mecanismo de absorción de hierro [53]

### Anexo N°3: Procedimiento experimentales

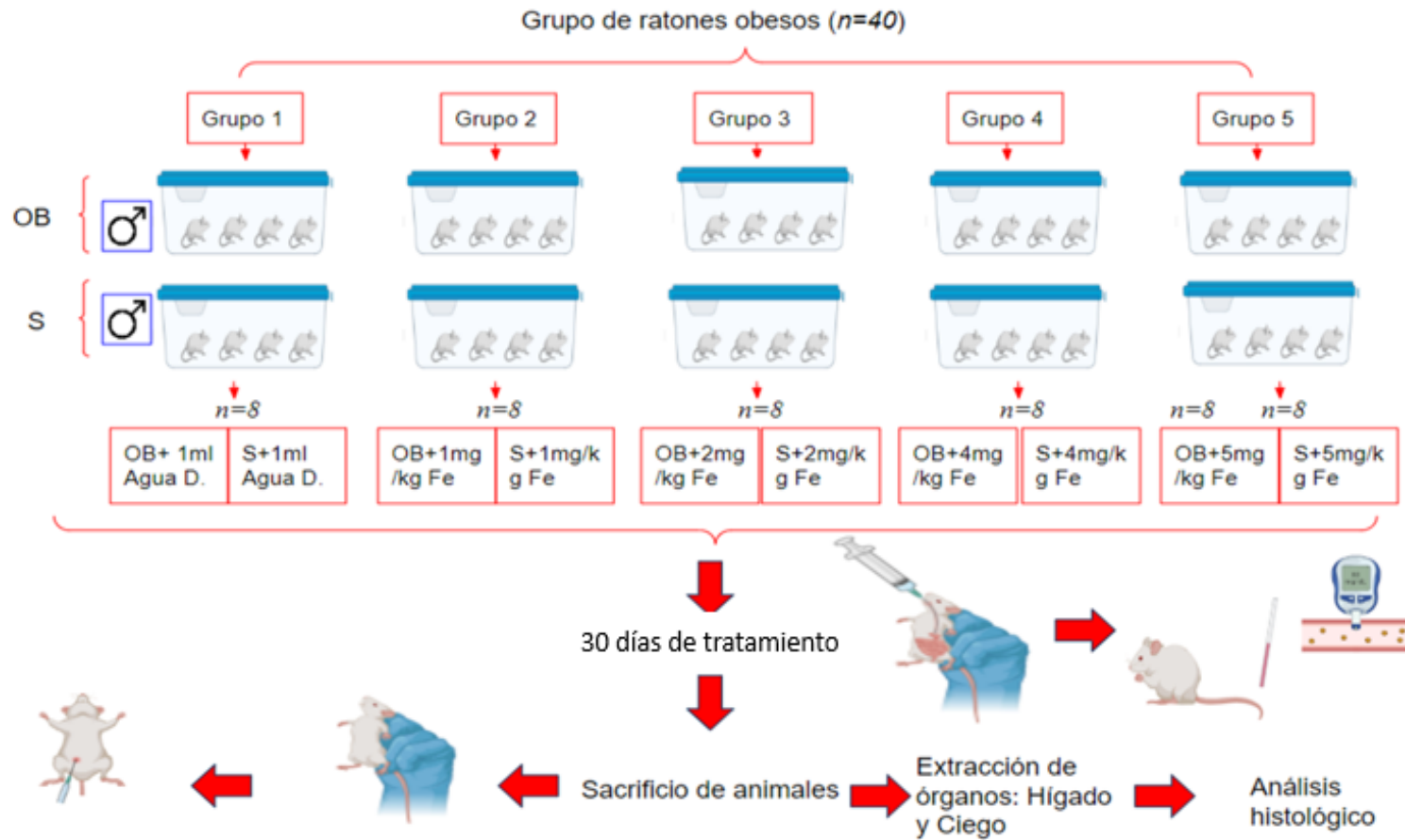


Figura N°1: Procedimiento experimental

## Anexo N° 4: Órganos extraídos

### 1.1. Órganos extraídos

Figuras de los órganos del grupo obesidad (OB)(S)



Figura N°2: Órgano ciego del grupo control OB y S



Figura N°3: Órgano hígado del grupo control OB



Figura N°4: Órgano ciego del grupo 1 mg/Kg Fe OB

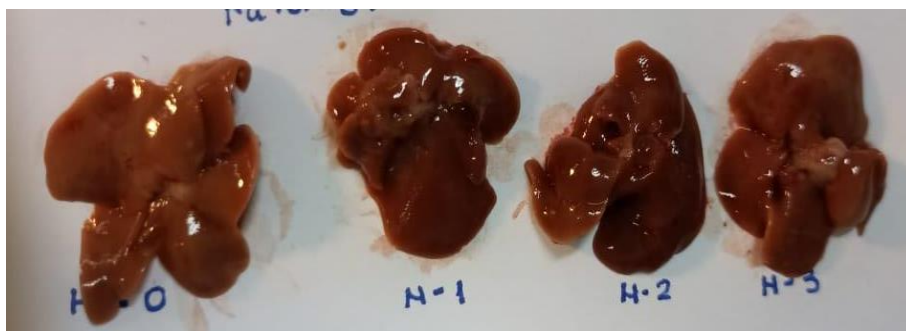


Figura N°5: Órgano Hígado del grupo 1 mg/Kg Fe OB



Figura N°6: Órgano ciego del grupo 2 mg/Kg Fe OB



Figura N°7: Órgano hígado del grupo 2 mg/Kg Fe OB



Figura N°8: Órgano ciego del grupo 4 mg/Kg Fe OB



Figura N°9: Órgano hígado del grupo 4 mg/Kg Fe OB



Figura N°10: Órgano ciego del grupo 5 mg/Kg Fe OB



Figura N°11: Órgano hígado del grupo 5 mg/Kg Fe OB

Figura de los órganos del grupo no obeso(S)



Figura N°12: Órgano ciego del grupo 1 mg/Kg Fe S



Figura N°13: Órgano Hígado del grupo 1 mg/Kg Fe S



Figura N°14: Órgano ciego del grupo 2 mg/Kg Fe S



Figura N°15: Órgano Hígado del grupo 2 mg/Kg Fe S



Figura N°16: Órgano ciego del grupo 4 mg/Kg Fe S





Figura N°17: Órgano Hígado del grupo 4 mg/Kg Fe S



Figura N°18: Órgano ciego del grupo 5 mg/Kg Fe S



Figura N°19: Órgano Hígado del grupo 5 mg/Kg Fe S

## Anexo N°5: Carta de aceptación del experimento por Comité de ética de animales (CIEA)



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

### CONSTANCIA 001-01-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : **“Efecto de la sobreingesta de sulfato ferroso sobre la histología en el hígado y ciego, así como los niveles de glucosa en ratones adultos”.**

Código de inscripción : **209691**

Investigadores : **Rivera Manhualaya, Jeannett Mariela**

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

- 1. Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 22 de diciembre del 2022.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **03 de enero del 2024**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

**Lima, 04 de enero del 2023.**



Dr. Manuel Gasco Tantachuco  
Presidente  
Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

/err

Av. Honorio Delgado 430  
San Martín de Porres  
Apartado postal 4314  
319 0000 Anexo 201302  
vrinve@oficinas-upch.pe  
www.cayetano.edu.pe