

ESTUDIO COMPARATIVO DEL SULFATO FERROSO Y DEL CITRATO FÉRICO AMÓNICO EN EL MODELO DE LA ANEMIA HIPOCROMICA DEL CERDO LACTANTE

Juan Federico THEILKUHLM*

Fernando LOZANO**

Blanca MENESES DE GONGORA***

RESUMEN:

Los autores emplearon cerdos neonatos de las razas Duroc-Yersey y Duroc-Duroc para el estudio comparativo de repleción de hemoglobina mediante la administración oral de sulfato ferroso y de citrato férrico amónico en dosis equivalentes a 1 mg de Fe/kg/día durante 7 semanas, en comparación con un grupo control tratado con hierro dextrano (100 mg de Fe), en dosis única intramuscular en el tercer día de vida.

Los animales neonatos mostraron cifras de hemoglobina de 7 a 8 g/100 ml de sangre al tercer día de nacidos. El hierro dextrano intramuscular fué efectivo como profilaxis contra la anemia espontánea. Los animales no tratados muestran, a los 7 días de nacidos, cifras de hemoglobina de 5 a 6 g/100 ml de sangre. El estudio comparativo en estos animales mostró que el citrato férrico amónico es por lo menos equivalente al sulfato ferroso como fuente terapéutica de hierro, cuando se los administra por vía oral.

Durante la fase de lactancia exclusiva (primeras 4 semanas de vida) la respuesta hemapoyética al citrato férrico amónico es nítidamente superior a la respuesta al sulfato ferroso.

Los resultados mostraron que el modelo de la anemia hipocrómica espontánea del cerdo lactante es útil para los estudios farmacológicos de repleción de hemoglobina. Cuando se limita a la fase de lactancia exclusiva del animal, permite llevar a cabo estudios en 'sólo cuatro semanas, de las cuales la primera se emplea para permitir que se presente la anemia, y las otras tres para el estudio propiamente dicho'. Diez animales por grupo son suficientes.

Summary:

The authors used Duroc-yersey and Duroc-Duroc piglets for the comparative investigation of haemoglobin repletion after orally administered ferrous sulfate and ferric ammonium citrate. The drugs were given daily in doses equivalent to 1 mg Fe^o/kg during seven weeks. A control group was treated with iron dextran (100 mg Fe^o) in single intramuscular dose on the third day of life.

The newborn animals showed haemoglobin values between 7 and 8 g/100 ml on the third day of life. Intramuscular iron dextran was effective for prophylaxis of spontaneous anaemia. Non treated animals showed, on the seventh day of life, haemoglobin values between 5 and 6 g/100 ml. The Subsequent comparative trial in these animals showed that ferric ammonium citrate is at least equivalent to ferrous sulfate as a therapeutic source of iron when orally administered.

During exclusive lactancy (first 4 week of life), the haemopoietic response to ferric ammonium citrate is evidently superior to the response to ferrous sulfate.

The results of the trial show that the model of spontaneous hypochromic anaemia of the lactating pig is useful for the pharmacological trial of haemoglobin repletion. When limited to the period of exclusive lactancy of the piglets, this model makes possible to perform investigations in only 4 weeks. In the first week anaemia is allowed to develop and in the 3 subsequent weeks the trial itself is carried out. Groups of ten animals are adequate.

* Dr. Farm., Profesor Asistente, Dto. de Farmacia, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.

** M. Sc., Ph.D., Profesor Asistente, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional.

*** M. Sc., Profesora Asociada, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.

El presente artículo es un extracto parcial del Trabajo de Tesis de Grado para optar al título de Magister Scientiae en Farmacología presentado por Blanca Meneses de Góngora al programa de Estudios para Graduados en Farmacología del Dto. de Farmacia, Fac. de Ciencias, U. Nacional.

La investigación fué parcialmente subvencionada por el centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CINDEC) de la Universidad Nacional de Colombia.

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

Numerosos compuesto de hierro, inorgánicos y orgánicos, bivalentes y trivalentes, insolubles, iónicos y quelatos, se utilizan para la profilaxia y el tratamiento de los estados carenciales de este elemento, pero aún no existe acuerdo sobre cuál de ellos es el más satisfactorio. El compuesto ideal debería poseer las siguientes características: buena absorción intestinal, buena tolerancia gástrica e intestinal, buena aceptación por el paciente (sabor, tolerancia), buena estabilidad y economía.

Mientras se discute acerca de las ventajas y desventajas de los diferentes compuestos y sales de hierro, se recomienda generalmente el uso del sulfato ferroso, por ser un fármaco barato y que ha mostrado buena absorción y utilización. Sin embargo, la tolerancia hacia el sulfato ferroso no es óptima. Son frecuentes los fenómenos de náuseas, vómito, diarrea y/o estreñimiento. El mal sabor (ferruginoso, hemático, astrigente) es un inconveniente adicional, aún en las formas farmacéuticas sólidas, y tanto este inconveniente como el de su inestabilidad en solución acuosa lo hacen poco o nada apto para la preparación de formas farmacéuticas líquidas.

Como los tratamientos de la ferropenia son muy prolongados, y la aceptación por parte del paciente resulta factor de primera importancia, continúa siendo importante la búsqueda de un compuesto de hierro alternativo al sulfato ferroso para el tratamiento habitual y masivo de la anemia ferropénica.

Hemos considerado que el citrato férrico amónico, un quelato de hierro que se ha utilizado por mucho tiempo, ofrece a primera vista algunas ventajas importantes: es económico como el sulfato ferroso, es prácticamente insípido, es estable, y su tolerancia gástrica e intestinal parece ser significativamente mejor que la del sulfato ferroso. El que este compuesto haya caído en relativo desuso parece deberse principalmente al concepto empírico de que el hierro trivalente se absorbe pobremente del tracto digestivo o de que no es útil para la hemopoyesis. Por lo tanto, el primer paso para considerar si el citrato férrico amónico puede ser un fármaco alternativo del sulfato ferroso consiste en investigar la eficacia comparativa en cuanto a la capacidad de reposición de hemoglobina de los compuestos en cuestión, independientemente de los mecanismos de absorción y/o utilización del hierro que puedan afectar a uno u otro. Este es el primer objetivo del presente trabajo.

El segundo objetivo del trabajo consiste en la búsqueda de un nuevo modelo experimental para el estudio indirecto de la absorción intestinal del

hierro a través de la reposición de hemoglobina: la anemia ferropriva espontánea del cerdo lactante, ampliamente conocida por médicos veterinarios y por zootecnistas como serio problema en la cría del cerdo. En la amplia revisión bibliográfica que precedió a este trabajo, no hemos hallado dato alguno acerca de que este modelo haya sido empleado para el estudio de problemas relacionados con la administración y la absorción del hierro.

Todos los métodos empleados habitualmente para el estudio experimental de la eficacia de los compuestos de hierro en el tratamiento de la anemia ferropriva son insatisfactorios. Aquellos que se basan en estudios de absorción del hierro mediante radioisótopos son dispendiosos, costosos e incompletos, puesto que generalmente no suministran información sobre la utilización del hierro (1,2). Por otra parte, la rata de absorción del hierro en el hombre y en los animales es normalmente muy baja, pero aumenta como consecuencia del estado carencial (3,14), lo que hace necesario crear el estado carencial para poder estudiar la absorción del hierro. Crear y estandarizar un estado carencial también es dispendioso y costoso: los métodos habituales para crear el estado de deficiencia son la alimentación de animales de experimentación con dietas pobres en hierro, método difícil y costoso, o los sangrados agudos y repetidos (1), método inadecuado porque ocasiona carencia no sólo de hierro, sino de todos los elementos constitutivos de la sangre, o la hemólisis intravascular mediante inyecciones de fenilhidrazina (6), que conlleva destrucción celular. Ninguno de estos métodos corresponde en sus características al estado fisiopatológico de carencia de hierro. En contraste, la anemia ferropriva del cerdo lactante ofrece un modelo experimental muy ventajoso: animales experimentales fácilmente disponibles, estado carencial natural (no simulado) que corresponde exactamente a las características de la condición patológica para cuyo tratamiento se usan los antianémicos, establecimiento del estado carencial en sólo una semana y especie animal con características fisiológicas muy parecidas a las del hombre.

El valor medio de la hemoglobina en los cerdos neonatos es de 10 a 12 gramos por 100 ml de sangre, y el contenido total medio de hierro en el organismo de unos 50 mg (15). Los lechones crecen rápidamente, en tal forma que en una semana duplican su peso y al final de la cuarta semana han adquirido 4 veces el peso que tenían en el momento del nacimiento. La leche de la cerda es muy pobre en hierro, y de ella el cerdito solamente obtiene unos 6 mg de hierro durante su primera semana de vida. Como la necesidad durante esa semana es de unos 50 mg, el déficit asciende a más de 40 mg en sólo la primera semana. La disminución de la reserva fisiológica de hierro afecta la producción

de hemoglobina, y su valor porcentual en sangre descendiendo en más del 40% de la cifra inicial. A menos que el cerdito disponga de una fuente adicional de hierro, se torna rápida e intensamente anémico (atrofia, disminución de la resistencia a las enfermedades, fallecimiento) (16,17).

Los cerdos criados en porquerizas de piso de cemento o sin acceso a tierra son mucho más anémicos que los animales criados en pastoreo, ya que éstos empiezan a hojar a los 3 o 4 días de nacidos y así obtienen hierro de la tierra (15). En los criaderos sin acceso a tierra se hace necesaria la administración suplementaria de hierro, prefiriéndose la vía intramuscular (v. gr., en dosis única) (17).

Para el presente estudio hemos elegido la determinación de hemoglobina en sangre como método para la medición del grado de deficiencia de hierro y para la medición indirecta de la absorción del hierro suministrado profiláctica o terapéuticamente. El procedimiento de recuperar los valores normales de hemoglobina en sangre después de haber hallado o inducido un estado de déficit de hierro se denomina "Ensayo de repleción de hemoglobina" (3, 13, 18, 20). Constituye el método empleado en el control clínico de la terapia antianémica con hierro y por lo mismo es el más adecuado para la utilización en los experimentos en animales (21,22).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. *Animales de Experimentación*

El experimento se realizó en cerdos Duroc-Yersey y Duroc-Duroc de ambos sexos. Los controles se iniciaron a los 3 días de nacidos y se continuaron hasta el destete a los 56 días. Los animales pertenecían a la sección de porcinos del Bioterio de los Laboratorios Byala, situado en la finca El Tejar del municipio de Sopó, Cundinamarca.

La crianza se efectuó bajo permanente control médico y veterinario en porquerizas de piso de cemento, lavadas diariamente, y sin posibilidades de acceso a tierra ni a material vegetal. Fueron alimentados únicamente con leche materna durante las primeras 4 semanas. Cada animal permaneció con su respectiva madre hasta el final del experimento.

2.2. *Anemia Ferropriva Espontánea*

Como criterio de anemia franca para iniciar la administración de los compuestos de hierro bajo ensayo se fijaron límites de hemoglobina en sangre de mínimo 5 y máximo 6 g. por 100 ml. El primer control previo de los valores hematológicos se llevó a cabo en el tercer día de vida y el segundo control en el séptimo día.

2.3. *Grupos de Experimentación*

GRUPO I: Este grupo se utilizó como patrón para el control del desarrollo de los animales bajo la profilaxis antianémica habitual en zootecnia. Fue conformado por once lechones de la camada de una sola cerda. Dos lechones murieron (uno por selección natural y otro por accidente de sangría comprobado por necropsia), de manera que al final del experimento se evaluaron nueve. A estos animales se les administró en el tercer día de vida una dosis única intramuscular de hierro dextrano (Dex-Iron^R, Pfizer), equivalente a 100 mg de hierro elemental.

GRUPOS II y III: A estos dos grupos se les administró oralmente sulfato ferroso y citrato férrico amónico. Para la conformación de los grupos se partió de 26 lechones de 3 cerdas. Seis animales murieron por selección natural antes del séptimo día de vida. Los 20 sobrevivientes fueron distribuidos al azar en dos grupos de 10 animales. En cada uno de los grupos se seleccionó un animal control y se le administró hierro dextrano intramuscular en dosis única. A los 9 animales que conformaron el Grupo II se les administró sulfato ferroso por vía oral, y a los 9 animales que conformaron el Grupo III se les administró citrato férrico amónico por vía oral.

Cuatro animales seleccionados al azar de los grupos II y III se sacrificaron al final del experimento para estudios histológicos.

2.4. *Administración de los Fármacos*

GRUPO I. A todos los animales de este grupo se les administró al tercer día del nacimiento 100 mg de hierro en forma de hierro dextrano en dosis única intramuscular, y a partir del día octavo, diariamente 0.1 ml/kg de jarabe simple en la misma forma como se administraron las preparaciones orales de hierro a los grupos II y III.

GRUPOS II y III. A todos los animales de estos grupos se les administró diariamente y a partir del octavo día de vida, 0.1 ml/kg de un jarabe que contenía 1 mg de hierro elemental por cada 0.1 ml, en forma de sulfato ferroso para el grupo II, y en forma de citrato férrico amónico para el grupo III.

La administración oral se llevó a cabo por instilación prefaríngea, mediante jeringa plástica.

2.5. *Estudios y Controles*

2.5.1. *Estudios hematológicos.*

Los controles hematológicos se efectuaron en sangre venosa obtenida por punción en la vena cava anterior.

Se utilizó etilendiaminotetracetato disódico al 10% como anticoagulante (2 gotas por cada 5 ml de sangre). Cada control hematológico se llevó a cabo por duplicado. Los controles se efectuaron en cada animal en el tercero y séptimo días de vida, y a continuación cada siete días hasta los 56 de edad (destete).

La concentración de hemoglobina fue determinada por el método de la cianometahemoglobina (23), en un espectrofotómetro LEITZ modelo 340-800. El patrón de hemoglobina y la solución de Drabkin empleados fueron preparaciones comerciales (BIOMERIEUX, Marcy-1' Etoile).

El hematocrito se determinó por medio de la técnica del micro-hematocrito en una microcentrifuga JANETZKI TH 12 a 15.250 g.

Los recuentos de eritrocitos se llevaron a cabo por dos métodos: el del hemocitómetro y el del contador electrónico COULTER modelo 2F. Finalmente sólo se evaluaron los obtenidos por el método electrónico, por ser más confiables (24).

Los índices eritrocíticos de Wintrobe, el volumen globular medio (VGM), la hemoglobina globular (CMHG) y la concentración media corpuscular (CMHC) se calcularon aritméticamente a partir de los datos de hemoglobina, hematocrito y recuento globular (25).

La morfología de los glóbulos rojos se observó en los frotis de sangre hechos para el recuento diferencial de glóbulos blancos, teñidos con colorante de Wright.

El recuento de leucocitos se hizo por el método del hemocitómetro y por el del contador electrónico COULTER. La fórmula diferencial se estableció por examen microscópico de los frotis, teñidos con colorante de Wright.

Para la determinación de los valores plasmáticos de proteínas se empleó el método refractométrico, mediante el proteinómetro de GOLDBERG modelo TS de AMERICAN OPTICAL CO.

2.5.2. Controles Somáticos

Se determinaron peso y talla de los animales. La talla se controló con dos medidas: perímetro torácico (PT) y longitud desde la punta de la escápula hasta la tuberosidad izquiática (EI). Estos controles se efectuaron el día tercero y el día séptimo después del nacimiento y luego cada siete días hasta los cincuenta y seis.

2.5.3. Controles histológicos.

Los controles histológicos se hicieron con el fin de examinar las posibles alteraciones morfológi-

cas macroscópicas y/o microscópicas producidas por efecto de la administración crónica y aguda de los jarabes de hierro.

GRUPO I A: Dos animales que habían recibido en el tercer día de vida 100 mg de hierro elemental intramuscular en forma de hierro dextrano, más 0.1 ml /kg diarios de jarabe simple durante 48 días.

GRUPO II A: Cuatro animales que habían recibido 1 mg /kg de hierro elemental oralmente en forma de jarabe de sulfato ferroso durante 48 días.

A tres de estos cuatro animales se les administró, además, una dosis masiva única de 10 mg/kg de hierro en forma del mismo jarabe de sulfato ferroso, veinte minutos antes del sacrificio.

GRUPO III A: Cuatro animales que habían recibido 1 mg/kg de hierro elemental oralmente, en forma de jarabe de citrato férrico amónico durante 48 días. A tres de estos cuatro animales se les administró además, una dosis masiva única de 10 mg/kg de peso de hierro en forma del mismo jarabe de citrato férrico amónico antes del sacrificio.

Los animales fueron sacrificados por electrocución. Se examinaron macroscópicamente todos los órganos y componentes de la carcasa, y se tomaron muestras para el estudio morfológico microscópico de esófago, estómago (región cardial, fúndica y pilórica), intestino delgado (duodeno, yeyuno, ileon), intestino grueso, hígado, pulmón, bazo y médula ósea. Los tejidos fueron fijados en formalina al 10%, procesados por el método de inclusión en parafina (sistema AUTOTECHNICON modelo 2A, Technicon Co., espesor 4 micras, micrótomos MICROTOME modelo 280, (American Optical Co.) y coloreados con hematoxilina-eosina (26).

2.6. Análisis Estadístico de los Resultados

Los valores numéricos de los resultados correspondientes a los controles hemalotógicos y los controles somáticos se analizaron estadísticamente, en lo referente a sus promedios y límites de confianza 95%, de acuerdo con el método del ensayo *t* de Student (27).

3. RESULTADOS

3.1. Animales de Experimentación

Las cerdas y los lechones evaluados mostraron durante todo el tiempo del experimento buen estado de salud general. No se presentaron enfermedades contagiosas ni parasitarias. Ningún animal murió durante el tiempo del experimento

por causas patológicas, incluyendo anemia; sólo un lechón murió por extravasación durante la flebotomía.

La identificación de los animales causó algunas dificultades inicialmente, ya que no toleraron la presencia de marcas auriculares metálicas y las marcas por tinción perdieron nitidez rápidamente. Finalmente se obtuvieron buenos resultados marcando los animales con cortes del pelo con tijeras, en forma de números romanos, de aproximadamente cinco cm de extensión, sobreteñidos con solución saturada de ácido pícrico. Fue necesario renovar las marcas a intervalos de dos semanas.

3.2. Anemia

Todos los lechones mostraron en el primer control (tres días de vida) hemogramas con cifras promedio de hemoglobina de 7.63 ± 0.69 g / 100 ml de sangre, valor que muestra ya un estado carencial.

Los animales de los grupos II y III mostraron en el segundo control (7 días de vida) 5.78 ± 0.44 y 5.18 ± 0.60 gramos de hemoglobina por 100 ml de sangre respectivamente, lo cual indica que se hallaban ya en el grado de anemia previamente fijado en el diseño experimental como condición.

3.3. Administración de los Fármacos

Las preparaciones medicamentosas fueron bien recibidas por todos los animales. En las

dosificaciones altas de 10 mg de Fé / 1 ml/kg (Pruebas histológicas) se observó rechazo al jarabe de sulfato ferroso, en claro contraste con la buena aceptación del jarabe de citrato férrico amónico.

3.4. Controles Hematológicos

Los promedios y los límites de confianza de los controles de hemoglobina, hematocrito y recuento de eritrocitos se consignan en las Tablas I, II y III. Cada dato corresponde al promedio de 9 animales.

En las FIGURAS 1, 2 y 3 expresamos gráficamente y en forma superpuesta los valores de hemoglobina, hematocrito y recuentos de eritrocitos correspondientes a los tres grupos experimentales.

En la FIGURA 4 se expresan gráficamente los valores hemáticos de hemoglobina, superpuestas para los grupos II y III, durante el período de lactancia exclusiva (28 días).

De los datos consignados en las TABLAS I, II y III se derivaron aritméticamente los índices hematimétricos.

Los frotis de sangre del día tercero presentaron morfología muy semejante para todos los grupos experimentales, encontrándose una hipocromia moderada, poiquilocitosis y anisocitosis leves, y aproximadamente un 2% de glóbulos rojos nucleados.

TABLA I. PROMEDIO Y LIMITES DE CONFIANZA DE HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO Y RECUENTO DE ERITROCITOS. GRUPO I- HIERRO DEXTRANO

| días de vida | días después administración de hierro dextrano | Hemoglobina g% | Hematocrito % | Eritrocitos $\times 10^{-6}/\text{mm}^3$ |
|--------------|--|----------------|---------------|--|
| 3 | 0 | 7.40 | 0.39 | 24.0 |
| 7 | 4 | 7.93 | 0.56 | 25.8 |
| 14 | 11 | 9.08 | 0.72 | 30.3 |
| 21 | 18 | 9.98 | 0.95 | 32.2 |
| 28 | 25 | 10.76 | 1.03 | 34.7 |
| 35 | 32 | 10.86 | 0.79 | 35.1 |
| 42 | 39 | 11.50 | 0.97 | 37.1 |
| 49 | 45 | 12.10 | 0.87 | 38.2 |
| 56 | 53 | 12.77 | 0.68 | 39.6 |
| n = 9 | | | | |

Los cerdos del Grupo I fueron tratados, al tercer día del nacimiento, con hierro dextrano intramuscular, con una dosis única de 100 mg. Fe por animal.

Los eritrocitos en el día séptimo de experimentación mostraron claramente alteraciones que confirmaron la presencia de un estado manifiesto de anemia ferropriva: hipocromia y poiquilocitosis marcadas, anisocitosis moderada, basofilia difusa leve, rubricitos y un promedio de glóbulos rojos nucleados de un 5%. También se presentó crenación de los eritrocitos.

Los controles subsiguientes durante el tratamiento y en los tres grupos, mostraron poco a poco una normalización de la morfología de los eritrocitos, señal de recuperación del estado fisiológico. La recuperación inicialmente fue más rápida para el grupo I (hierro dextrano), pero al cabo de los 56

días se habían disminuido casi totalmente las alteraciones morfológicas en todos los grupos.

En un porcentaje reducido de lechones, de todos los grupos, se presentaba todavía anisocitosis y poiquilocitosis leve, al término del experimento.

Las cifras de los recuentos de leucocitos y de la fórmula diferencial de ellos, grupos, I, II y III, se presentan en las TABLAS IV, V y VI respectivamente.

Las cifras correspondientes a los controles de proteínas plasmáticas se registran en la TABLA VII.

TABLA II. PROMEDIOS Y LIMITES DE CONFIANZA DE HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO Y RECUENTO DE ERITROCITOS. GRUPO II-SULFATO FERROSO

| días de vida | días tratamiento | Hemoglobina g% | | Hematocrito % | | Eritrocitos $\times 10^{-6}/\text{mm}^3$ | |
|--------------|------------------|----------------|------|---------------|-----|--|------|
| 3 | 0 | 7.68 | 0.91 | 25.3 | 2.7 | 4.27 | 0.29 |
| 7 | 0 | 5.78 | 0.44 | 19.7 | 1.8 | 3.29 | 0.27 |
| 14 | 7 | 6.39 | 0.35 | 22.3 | 1.1 | 3.66 | 0.14 |
| 21 | 14 | 6.67 | 0.52 | 23. | 1.3 | 3.67 | 0.40 |
| 28 | 21 | 7.21 | 0.79 | 24.5 | 2.6 | 4.10 | 0.36 |
| 35 | 28 | 9.11 | 0.50 | 30.9 | 3.4 | 4.89 | 0.41 |
| 42 | 35 | 10.26 | 1.26 | 33.8 | 3.3 | 5.32 | 0.63 |
| 49 | 42 | 11.46 | 0.97 | 37.1 | 2.6 | 5.69 | 0.28 |
| 56 | 49 | 12.31 | 0.26 | 38.8 | 0.5 | 6.09 | 0.11 |
| n = 9 | | | | | | | |

Los cerdos del grupo II fueron tratados diariamente por vía oral con sulfato ferroso a la dosis de 1 mg Fe/kg.

TABLA III. PROMEDIOS Y LIMITES DE CONFIANZA DE HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO Y RECUENTO DE ERITROCITOS. GRUPO III-CITRATO FERRICO AMONIACO

| días de vida | días tratamiento | Hemoglobina g% | | Hematocrito % | | Eritrocitos $\times 10^{-6}/\text{mm}^3$ | |
|--------------|------------------|----------------|------|---------------|-----|--|------|
| 3 | 0 | 7.83 | 0.77 | 26.0 | 1.8 | 4.00 | 0.23 |
| 7 | 0 | 5.18 | 0.60 | 18.8 | 1.8 | 3.08 | 0.30 |
| 14 | 7 | 5.60 | 0.49 | 20.3 | 1.7 | 3.29 | 0.14 |
| 21 | 14 | 7.94 | 0.93 | 26.5 | 2.9 | 4.31 | 0.46 |
| 28 | 21 | 8.73 | 0.90 | 29.4 | 2.5 | 4.82 | 0.35 |
| 35 | 28 | 10.57 | 0.47 | 34.7 | 0.9 | 5.72 | 0.70 |
| 42 | 35 | 11.89 | 0.48 | 38.1 | 1.0 | 5.82 | 0.19 |
| 49 | 42 | 12.76 | 0.51 | 39.2 | 1.2 | 6.26 | 0.17 |
| 56 | 49 | 13.37 | 0.46 | 41.0 | 1.3 | 6.64 | 0.20 |
| n = 9 | | | | | | | |

Los cerdos del Grupo III fueron tratados diariamente por vía oral con citrato férrico amónico a la dosis del 1 mg Fe / kg.

**TABLA IV. PROMEDIOS Y LIMITES DE CONFIANZA DE LA CUENTA TOTAL Y
DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS. GRUPO I-HIERRO DEXTRANO**

| Días de Vida | Leucocitos x 10 ³ /mm ³ | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|-----|-------------|-----|------------|-----|-----------|-----|-----------|------|-------------|------|-------|------|
| | cuenta total | | Neutrófilos | | Linfocitos | | Monocitos | | Basófilos | | Eosinófilos | | Banda | |
| 3 | 7.7 | 2.2 | 5.6 | 0.6 | 2.5 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.03 |
| 7 | 8.9 | 3.2 | 4.9 | 0.5 | 2.5 | 0.4 | 0.3 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.02 | | |
| 14 | 9.2 | 2.0 | 3.9 | 0.8 | 4.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.05 | 0.00 | 0.00 |
| 21 | 10.0 | 2.3 | 4.1 | 0.6 | 5.0 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.05 | 0.00 | 0.00 |
| 28 | 9.0 | 3.2 | 3.5 | 0.4 | 5.0 | 0.7 | 0.2 | 0.1 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.00 | 0.00 |
| 35 | 10.0 | 2.2 | 4.2 | 0.5 | 5.3 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.07 | 0.08 | 0.02 | 0.04 | 0.00 | 0.00 |
| 42 | 12.3 | 2.9 | 4.4 | 0.7 | 7.4 | 0.9 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.06 | 0.25 | 0.06 | 0.00 | 0.00 |
| 49 | 14.7 | 1.5 | 6.0 | 0.6 | 9.1 | 0.9 | 0.4 | 0.2 | 0.04 | 0.00 | 0.15 | 0.12 | 0.00 | 0.00 |
| 56 | 14.5 | 2.0 | 6.5 | 1.0 | 7.3 | 0.7 | 0.6 | 0.2 | 0.00 | 0.00 | 0.15 | 0.07 | 0.15 | 0.07 |
| | n = 9 | | | | | | | | | | | | | |

**TABLA V. PROMEDIOS Y LIMITES DE CONFIANZA DE LA CUENTA TOTAL Y
DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS. GRUPO II-SULFATO FERROSO**

| Días de Vida | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------------|-----|-------------|-----|------------|-----|-----------|-----|-----------|------|-------------|------|-------|------|
| | cuenta total | | Neutrófilos | | Linfocitos | | Monocitos | | Basófilos | | Eosinófilos | | Banda | |
| 3 | 8.2 | 1.4 | 5.7 | 0.2 | 2.3 | | 0.2 | 0.2 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.30 | 0.02 |
| 7 | 7.5 | 1.2 | 4.4 | 0.2 | 2.9 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.02 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.02 |
| 14 | 8.9 | 1.5 | 3.2 | 0.3 | 5.3 | 0.5 | 0.3 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.05 | 0.00 | 0.00 |
| 21 | 9.8 | 1.5 | 3.7 | 0.8 | 6.1 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.18 | 0.06 | 0.06 | 0.05 |
| 28 | 10.3 | 2.1 | 4.0 | 0.5 | 6.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.06 | 0.00 | 0.00 |
| 35 | 11.5 | 1.5 | 4.2 | 0.5 | 6.8 | 0.5 | 0.3 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.30 | 0.08 | 0.00 | 0.00 |
| 42 | 12.1 | 1.7 | 5.9 | 0.4 | 5.4 | 0.5 | 0.4 | 0.1 | 0.06 | 0.07 | 0.36 | 0.07 | 0.07 | 0.01 |
| 49 | 12.4 | 1.6 | 5.3 | 0.7 | 8.4 | 0.9 | 0.3 | 0.1 | 0.15 | 0.6 | 0.01 | 0.06 | 0.00 | 0.00 |
| 56 | 14.4 | 1.8 | 5.8 | 1.0 | 6.3 | 0.7 | 0.3 | 0.1 | 0.12 | 0.10 | 0.12 | 0.10 | 0.00 | 0.00 |
| | n = 9 | | | | | | | | | | | | | |

Los cerdos del Grupo II fueron tratados diariamente por vía oral con sulfato ferroso a la dosis de 1 mg Fe / kg.

TABLA VI. PROMEDIOS Y LIMITES DE CONFIANZA DE LA CUENTA TOTAL Y DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS. GRUPO III-CITRATO FERRICO AMONICO

| Días de Vida | LEUCOCITOS X 10 ³ /mm ³ | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|-----|-------------|-----|------------|-----|-----------|------|-----------|------|-------------|------|-------|------|
| | cuenta total | | Neutrófilos | | Linfocitos | | Monocitos | | Basófilos | | Eosinófilos | | Banda | |
| 3 | 6.3 | 2.4 | 4.2 | 0.4 | 1.9 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.04 |
| 7 | 7.1 | 3.2 | 4.0 | 0.2 | 3.4 | 0.4 | 0.2 | 0.0 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.03 |
| 14 | 8.2 | 1.5 | 2.6 | 0.2 | 5.3 | 0.6 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.03 |
| 21 | 8.8 | 1.3 | 3.2 | 0.7 | 5.3 | 0.8 | 0.2 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.07 |
| 28 | 8.9 | 2.5 | 3.5 | 0.8 | 5.7 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.20 | 0.02 | 0.00 | 0.00 |
| 35 | 11.5 | 0.9 | 5.2 | 0.6 | 5.2 | 0.7 | 0.3 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.10 | 0.10 | 0.05 |
| 42 | 13.6 | 1.5 | 5.8 | 0.9 | 7.1 | 0.4 | 0.3 | 0.1 | 0.09 | 0.10 | 0.18 | 0.10 | 0.01 | 0.02 |
| 49 | 12.9 | 1.2 | 5.2 | 1.2 | 7.0 | 0.9 | 0.3 | 0.1 | 0.01 | 0.09 | 0.38 | 0.01 | 0.01 | 0.00 |
| 56 | 15.5 | 1.6 | 7.4 | 1.0 | 7.8 | 0.6 | 0.2 | 0.1 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.06 | 0.04 | 0.03 |
| | n = 9 | | | | | | | | | | | | | |

Los cerdos del Grupo III fueron tratados diariamente por vía oral con Citrato Férrico Amónico a la dosis de 1 mg Fe/kg.

TABLA VII. PROTEINAS PLASMATICAS Y SUS LIMITES DE CONFIANZA, GRUPOS I, II y III.

| días de Vida | g x 100 ml de plasma | | | | | |
|--------------|----------------------|-----|---------------------|-----|------------------------------|-----|
| | I. Hierro dextrano | | II. Sulfato ferroso | | III. Citrato férrico amónico | |
| 3 | 5.2 | 0.4 | 5.4 | 0.6 | 5.0 | 0.7 |
| 7 | 5.9 | 0.4 | 5.5 | 0.4 | 5.2 | 0.4 |
| 14 | 5.8 | 0.5 | 5.7 | 0.3 | 5.5 | 0.7 |
| 21 | 7.0 | 0.4 | 6.1 | 0.3 | 6.1 | 0.4 |
| 28 | 6.8 | 0.3 | 6.0 | 0.4 | 7.0 | 0.3 |
| 35 | 7.3 | 0.4 | 7.0 | 0.3 | 6.8 | 0.2 |
| 42 | 7.3 | 0.5 | 6.8 | 0.3 | 6.8 | 0.3 |
| 49 | 8.0 | 0.4 | 8.0 | 0.2 | 7.5 | 0.2 |
| 56 | 7.5 | 0.4 | 8.2 | 0.6 | 7.8 | 0.3 |
| | n=9 | | | | | |

HIERRO DEXTRANO

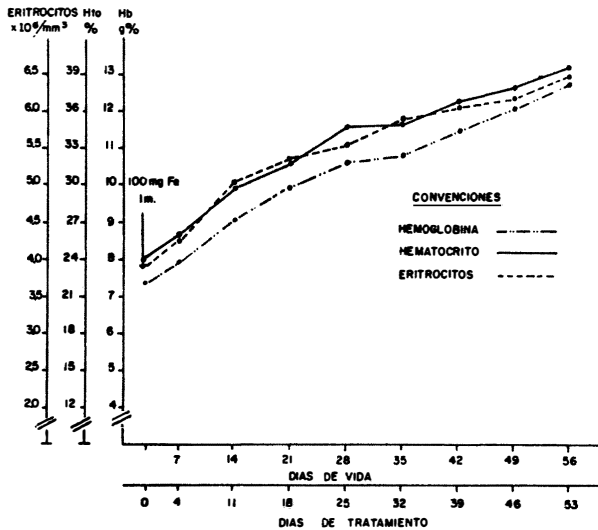


Figura 1. Valores superpuestos de hemoglobina, hematocrito y recuento de eritrocitos del Grupo I

SULFATO FERROSO

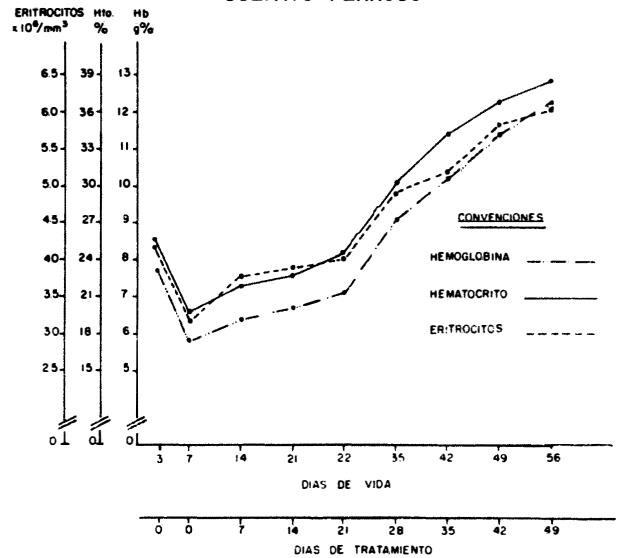


Figura 2. Valores superpuestos de hemoglobina, hematocrito y recuento de eritrocitos del Grupo II

CITRATO FERRICO AMONICO

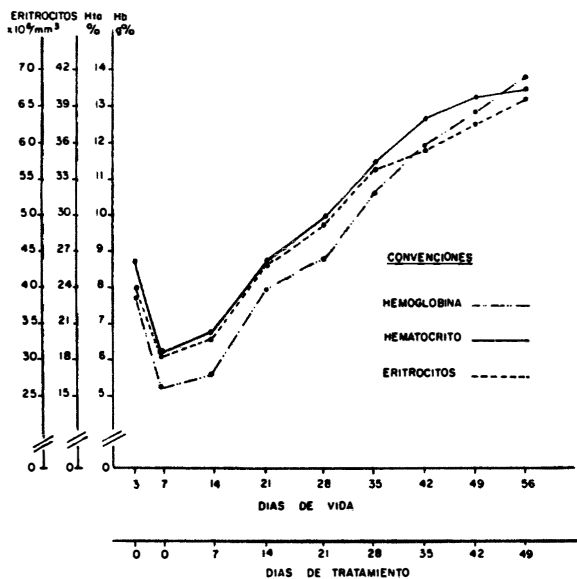


Figura 3. Valores superpuestos de hemoglobina, hematocrito y recuento de eritrocitos del Grupo III

HEMOGLOBINAS Y LIMITES DE CONFIANZA Grupos II y III

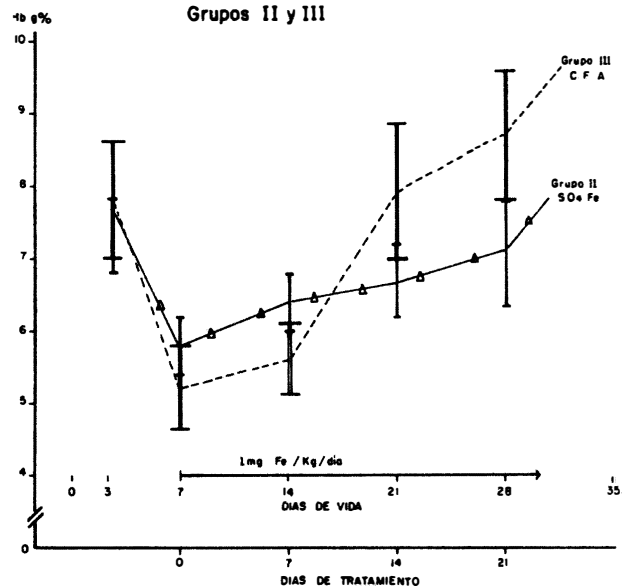


Figura 4. Valores superpuestos de hemoglobina para los grupos II y III durante el período de lactancia exclusiva

3.5. Estudios Histológicos

3.5.1. Administración crónica (Tolerancia)

Alteraciones morfológicas macroscópicas.

GRUPO I A: Los dos lechones que recibieron hierro dextrano intramuscular en dosis única y jarabe simple por vía oral durante cuarenta y ocho días, y que constituyeron el grupo control, no mostraron alteraciones morfológicas macroscópi-

cas en los componentes de la carcasa, ni en las mucosas del tracto digestivo, atribuibles a la administración de los fármacos.

GRUPO II A: Dos de los cuatro cerdos que recibieron sulfato ferroso por vía oral durante cuarenta y ocho días no presentaron modificaciones patológicas. Uno mostró enfisema en el lóbulo diafragmático izquierdo y el otro bulla enfisematosa en el pulmón derecho, posiblemente por esfuerzo respiratorio agonal.

GRUPO III A. En el grupo de lechones que recibió citrato férrico amónico por vía oral durante cuarenta y ocho días, dos se encontraron normales. Uno presentó una úlcera gástrica, posiblemente por stress y el otro dos hematomas de unos tres cm de diámetro en el lóbulo pulmonar diafragmático derecho y enfisema en bulla próximo a la zona.

Ninguna de las alteraciones morfológicas-macroscópicas halladas en los dos grupos experimentales tuvo relación con los fármacos empleados en el ensayo.

Alteraciones morfológicas microscópicas.

GRUPO I A: En un lechón del grupo control que recibió jarabe simple durante cuarenta y ocho días, se observó abundante moco en la mucosa de la porción glandular del estómago. El otro se halló normal.

GRUPO II A: En el estudio microscópico de los lechones que fueron medicados con sulfato ferroso, uno presentó en la porción cardial del estómago una moderada congestión de los vasos sanguíneos de la submucosa. Otro, edema ligero en la lámina propia de las zonas vecinas a las células epiteliales del borde libre de las vellosidades intestinales. Los otros dos no presentaron alteraciones morfológicas microscópicas.

GRUPO III A: Uno de los lechones que recibieron citrato férrico amónico durante cuarenta y ocho días, aquel que macroscópicamente había presentado úlcera gástrica, mostró congestión vascular leve y edema de los vasos sanguíneos de la lámina propia de la mucosa y submucosa. Los otros lechones no presentaron alteraciones morfológicas microscópicas.

3.5.2. Administración Aguda

Alteraciones morfológicas macroscópicas.

GRUPO II A: Dos de los tres lechones que recibieron sulfato ferroso en dosis masivas presentaron un área hemorrágica de aproximadamente tres centímetros de diámetro en la región cardial del estómago acompañado de edema de la mucosa, sin alteraciones visibles en las demás mucosas digestivas; el otro cerdo no presentó alteraciones macroscópicas que puedan relacionarse con el experimento.

GRUPO III A: En el grupo de lechones que recibió dosis masivas de citrato férrico amónico, uno mostró ligera congestión y hemorragias petequiales gástricas, en la región pilórica. En los otros dos no se encontraron alteraciones morfológicas macroscópicas.

Alteraciones morfológicas microscópicas.

GRUPO II A: En el grupo de los lechones que recibieron dosis de 10 mg/kg de peso de sulfato ferroso, los dos animales que macroscópicamente mostraron áreas hemorrágicas en la región cardial, presentaron abundante fibrina, hemorragia y congestión entre el límite de la lámina propia y la muscular mucosa, dilatación de vasos linfáticos, edema y hemorragias marcadas en la submucosa, así como marginación leucocitaria, principalmente de polimorfonucleares neutrófilos.

En los demás órganos examinados no se observaron alteraciones morfológicas microscópicas.

GRUPO III A: En el grupo de los lechones que recibieron el citrato férrico amónico, en dosis altas, el lechón que macroscópicamente presentó congestión y hemorragias petequiales gástricas en la región pilórica mostró congestión vascular y edema moderado de la submucosa. Los otros dos animales no presentaron alteraciones morfológicas microscópicas.

4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

4.1. *Modelo Experimental y Animales de Experimentación*

Durante el desarrollo del experimento se pudo observar que el cerdo lactante se presta muy bien para los estudios farmacológicos de repleción de hemoglobina. Las dificultades de manipulación de este animal, guardadas proporciones, no son distintas de las que presentan los animales habituales de laboratorio.

El modelo resulta muy económico porque el costo del experimento se limita a los costos exclusivos del laboratorio. Los gastos de la crianza y el mantenimiento de los animales corre por cuenta del presupuesto de inversión de la cría comercial de los cerdos de raza. Al final del experimento los animales se hallarán en condiciones somáticas adecuadas y alcanzarán su valor comercial correspondiente, siempre y cuando el diseño experimental pretenda la plena repleción de hemoglobina en el menor tiempo posible y los cerdos no se dejen caer en anemia por más tiempo del mínimo indispensable. El riesgo de pérdida de los animales es muy pequeño cuando las muestras de sangre se obtienen en forma adecuada.

Mientras los animales son lactantes exclusivos, las condiciones biológicas para la absorción del hierro suministrado oralmente son constantes y excluyen todas las variables ocasionadas por una dieta heterogénea.

Las conclusiones que se obtienen del trabajo en este modelo se limitan por supuesto, a esta condición de lactante exclusivo. Si la duración del experimento se prolonga hacia la época en la cual los animales empiezan a ingerir dieta sólida, se introducen variables dadas por la cantidad, la composición y el contenido en hierro del alimento suministrado. En estas condiciones las conclusiones del experimento pueden ser diferentes.

4.2. La Anemia del Cerdo Lactante

Las cifras hematológicas y la morfología microscópica que se observaron en el tercer día de vida de los animales mostraron que en este momento existe ya un estado carencial de hierro. Los controles del séptimo día confirman una capacidad crítica de transporte de oxígeno que obliga a la administración terapéutica de hierro. En este momento existe la posibilidad de seguir variados diseños experimentales.

4.3. Distribución de los Grupos Experimentales

La significancia estadística de los resultados de las determinaciones hematológicas y somáticas, reflejadas en la estrechez de los límites de confianza, mostró que el número de nueve animales por grupo fue suficiente para los objetivos programados.

4.4. Administración de los Fármacos.

La administración oral de las preparaciones medicamentosas no ofreció dificultades distintas de las inherentes a la manipulación de los animales. El volumen de dosificación de 0.1 ml por kg de peso del animal se mostró adecuado para los fines propuestos y permitió la dosificación dentro de límites aceptables de exactitud ($\pm 10\%$ de la dosis predeterminada).

Se observó intento franco de rechazo, por parte de los animales, al jarabe de sulfato ferroso, más no al de citrato férrico amónico.

4.5. Respuesta Hematológica

La administración de hierro dextrano por vía intramuscular (100 mg Fe por animal) en dosis única en el tercer día de vida de los animales elevó las cifras de hemoglobina de 7.40 a 12.77 g. por 100 ml. de sangre en 53 días de control, contados a partir del día de administrado. El curso de la curva de repleción de hemoglobina es uniformemente ascendente y plenamente paralelo a las curvas de desarrollo de células sanguíneas. Lo anterior confirma que la práctica habitual en la cría de cerdos, de administrar profilácticamente hierro dextrano intramuscular en dosis única en el tercer día de vida, está plenamente justificada.

En los grupos de experimentación sometidos a tratamiento oral diario con 1 mg Fe / kg, en forma de sulfato ferroso y de citrato férrico amónico, se observaron repleciones de hemoglobina de 5.78 a 12.31 y de 5.18 a 13.37 g / 100 ml de sangre en 49 días de tratamiento. En ambos grupos el curso de la curva de repleción de hemoglobina es plenamente paralelo a las curvas de desarrollo de células sanguíneas.

Los tres grupos de animales alcanzaron valores similares de hemoglobina al final de la octava semana de vida (último control). Tomando la cifra del grupo control como 100%, el grupo tratado con sulfato ferroso se halla cerca de un 5% por debajo de esta cifra, mientras que el grupo tratado con citrato férrico amónico se halla en un 5% por encima.

La respuesta del animal anémico a la terapia oral, con los dos compuestos de hierro ensayados, inicialmente es lenta. La respuesta se incrementa notoriamente entre la segunda y la tercer semana de administración de citrato férrico amónico, superando este grupo las cifras del grupo patrón entre la cuarta y la quinta semana de tratamiento. En el grupo tratado con sulfato ferroso, el incremento se observa apenas a la altura de la tercera semana de tratamiento y las cifras no alcanzan, en ningún momento del período controlado, a las del grupo patrón ni a las del grupo de citrato férrico amónico.

Si la observación se limita a las primeras 4 semanas de vida de los animales (período de lactancia exclusiva), el grupo de animales tratados por 3 semanas con citrato férrico amónico logró una repleción de hemoglobina de 5.18 ± 0.60 a 8.73 ± 0.90 g/100 ml de sangre, mientras que el grupo tratado con sulfato ferroso no aumentó sino de 5.78 ± 0.44 a 7.12 ± 0.79 g/100 ml. Durante este período de tratamiento y en similitud de condiciones, la asimilación de hierro a partir del citrato férrico amónico fué más de dos y media veces superior a la asimilación de hierro a partir del sulfato ferroso.

Los índices eritrocíticos de Wintrobe, calculados a partir de los datos de hemoglobina, hematocrito y recuento eritrocítico, así como la morfología de las células sanguíneas, confirmaron nítidamente la presencia de anemia hipocrómica en los animales de experimentación, la cual se acentúa entre el tercero y el séptimo días de vida y responde bien a la administración de los compuestos de hierro.

Los leucocitos y las proteínas plasmáticas se mantuvieron en todos los grupos dentro de límites normales.

4.6. Desarrollo Somático

El desarrollo somático (peso y talla) de los animales de los tres grupos de experimentación fué enteramente paralelo y uniforme. El grado de anemia en que se hallaron los animales de los grupos II y III durante algunas semanas no pareció influir negativamente en su desarrollo.

4.7. Estudios Histológicos

En los animales que recibieron 1mg Fe/kg/día durante 7 semanas no se hallaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas que, en relación con los animales del grupo de control indiquen intolerancia local ni sistémica al sulfato ferroso o al citrato férrico amónico administrados en forma de jarabe (1mg Fe / 0.1 ml jarabe al 1% de Fe).

En los animales sometidos a sobrecarga aguda con (10 mg. Fe/0.1 ml jarabe al 10% de Fe) las observaciones macroscópicas y microscópicas parecen indicar que el citrato férrico amónico es mejor tolerado localmente a nivel gástrico que el sulfato ferroso. Las alteraciones observadas corresponden a la respuesta de la mucosa gástrica a la presencia de una sustancia irritante, y son más claramente manifiestas en los animales que recibieron sulfato ferroso.

4.8. Evaluación Estadística

Los límites de confianza 95% de los datos evaluados muestran que el número de 9 animales por grupo de experimentación fué suficiente para la obtención de resultados estadísticamente válidos.

5. CONCLUSIONES

1. La anemia hipocrómica espontánea del cerdo lactante constituye un modelo útil para los estudios farmacológicos de repleción de hemoglobina.
2. El estudio comparativo de repleción de hemoglobina en el modelo de la anemia hipocrómica espontánea del cerdo lactante, muestra que por lo menos durante el período de lactancia exclusiva (primeras cuatro semanas de vida), el citrato férrico amónico se absorbe del tracto intestinal tan bien como —o mejor que— el sulfato ferroso.
3. La inyección intramuscular de hierro dextrano en dosis única a los cerdos de tres días de edad evita que éstos desarrollen anemia hipocrómica crítica.

BIBLIOGRAFIA

1. FORTH, W., and ANDRES, H. Methode zur Erzeugung eines Eisenmangels bei Ratten, *Arzeimittelforsch.* 19: 363-364. (1969).
2. KING, J., AMMA, K.P. and SAREEN, K.N. Effect of oral contraceptives on the absorption of stable isotopes of iron, copper and zinc. *Fed. Proc.* 36: 1175 (Abstract). (1977).
3. HAHN, P.F., BALE, W.F., ROSS, J.F. PALFOUR, W.M., WHIPPLE, G.H. Radiative iron absorption by gastric intestinal tract. *J. Exptl. Med.* 78: 169-188. (1943).
4. COOK, J.D., CHAIN, H. and FINCH, C.A. Storage iron kinetics V. Iron exchange in the rat. *Brit. J. Haematol.* 25: 695-705. (1973).
5. MANIS, J.G. and SCHACHTER, D. Active transport of iron by intestine: features of the two-step mechanism. *Am. J. Physiol* 203: 73-80. (1962).
6. GHIRASIRI, L., and IZAK, G. The effect of acute haemorrhage and acute haemolysis on intestinal iron absorption in the rat. *Brit J. Haematol.* 12: 611-622. (1966).
7. MANIS, J.G. and SCHACHTER, D. Active transport of iron by intestine: effects of oral iron and pregnancy. *Am. J. Physiol.* 203: 81 - 86. (1962).
8. RULIFFSON, W.S. and HOPPING, J.M. Maturation, iron deficiency and ligands in enteric radioiron transport in vitro. *Am. J. Physiol.* 204: 171-175. (1963).
9. WHEBY, M.S., JONES, L.G. and CROSBY, W.A. Studies on iron absorption. Intestinal regulatory mechanism. *J. Clin. Invest.* 43: 1433-1442. (1964).
10. McCANCE, R.A., and WIDDOWSON, E.M. Absorption and excretion of iron. *Lancet* 1: 680-684. (1937).
11. MENDEL, G.A. Studies on iron absorption. I The relationship between the rate of erythropoiesis, hypoxia and iron absorption. *Blood* 18: 727-736. (1961).
12. AMAI, M., BROWN, E. Examination of the role of xanthineoxydase in iron absorption by the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 73: 366-378. (1961).

13. PRINCIOTTO, J.V., RUBIN, M., SHASHATY, G.C. and ZAPOLSKI, E.J. The transfer of iron to reticulocytes by synthetic chelating agents. *J. Clin. Invest.* 43: 825-833. (1964).
14. WHITE, G., BAILEY-WOOD, P.R. and JACOBS, A. The effect of chelating agents on cellular iron metabolism. *Clin. Sci. Mol. Med.* 50: 145-152. (1976).
15. VENN, J.A., McCANCE, R.A. and WIDDOWSON, E.M. Iron metabolism in Piglet Anaemia. *J. Comp. Path.* 57: 314. (1974).
16. ULLREY, D.E., MILLER, E.R. THOMPSON, O. A., ACKERMANN, I.M., SCHMIDT, D.A., HOEFER, J.A. and LUECKE, R.W., The requirement of the baby pig for orally administered iron. *J. Nutr.* 70: 187-192. (1970).
17. MILLER, E.R., ULLREY, D.E., BRENT, B. E., MERKEL, R. A., BRADLEY, B.L., and HOEFER, J.A. Effects of age of pig and form of parenteral iron upon tissue iron concentration and ham discoloration at slaughter. *J.A. V.M.A.* 150: 735-741. (1967).
18. CONLEY, M., HATHCOCK, J.N. Effects of dietary protein and amino acids on iron utilization by iron depleted rats. *J. Nutr.* 108: 475-480. (1978).
19. VILLAMIL, A., Anemia ferropénica. Colombia. Ministerio de Salud Pública. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. División de Educación Nutricional. Bogotá. (1974).
20. AMINE, E.K., NEFF, R, and HEGSTED, D.M. Biological estimation of available iron using chicks or rats. *J. Agr. Food Chem.* 20: 246-251. (1972).
21. FRITZ, J.C., PLA, G. W. Application of the animal hemoglobin repletion test to measurement of iron availability in foods. *JAOAC* 55: 1128-1132 (1972).
22. FRITZ, J.C., PLA, G. W., HARRISON, B. N. and CLARK, G.A. Estimation of the bioavailability of iron *JAOAC* 58: 902-905. (1975).
23. EILERS, R.J. Notification of final adoption of an international method and standard solution for hemoglobinometry: specifications for preparation of standard solution. *Am. J. Clin. Pathol.* 47: 212-214. (1967).
24. COLES, E.H. Patología, Diagnóstico veterinario. IV Ed. Interamericana, S.A. México. (1968).
25. WINTROBE, M.M. Clinical Hematology, 5 ed., Lea & Febiger, Filadelfia, Cap. 14, (1961).
26. LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd. ed. McGraw-Hill, New York, pp. 33. (1968).
27. BAUER, E.L. Manual de Estadística. Editorial Alhambra, Madrid, pp. (1974).