



**Universidad de Chile**  
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos  
Programa de Magíster en Nutrición y Alimentos

---

***EFEECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON CALCIO SOBRE  
LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO***

[Trial registration: ISRCTN 89888123]

---

Profesor Fernando Pizarro  
Director

Israel Ríos Castillo  
Tesista

**Tesis para optar al grado de Magíster en Nutrición y Alimentos  
con Mención en Nutrición Humana**

*SANTIAGO DE CHILE, OCTUBRE 2011*

**Comisión de Tesis**

Dr. Daniel López de Romaña– Profesor Asociado, INTA, Universidad de Chile

Dra. Mariana Cifuentes – Profesora Asociado, INTA, Universidad de Chile

Dr. Manuel Ruz – Profesor Titular, Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Fecha de Examen de Grado: \_\_\_\_\_

Calificación Final: \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

A la Agencia de Cooperación Internacional de Chile (AGCI) por su invaluable apoyo económico en la realización de este programa de Magíster en Nutrición y Alimentos.

Al Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF) por su apoyo en el desarrollo de la tesis.

Al profesor Fernando Pizarro Aguirre por brindarme la oportunidad de aprender de su vasta experiencia en el campo de la investigación y muy en especial, en el campo de los micronutrientes.

A todo el cuerpo de académicos del Laboratorio de Micronutrientes del INTA, en especial a los profesores Daniel López de Romaña, Manuel Olivares y Miguel Arredondo, de quienes me he beneficiado en mi formación académica. De igual manera, al equipo profesional, técnico y auxiliar del laboratorio, en especial a la Sra. Maritza Córdova y el Nutricionista Alex Brito, quienes me ofrecieron más que su ayuda, su amistad.

A las monitoras de terreno, Sra. Jeannette Córdova Silva y Sra. María Elena Vizcarra (Manenita), quienes fueron de fundamental apoyo en el proceso experimental del estudio.

Al equipo docente, profesional, técnico y auxiliar del INTA, de quienes me llevo gratos recuerdos. En especial, del equipo de computación, con quienes compartí gran parte de mi tiempo en el Instituto.

Al equipo del departamento de Estadística, en especial a la profesora Yazna Orellana y Bárbara Leyton, de quienes aprendí el fascinante mundo de la bioestadística, y del cual me declaro ferviente apasionado. Así mismo, quiero agradecer a la Sra. Rosemary Valenzuela por su diligencia y profesionalismo en atender a cada solicitud hecha.

Este estudio es parte del proyecto titulado “Rol del calcio sobre la biodisponibilidad de hierro hemínico y hierro no-hemínico de la dieta”, el cual está financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) 1095038.

## **Dedicatoria**

A Dios por darme la vida y a mi madre, Dalila María Castillo, por guiarme desde la infancia y por su incondicional amor, su apoyo en la distancia ha sido de gran fortaleza.

A mi amada esposa, Sheila Guimara Cerezo de Ríos, por permitirme soñar y apoyarme en esta aventura académica. Gracias Sheila porque sin tu apoyo nunca hubiera sido posible realizar el magíster.

A mis amados hijos, Israel Adrián Ríos Cerezo, Natalie Victoria Ríos Cerezo y David Elías Ríos Cerezo, quienes alegran cada minuto de mi vida y me hacen el hombre más feliz sobre la tierra. Ustedes tres supieron ser pacientes y comprensivos durante este período fuera de Panamá.

A toda mi familia, sé que este tiempo de lejanía ha sido difícil para ellos, así como para nosotros.

## ÍNDICE

	Pág.
Índice de figuras y tablas	6
Resumen	7
Abstract	8
I.    Marco teórico	9
A. Hierro	10
B. Absorción de hierro	12
C. Factores que influyen en la absorción de hierro	17
D. Interacción de hierro con otros minerales	18
E. Calcio	19
F. Balance normal del calcio	20
G. Absorción del calcio	21
H. Rol biológico del calcio	24
I. Interacción hierro y calcio	24
J. Justificación	27
II.   Hipótesis y objetivos	29
III.  Marco metodológico	31
a. Diseño de estudio	32
b. Descripción de la población	32
c. Cálculo del tamaño de la muestra y técnica de muestreo	32
d. Criterios de inclusión/exclusión	33
e. Definición de las variables	33
f. Estudio experimental	35
g. Procedimientos y métodos	39
h. Consideraciones éticas	43
i. Plan de análisis estadístico	43
IV.   Resultados	45
Discusión	53
Conclusión	56
Referencias bibliográficas	57
Anexos	
Consentimiento informado	
Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos Resumido	

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.	
Figura 1.	Estructura química del grupo hemo	10
Figura 2.	Modelo causal de la absorción de hierro	13
Figura 3.	Absorción intestinal de hierro	16
Figura 4.	Eje hepcidina/ferroportina de regulación del metabolismo de hierro	17
Figura 5.	Homeostasis de la Vitamina D, Regulación de Ca	20
Figura 6.	Absorción del calcio	22
Figura 7.	Expresión de DMT1 en membrana apical de células Caco-2	26
Figura 8.	Diseño experimental	38
Figura 9.	Efecto de la suplementación con 600mg Ca sobre el delta de la biodisponibilidad de Fe hemo	51
Figura 10.	Efecto de la suplementación con 600mg Ca Sobre el delta de la biodisponibilidad de Fe no hemo	52
Tabla 1.	Ingestas requerida de hierro para crecimiento en menores de 18 años, mediana de pérdida basal, pérdidas menstruales y total de requerimiento absoluto	11
Tabla 2.	Factores que influyen en la absorción de hierro dietario	18
Tabla 3.	Recomendación de ingesta de calcio (mg/día)	23
Tabla 4.	Factores nutricionales que afectan la absorción del calcio	23
Tabla 5.	Cronograma de actividades	37
Tabla 6.	Características de los sujetos	46
Tabla 7.	Marcadores de estado nutricional de hierro	47
Tabla 8.	Biodisponibilidad individual de hierro hemo	49
Tabla 9.	Biodisponibilidad individual de hierro no hemo	50

## RESUMEN

**Introducción:** Se ha descrito que el calcio inhibe la absorción aguda de hierro. Sin embargo, no existen evidencias que muestren el efecto a largo plazo de la suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro.

**Objetivo:** Determinar el efecto de la suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro.

**Metodología:** Estudio experimental, controlado, prospectivo, randomizado y doble ciego. Participaron 26 mujeres aparentemente sanas ( $40 \pm 5$  años): 13 recibieron 600mg de Ca elemental/día como  $\text{CaCO}_3$  (Grupo-Ca) y 13 recibieron placebo (Grupo-P) durante 47 días. Se determinó la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo antes y luego de 34 días de intervención. Se utilizaron los trazadores  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  para medir biodisponibilidad de hierro. La diferencia entre el grupo con calcio y placebo sobre el delta de la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo se determinó en un modelo de análisis de covarianza (ANCOVA), teniendo como factor fijo el tratamiento y la biodisponibilidad basal (inicial) como covariable.

**Resultados:** Ambos grupos presentaron un estado de nutrición de hierro similar. El promedio (EEM) del delta de la biodisponibilidad de hierro hemo fue 2.9% (3.0) para Grupo-P y 9.5% (2.5) para Grupo-Ca. El promedio (EEM) del delta de la biodisponibilidad de hierro no hemo fue -7.7% (4.6) para Grupo-P y -8.9% (5.5) para Grupo-Ca. ANCOVA demostró la no diferencia en el delta de la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo por grupo placebo y calcio luego de ajustar por la biodisponibilidad basal respectiva.

**Conclusión:** La suplementación con calcio no afectó negativamente la biodisponibilidad de hierro.

**Trial registration:** ISRCTN89888123

**Palabras claves:** absorción, biodisponibilidad, hierro, hemo, radioisótopos de hierro, calcio.

## **ABSTRACT**

**Background:** Although previous studies have observed that calcium inhibits acute iron absorption, there is no scientific evidence to support long-term effects of calcium supplementation on iron bioavailability.

**Objective:** To determine the effect of calcium supplementation on iron bioavailability.

**Methods:** Prospective, randomized, controlled, double blinded clinical trial. Twenty-six apparently healthy women participated in the study ( $40\pm 5$  years): 13 received 600 mg of elemental Ca/day as  $\text{CaCO}_3$  (Group-Ca) and 13 received placebo (Group-P) during 47 days of follow up. Heme iron and non-heme iron absorptions were determined before and after 34 days of treatment using  $^{55}\text{Fe}$  and  $^{59}\text{Fe}$  radioisotopes. ANCOVA was used to compare delta iron bioavailability between groups adjusting for basal iron bioavailability as a covariate.

**Results:** Both groups presented similar iron status. The delta mean (SEM) heme-iron bioavailability was 2.9% (3.0) for Group-P and 9.5% (2.5) for Group-Ca. The delta mean (SEM) nonherme-iron bioavailability was -7.7% (4.6) for Group-P and -8.9% (5.5) for Group-Ca. ANCOVA demonstrated no differences on heme iron and non-heme iron delta bioavailabilities after adjusting for basal bioavailability.

**Conclusion:** Calcium supplementation does not seem to affect negatively iron bioavailability

**Trial registration:** ISRCTN89888123

**Keywords:** absorption, bioavailability, iron, heme iron radioisotopes, calcium.

## **I. MARCO TEÓRICO**

## A. HIERRO

El hierro es el cuarto elemento químico más abundante de la tierra, su peso molecular es 55.847 gramos por mol (1, 2). Este metal se encuentra comúnmente en dos estados químicos, la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y la forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), cualidad que le permite oxidarse o reducirse (es decir, donar o aceptar electrones) (3). Es por ello que el hierro es capaz de participar en reacciones de óxido reducción.

La mayor parte de hierro sistémico (70%) está presente en los glóbulos rojos, formando parte de la hemoglobina, una proteína compuesta por cuatro subunidades, cada subunidad contiene un grupo hemo, anillo de protoporfirina fuertemente quelado al hierro (4). (Ver figura 1)

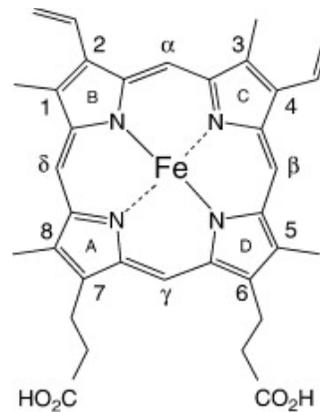


Figura 1. Estructura química del grupo hemo

*Adaptado de: Landfried DA, Vuletic DA, Pond MP, Lecomte JT. Structural and thermodynamic consequences of b heme binding for monomeric apoglobins and other apoproteins. Gene. 2007 Aug 15;398(1-2):12-28.*

El resto de hierro corporal está como depósito (25%) en la ferritina y hemosiderina, en compartimentos menores (4%) como la mioglobina y la transferrina, y en diversos sistemas enzimáticos (<1%) que lo contienen o lo utilizan como cofactor (5-10).

El hierro está involucrado en diversas funciones biológicas. Participa en los procesos de transporte y almacenamiento de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y síntesis de ADN (11-18). Sin embargo, su exceso puede resultar tóxico, produciendo daño celular por estrés oxidativo, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno vía reacción de Fenton, las cuales actúan sobre componentes biológicos como los lípidos, proteínas y ADN (19-22).

Por lo tanto, la absorción, concentración y estado redox de hierro deben ser cuidadosamente regulados por el organismo. Es por ello que, ante una sobrecarga de hierro, el organismo responde disminuyendo la captación y la absorción de este mineral, evitando así el exceso y su potencial efecto tóxico (23-25). Este mecanismo de regulación homeostático de hierro es controlado a nivel de la absorción intestinal en el enterocito (26).

Se estima la pérdida corporal de hierro en alrededor de 14 µg/Kg de peso/día, dada principalmente por descamación de células del tracto gastrointestinal, genitourinario y de las vías respiratorias (27). En el caso de las mujeres en edad fértil se adicionan pérdidas a través de la menstruación (28, 29).

En cuanto al requerimiento nutricional de hierro, está dado para cubrir las demandas de crecimiento en menores de 18 años, pérdidas de hierro basal, y pérdidas menstruales en el caso de las mujeres en edad fértil (7).

Tabla 1 Ingestas requerida de hierro para crecimiento en menores de 18 años, mediana de pérdida basal, pérdidas menstruales y total de requerimiento absoluto

Grupo	Edad (años)	Peso corporal promedio (kg)	Req. ingesta para crecimiento (mg/día)	Pérdida basal mediana (mg/día)	Pérdidas menstruales		Total requerimiento absoluto †	
					mediana (mg/día)	percentil 95 (mg/día)	mediana (mg/día)	percentil 95 (mg/día)
Niños	0.5-1	9	0.55	0.17			0.72	0.93
	1-3	13.3	0.27	0.19			0.46	0.58
	4-6	19.2	0.23	0.27			0.50	0.63
	7-10	28.1	0.32	0.39			0.71	0.89
Masculino	11-14	45	0.55	0.62			1.17	1.46
	15-17	64.4	0.60	0.90			1.50	1.88
	18+	75		1.05			1.05	1.37
Femenino	11-14 <sup>b</sup>	46.1	0.55	0.65			1.20	1.40
	11-14	46.1	0.55	0.65	0.48 <sup>c</sup>	1.90 <sup>c</sup>	1.68	3.27
	15-17	56.4	0.35	0.79	0.48 <sup>c</sup>	1.90 <sup>c</sup>	1.62	3.10
	18+	62		0.87	0.48 <sup>c</sup>	1.90 <sup>c</sup>	1.46	2.94
Pos menopausia		62		0.87			0.87	1.13
Nodrizas		62		1.15			1.15	1.50

† Total Requerimientos absoluto = requerimiento para crecimiento + pérdida basal + pérdida menstrual (F)

<sup>a</sup> Basado en parte sobre un reporte conjunto FAO/OMS de 1988 y en nuevos cálculos de la distribución de los requerimientos de hierro en mujeres menstruantes

<sup>b</sup> Post menopausia

<sup>c</sup> Efecto de la variación normal en la concentración de hemoglobina.

Tomado de: FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 13. Iron. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 2002.

## **B. ABSORCIÓN DE HIERRO**

En este punto cabe señalar que la absorción de hierro involucra diversos aspectos: los factores que condicionan la absorción, las circunstancias que pueden alterar esta absorción, el traspaso del mineral hacia la circulación, y los mecanismos de transporte. Desde una mirada más amplia, el concepto de biodisponibilidad hace referencia a la digestión, absorción y utilización metabólica del nutriente (30). La biodisponibilidad de hierro se puede cuantificar como la fracción de absorción, es decir el valor numérico que relaciona las concentraciones plasmáticas de la administración extravascular u oral (31, 32).

La absorción de hierro depende de factores luminales, como el tipo de hierro (hemo o no hemo), y presencia de promotores e inhibidores; y/o de factores sistémicos, como el estado nutricional de hierro, embarazo e inflamación (ver figura 2).

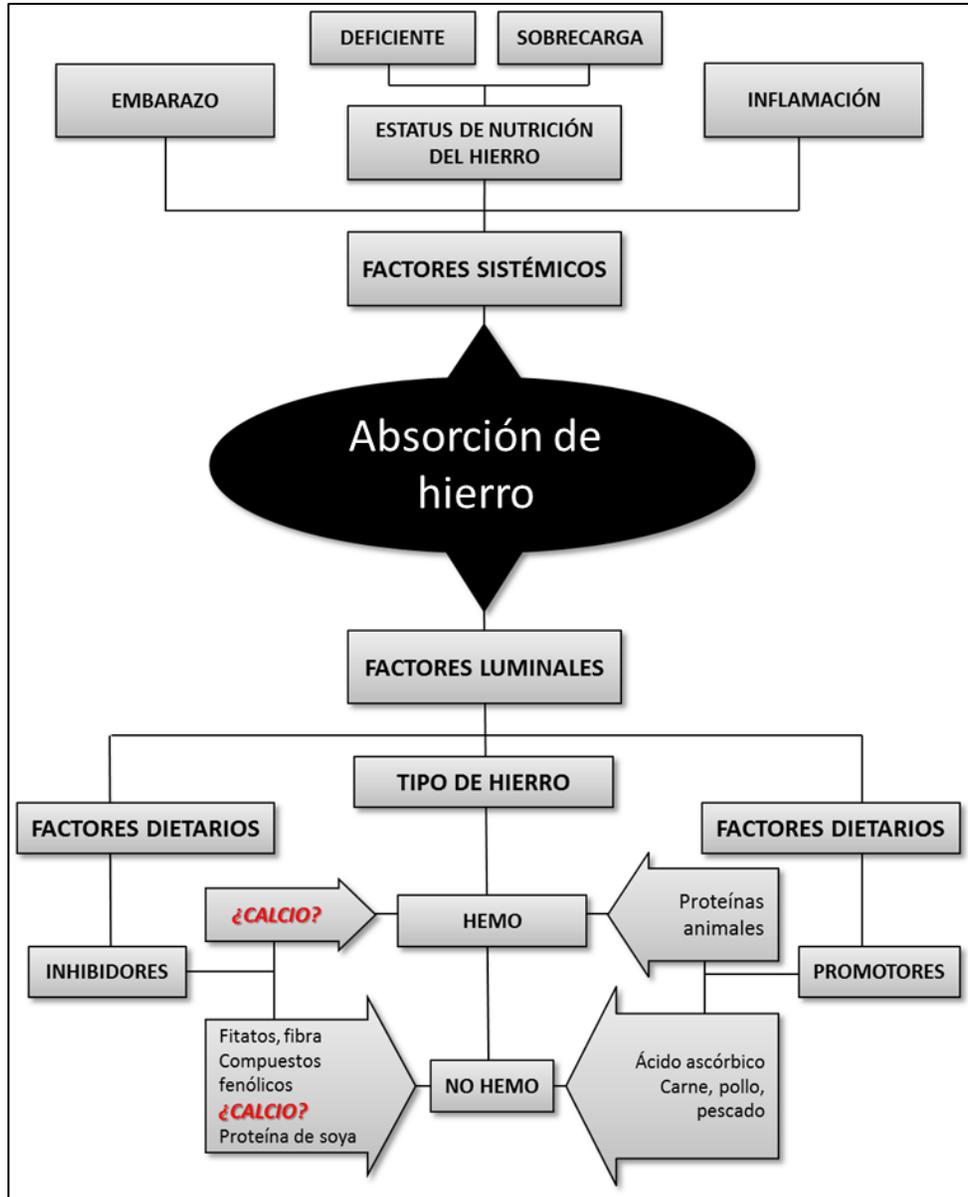


Figura 2. Modelo causal de la absorción de hierro

Existen dos formas principales en las que se encuentra el hierro en la dieta, siendo estas las formas hemo y no hemo (31, 33). Se postula una tercera vía de absorción de hierro como ferritina (34).

La hemoglobina y mioglobina son la fuente principal de hierro hemo, provenientes de carnes, vísceras y otros alimentos de origen animal. Por otro lado, el hierro no hemo es obtenido, en su mayoría, de los alimentos vegetales, tales como los cereales, leguminosas, frutas y verduras;

también es obtenido de alimentos de origen animal, por ejemplo: huevo e hígado; y de los suplementos solubles de hierro (35).

Cerca del 95% de hierro en la dieta es de tipo no hemo. Sin embargo, la absorción de ambos tipos de hierro es distinta. En promedio la absorción de hierro hemo es alrededor del 25% con un rango entre 10% a 40%, dependiendo del estado nutricional de hierro (es decir, sobrecarga o déficit) (36, 37) y de otros factores como la temperatura de cocción de los alimentos, la digestión gástrica y la cantidad de hierro hemo (38, 39). En cuanto al hierro no hemo, este se absorbe entre 1% a 15%. Al igual que el hierro hemo, su absorción depende de diversos factores, tales como el estado nutricional de hierro; la forma química y la presencia de favorecedores, por ejemplo: ácido ascórbico, proteínas; y de inhibidores de la absorción, como las fibras, polifenoles y soya (40).

Los mecanismos de absorción a nivel intestinal son distintos para ambas formas de hierro (33). La mayor parte de la absorción se da en el duodeno y el yeyuno proximal (41, 42).

En cuanto a la absorción de hierro hemo, se han propuesto dos mecanismos, uno es vía endocitosis a través de receptores de membrana a nivel apical como metaloporfirina. Otra hipótesis es que el hierro hemo ingresa al enterocito vía un transportador específico, la proteína transportadora de hierro hemo 1 (heme carrier protein 1 - HCP1) (43-46). Una vez dentro del enterocito, el grupo hemo es catalizado por la hemo oxigenasa (HO), separando el hierro del anillo de protoporfirina. Así, el hierro queda libre para sumarse al pool de hierro en el citosol (25, 46) (ver figura 3). A nivel basolateral del enterocito, se ha propuesto que el grupo hemo no degradado por la HO es exportado hacia la circulación vía transportador FLVCR (Feline Leukemia Virus Subgroup C Cellular Receptor), como precursores de eritroides esenciales para la eritropoyesis (43, 47).

Respecto al hierro no hemo, la dieta aporta el hierro en su forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ) o férrica ( $Fe^{3+}$ ). En la fase gástrica de la digestión, el ácido clorhídrico y la pepsina reducen parte de hierro de la forma férrica ( $Fe^{3+}$ ) a la forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ). En el duodeno, el hierro no reducido en la fase gástrica es reducido por una proteína de membrana del borde de cepillo con capacidad reductasa, la citocromo duodenal B (DcytB) (48), y por otros agentes reductores como el ácido ascórbico, reduciéndolo a la

forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Luego el hierro es internalizado a través del transportador de metales divalentes (DMT1) (49-51). (Ver figura 3)

Al igual que el hierro liberado por la acción de la HO desde el hemo, el hierro ingresado vía DMT1 pasa a formar parte del pool de hierro lábil citosólico. A este punto, ambos tipos de hierro, el proveniente del hemo y del no hemo, se hacen indistinguibles y compiten por el transporte hacia la circulación (52). Este pool de hierro tiene dos posibles vías: 1) almacenamiento en la ferritina del enterocito para su utilización en procesos metabólicos, tales como división celular en las bases de los pliegues intestinales (53), este hierro retenido en la ferritina citoplasmática del enterocito se pierde con el recambio normal de la célula (54); 2) exportación hacia la circulación vía transporte de eflujo basolateral, ferroportina (46, 55). Ésta última transporta hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) desde el citosol hacia la circulación. Luego, el hierro es oxidado por la acción de una proteína de la membrana basolateral con capacidad oxidasa, la hefestina (56) y captado por la apotransferrina, una glicoproteína plasmática con dos sitios de unión para hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), la cual al unirse al hierro se convierte en transferrina, y cuya función es la de transportar hierro hacia los tejidos (57).

A nivel basolateral, el enterocito expresa receptores para transferrina, permitiendo la entrada de hierro transportado por esta proteína. A través de este mecanismo la célula puede detectar el estatus de hierro sistémico, induciendo regulación negativa de su captación vía DMT1 a nivel apical (58).

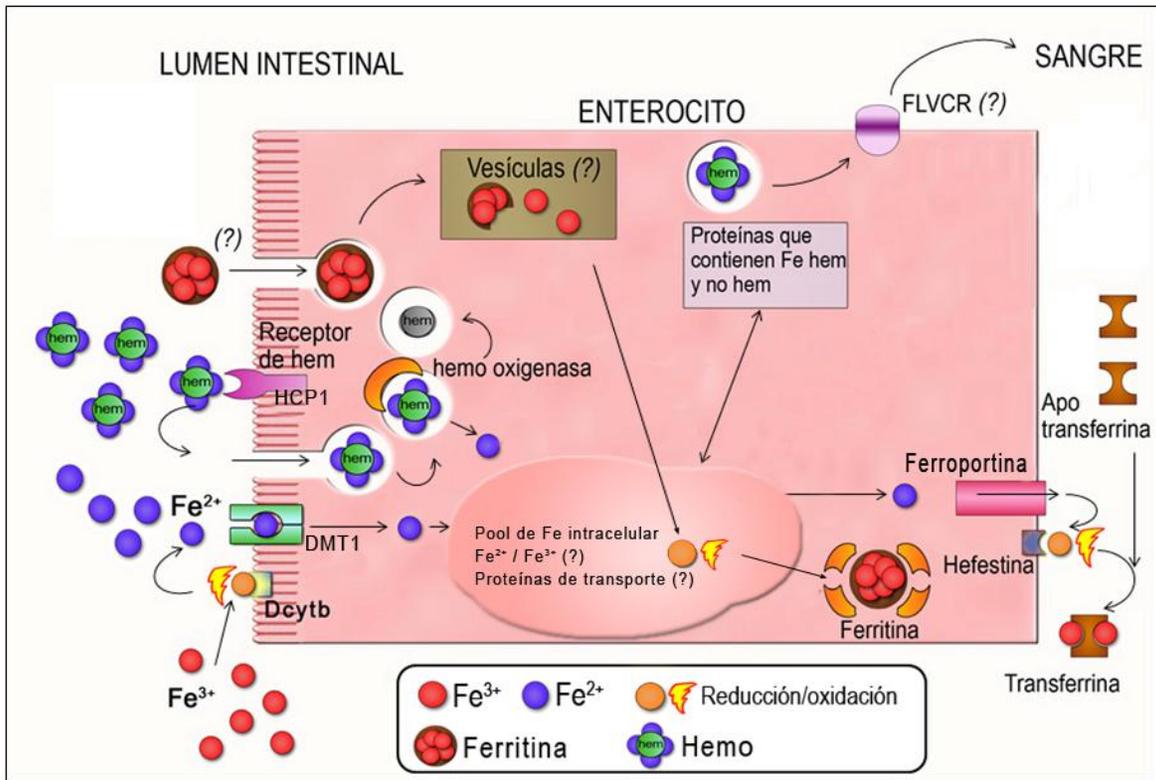


Figura 3. Absorción intestinal de hierro

Como mecanismo clave de regulación de la absorción de hierro se ha propuesto la acción de la hepcidina (hepatic bactericidal protein) (59-64), mediante la inhibición de la absorción de hierro dietario en el enterocito (65). La hepcidina es secretada en el hígado en respuesta a sobrecarga de hierro o inflamación (66, 67). En el enterocito actuaría uniéndose a la ferroportina en la membrana basolateral, generando una señalización que induce endocitosis de la ferroportina y su posterior degradación lisosomal (68, 69) (ver figura 4), provocando acumulación de hierro en el enterocito, inhibiendo la absorción y el transporte de hierro hacia la circulación. Por lo tanto, la hepcidina es un regulador negativo de la absorción y exportación de hierro celular (70, 71).

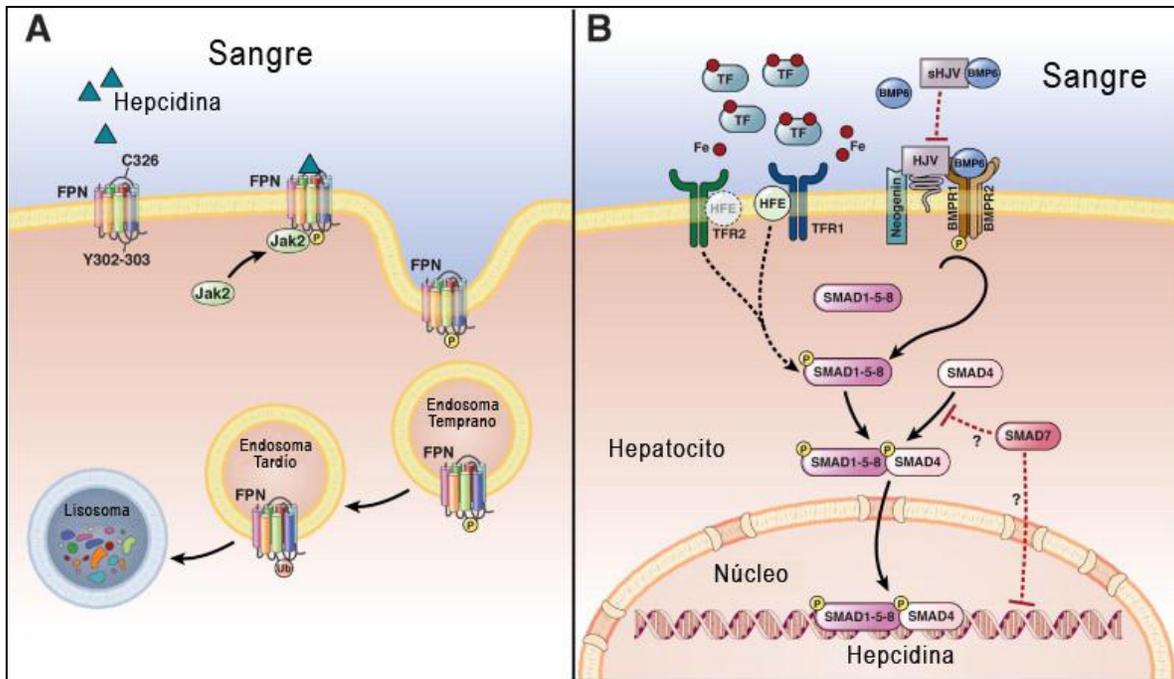


Figura 4. Eje hepcidina/ferroportina de regulación del metabolismo de hierro

A. señalización de hepcidina en células, mediante unión a receptor de membrana ferroportina, internalización y degradación lisosomal de ferroportina. B. Expresión de hepcidina en hepatocito.

FPN: ferroportina; TF: transferrina; TFR 1 y 2: receptor de transferrina

Adaptado de: Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):393-408,e1-2.

### C. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ABSORCIÓN DE HIERRO

En cuanto a los favorecedores e inhibidores de la absorción de hierro, es convencionalmente aceptado que el calcio sea el único componente dietario implicado en la inhibición de la absorción de hierro hemo y no hemo (72-81).

El hierro no hemo es influenciado por una cantidad de factores que afectan su absorción (82). Los factores dietéticos que disminuyen la absorción de hierro no hemo incluyen a la fibra (83), especialmente la celulosa y la pectina (84), la soya (85), y compuestos polifenólicos (86-89), también se señala al calcio como un inhibidor. Entre los favorecedores de la absorción de hierro no hemo se encuentran el ácido ascórbico (90-92) y compuestos derivados de la digestión de las proteínas de carnes (93). En cambio, el hierro hemo parece ser afectado por el calcio, el cual podría disminuir su absorción; las proteínas animales facilitan su absorción (38, 94-96).

En la tabla 2 se encuentran resumidos los principales factores que influyen en la absorción de hierro dietario (7).

Tabla 2. Factores que influyen en la absorción de hierro dietario

<b>Absorción de hierro hemo</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estado nutricional de hierro</li> <li>• Cantidad de hierro hemo en la dieta, especialmente proveniente de carnes</li> <li>• Preparación de los alimentos (tiempo, temperatura)</li> </ul>	
<b>Absorción de hierro no hemo</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estado nutricional de hierro</li> <li>• Cantidad de hierro no hemo potencialmente biodisponible</li> </ul> <p style="text-align: center;">* balance entre factores favorecedores e inhibidores</p>	
<b>Favorecedores</b>	<b>Inhibidores</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido ascórbico (ciertos jugos de frutas, frutas, papas y ciertos vegetales)</li> <li>• Carne, pollo, pescado y otros alimentos marinos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fitatos y otros inositol fosfatos (productos de panificación, pan hecho con harina de alta extracción, cereales para desayuno, avena, arroz [especialmente no pulido], pastas, cocoa, nueces, soya y frijoles)</li> <li>• Compuestos fenólicos ligadores de hierro (te, café, cocoa, ciertas especias, ciertos vegetales y la mayoría de los vinos tintos)</li> <li>• Proteína de soya</li> </ul>

*Adaptado de: FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 13. Iron. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 2002.*

#### **D. INTERACCIÓN DE HIERRO CON OTROS MINERALES**

Existen evidencias de que al ingerir más de un mineral se provocan interacciones entre ellos en al menos cuatro puntos: a nivel intraluminal, en la captura e internalización del mineral por el lado apical del enterocito, en el traspaso del nutriente desde el lado basolateral del enterocito hacia la circulación y en el transporte por el plasma (97-99).

El hierro inhibe la absorción intestinal de zinc cuando se encuentra en matrices alimentarias simples y en proporciones Fe:Zn mayores de 2:1 (100). Este efecto inhibitorio desaparece cuando ambos compuestos son administrados en matrices complejas y sólo se hace significativo en proporciones Fe:Zn de 25:1 (101). Mientras que la evidencia sobre el efecto del zinc en la

absorción de hierro es contradictoria. Se ha observado una disminución de la absorción de hierro cuando ambos compuestos han sido consumidos en solución o en pan (102-105); dicho efecto desaparece cuando el zinc y el hierro son ingeridos en preparaciones de carnes tipo hamburguesas, fórmulas lácteas o leche humana (103, 105).

Recientemente, Olivares y cols. (2007) observaron que el zinc inhibe la absorción de 0.5 mg de hierro cuando se encuentra en proporciones de Zn:Fe de 5:1 o más (106), dicho efecto desaparece cuando el zinc es ingerido 30 ó 60 minutos antes que el hierro (107); y que en dosis farmacológicas (11 mg Zn:10 mg Fe) la inhibición ocurre a relaciones molares 1:1 (108).

Respecto de la interacción entre hierro y cobre existen pocos estudios. Estos reportan que el hierro no afecta la absorción del cobre (109) y que el cobre pareciera no afectar la biodisponibilidad ni el estado nutricional de hierro (110, 111). No hay nada sobre efectos relevantes del fluor y el yodo sobre la absorción de hierro.

## **E. CALCIO**

El calcio es un catión divalente de peso atómico 40.08. En abundancia es el quinto elemento constitutivo del ser humano después del oxígeno, carbono, hidrógeno y nitrógeno. Constituye casi el 2% del peso corporal total (112, 113).

El calcio es un nutriente esencial debido a sus múltiples funciones en el organismo, entre las que se encuentran la constitución y mantención del esqueleto, la neurotransmisión, la contracción muscular, la mitosis, la división celular, la fertilización y la coagulación sanguínea (114-117). La dieta es la principal fuente de este nutriente. En el cuerpo, el calcio se encuentra a nivel extracelular e intracelularmente.

El calcio generalmente forma un complejo con la calmodulina que participa en numerosas reacciones enzimáticas. Un adulto tiene alrededor de 1.2 Kg de calcio, distribuido en 99% en el esqueleto, 0.9% en dientes y tejidos blandos y 0.1% en líquido extracelular.

## F. BALANCE NORMAL DE CALCIO

El balance del calcio es mantenido por el tracto gastrointestinal, el hueso y el riñón (118, 119), y regulado por la hormona paratiroidea (PTH), la calcitonina y la vitamina D. (Ver figura 5)

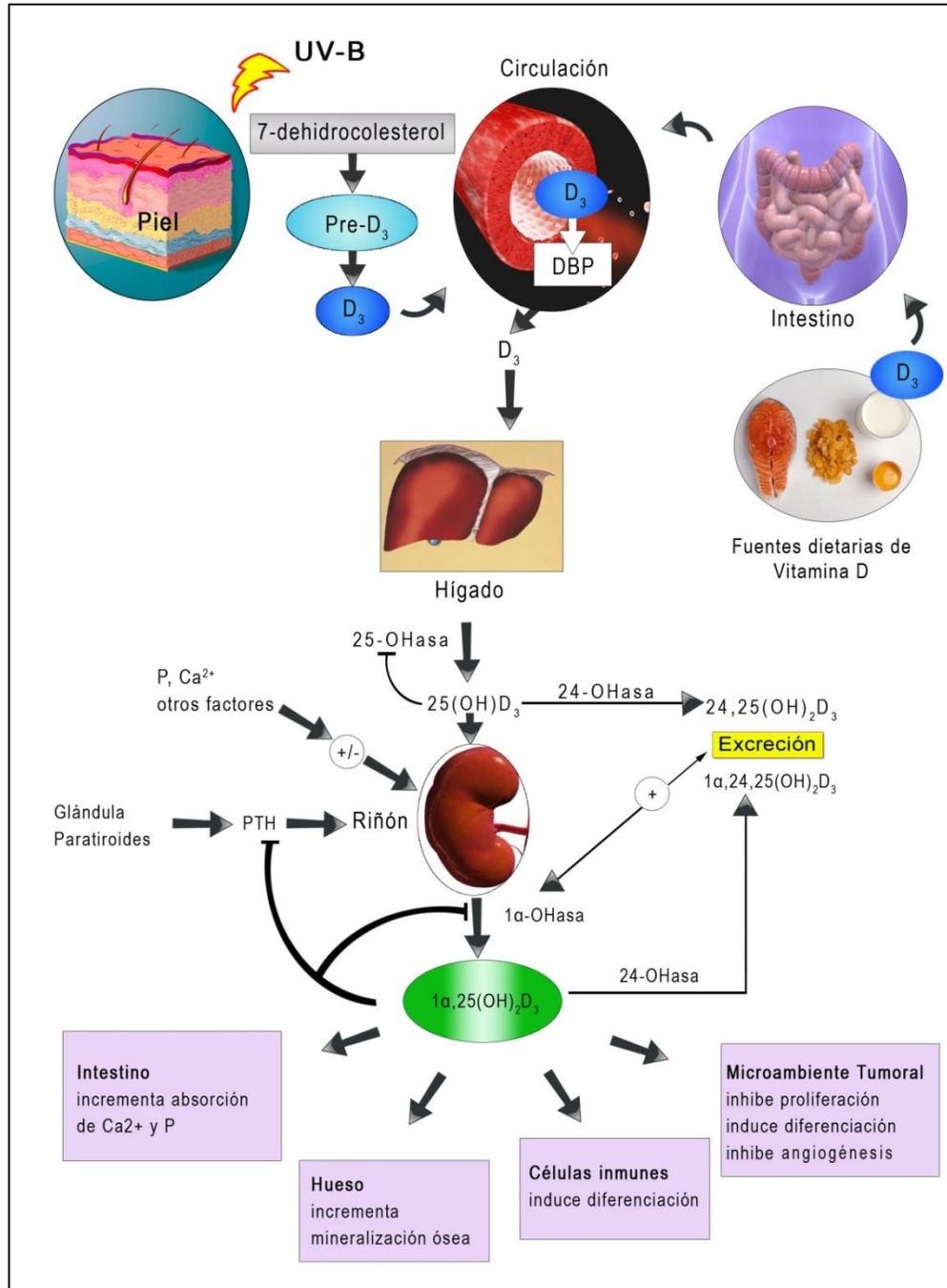


Figura 5. Homeostasis de la vitamina D, Regulación de Ca  
 UV-B: radiación ultravioleta de onda media; DBP: proteína ligadora de vitamina D; PTH: hormona paratiroidea; P: fósforo; Ca: Calcio; D<sub>3</sub>: Vitamina D<sub>3</sub>; \*OHasa: enzima hidroxilasa

La dieta debe de aportar cerca de 1000 mg calcio al día, de los cuales 350 mg son absorbidos (120), pasando a formar parte del pool de calcio en el líquido extracelular, de donde 500 mg son destinados a la formación de hueso (121), este último pierde diariamente cerca de 500 mg de calcio mediante resorción ósea (122). Otros 10000 mg de calcio son filtrados por el riñón, de los cuales 9900 mg son reabsorbidos en un 60% por el túbulo proximal, un 30% en el asa de Henle y el resto en el túbulo distal (123). Finalmente, por secreción fecal endógena se eliminan 250 mg de calcio, que sumados a los 650 mg no absorbidos por el intestino y los 100 mg perdidos por la orina completan los 1000 mg que requieren ser ingeridos diariamente (114, 117, 124).

### **G. ABSORCIÓN DEL CALCIO**

El calcio dietario se absorbe en el intestino delgado por dos mecanismos, por transporte activo que es saturable y por un proceso de difusión pasiva que es insaturable (125-128).

Cuando la cantidad de calcio en la dieta es normal la absorción intestinal ocurre por la vía transcelular saturable, con tres componentes primarios participando en serie. Estos incluyen a los canales epiteliales de calcio, TPRV5 y TPRV6 (ex EcaC1 y ex CaT1) que favorecen la transferencia del calcio del lumen al enterocito (129-132); las cabildinas intracelulares (cabildina de mamíferos D9k y cabildina aviar D28k), las cuales se unen al calcio con una alta afinidad (133, 134); y las bombas de calcio ATP-activadas en la membrana basolateral (PMCA1b y NCX1), las cuales transportan el calcio citosólico hacia la circulación (135). (Ver figura 6)

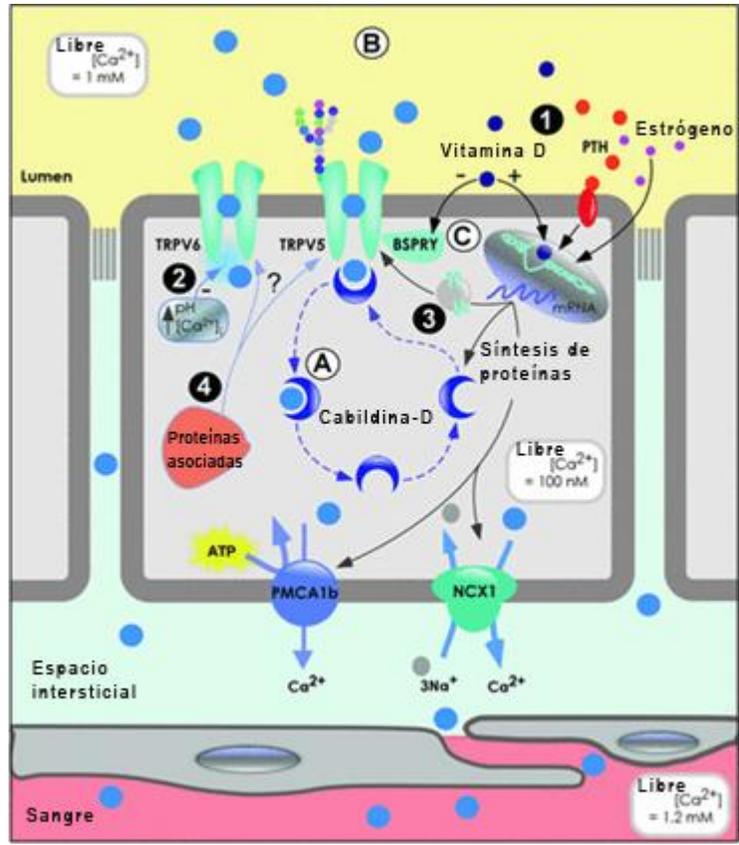


Figura 6. Absorción del calcio

Ca<sup>2+</sup>: calcio; Na<sup>+</sup>: sodio; PTH: hormona paratiroidea; TRPV 6 y 5: canales epiteliales de calcio; BSPRY: proteína inhibidora de canales de calcio TRPV5; PMCA1b y NCX1: bombas de calcio ATP-activadas en membrana basolateral.

*Adaptado de: Schoeber JP, Hoenderop JG, Bindels RJ. Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6. Biochem Soc Trans. 2007 Feb;35(Pt 1):115-9.*

Simultáneamente la vitamina D3 (1, 25 dihidroxicolecalciferol) estimula la síntesis de los canales de calcio epiteliales (136), las bombas de calcio en la membrana basolateral (137, 138) e induce la formación de cabildinas (137).

Cuando el contenido de calcio de la dieta es alto entonces se utiliza la segunda vía, donde el calcio es absorbido por difusión. El calcio atraviesa por el espacio transcelular requiriendo que en el lumen intestinal haya una concentración de calcio libre de 2-6 mmol/L, vencer la barrera de energía de +6 mV de potencial eléctrico y la concentración de calcio transcelular de 1.25 mmol/L (133, 139). (Ver figura 5)

En cuanto al requerimiento nutricional de calcio, está dado para cubrir las demandas de crecimiento en menores de 18 años; requerimiento durante el embarazo y lactancia materna; y el requerimiento durante la vejez (112, 117).

Tabla 3. Recomendación de ingesta de calcio (mg/día)

	Australia 1991 RDI	UK 1991 RNI	UE 1993 <sup>a</sup>	EEUU/Canadá1997 AI	IOM RDA <sup>b</sup>
Embarazadas (3 <sup>er</sup> trimestre)	1100	700	700	1000-1300	1000/1300 <sup>c</sup>
Nodrizas	1200	1250	1200	1000-1300	1000/1300 <sup>c</sup>
Lactante	300 (leche humana) 500 (leche de vaca)	525	400	210-270	*
Niños	530-800	350-550	400-550	500-800	1000
Adolescentes					
Masculino	1000-1200	1000	1000	1300	1300
Femenino	800-1000	800	800	1300	1300
Adultos					
Masculino	800	700	700	1000	1000
Femenino	800	700	700	1000	1000
Adultos mayores					
masculinos >65a	800	700	700	1200	1000
Mujer posmenopáusica	1000	700	700	1200	1200

<sup>a</sup> Referencia de ingesta poblacional

<sup>b</sup> Instituto de Medicina de Estados Unidos (IOM), Referencia de ingesta dietaria (DRIs) para calcio y vit.D

<sup>c</sup> Embarazadas y nodrizas adultas/adolescentes

*FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 11. Calcium. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 2002. Ross AC, Manson JAE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, y cols. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 96(1):53.*

Por otro lado, al igual que en la absorción de hierro, existen favorecedores e inhibidores dietarios de la absorción del calcio, entre los cuales se encuentran la lactosa, las grasas, la razón calcio/fósforo, la caseína y la proteína de soya (140).

Tabla 4. Factores nutricionales que afectan la absorción del calcio

Nutrientes	Efecto sobre la absorción del calcio
Lactosa	Incrementa
Caseína	Incrementa
Proteína de soya	Disminuye
Alta razón Ca/P	Incrementa
Triglicéridos de cadena media	Incrementa
Ácido graso oleína de palma	Disminuye

*Adaptado de: Bass JK, Chan GM. Calcium nutrition and metabolism during infancy. Nutrition. 2006 Oct;22(10):1057-66.*

## **H. ROL BIOLÓGICO DEL CALCIO**

Desde el momento de la fertilización el calcio empieza a jugar su rol biológico, y todo el transporte de calcio que se produce en la placenta y glándula mamaria está influenciado por el balance de calcio de la madre (141, 142). Luego del nacimiento el niño demanda grandes cantidades de calcio destinadas al crecimiento óseo, esta demanda decae significativamente a medida que avanza la edad.

Por otro lado, factores como el pH, concentración de calcio extracelular y varias hormonas han demostrado tener influencia en el movimiento del calcio a través del epitelio renal (143-145). En general, el transporte de calcio es mediado por una compleja cadena de procesos que son regulados por factores fisiológicos, hormonales y de desarrollo.

## **I. INTERACCIÓN HIERRO Y CALCIO**

Se han realizado múltiples estudios sobre el efecto del calcio sobre la absorción de hierro, todos muy heterogéneos y contradictorios. Alguno de los cuales han encontrado que el calcio inhibe la absorción de hierro hemo y no hemo (72-81).

Monsen y cols. (1976) encontraron disminución de la absorción de hierro no hemo sólo cuando el calcio era administrado en conjunto con fosfato en una matriz alimentaria, más no encontró efecto de la administración de 178 mg de calcio solo sobre la absorción de hierro no hemo (80).

De igual manera, Dawson-Hughes y cols. (1986) encontraron que la administración de 500 mg de calcio como carbonato o hidroxapatita (que contiene calcio y fosfato) reducen la absorción de hierro no hemo cuando es administrado en una matriz alimentaria, promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de  $6.3 \pm 2.0\%$  con placebo a  $3.2 \pm 1.2\%$  con calcio; y  $1.7 \pm 0.4\%$  con hidroxapatita,  $p < 0.05$  (74).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que la administración de calcio, desde 300 mg, disminuye la absorción de hierro no hemo, cuando es administrado en una matriz alimentaria (72, 73, 75, 76, 78). Además, en estudios similares se ha observado que la administración de calcio disminuye la absorción de hierro hemo y no hemo (77, 79); El mismo efecto del calcio sobre la

absorción de hierro hemo encontró Roughead y cols. (2005), pero no encontró disminución de la absorción de hierro no hemo (81).

Por su parte, Gleerup y cols. (1993), en un diseño que buscaba determinar la duración del efecto de inhibición de la absorción de hierro, encontraron que luego de 2 a 4 horas de la administración de calcio en una matriz alimentaria en el desayuno, el calcio no inhibió la absorción de hierro no hemo (146).

Todos estos estudios comparten el hecho de que el efecto del calcio se observó en una matriz alimentaria, que se enfocaban en el efecto a corto plazo (agudo), y que no evaluaron el impacto sobre el estatus de nutrición de hierro.

En un estudio que buscaba determinar cambio en la absorción de hierro no hemo y en el estado nutricional de hierro a través de marcadores hematológicos y bioquímicos, Minihane y Fairweather-Tait (1998) encontraron inhibición aguda del consumo de 400 mg de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) en cada comida (1200 mg/d) sobre la absorción de hierro no hemo (media  $\pm$  EEM) de  $15.8 \pm 2.1\%$  a  $4.7 \pm 1.4\%$ ,  $p < 0.05$ . Sin embargo, no encontraron cambios significativos en marcadores de nutrición de hierro después de 6 meses de suplementación con 1200 mg de calcio/d (147).

Así mismo, algunos estudios no han encontrado efecto de la administración de calcio sobre la absorción y/o el estado nutricional de hierro (147-153).

En dos estudios separados, realizados en niños, Abrams y cols. (2001) y Ames y cols. (1999) no encontraron cambio en la absorción de hierro no hemo luego de la incorporación de  $\geq 300$  mg calcio en una matriz alimentaria (148, 149).

De igual manera, en dos estudios en adultos, Grinder-Pedersen y cols. (2004) y Roughead y cols. (2002) no encontraron cambio en la absorción de hierro no hemo y hemo, luego de la incorporación de calcio (150, 153).

Por último, hay trabajos contradictorios en donde se ha encontrado efecto del calcio sobre la absorción de hierro y luego se contradicen (80, 147, 154).

En un enfoque distinto, dos estudios separados evaluaron el efecto de la suplementación con 500 mg de calcio a largo plazo, 6 y 12 meses, sobre marcadores del estado nutricional de hierro, sin encontrar cambios significativos (155, 156).

Desde una perspectiva celular, recientemente Thompson y cols. (2010) observaron una disminución en la expresión del transportador DMT1 en la membrana apical de células Caco-2 tratadas por 4 horas con 2.5 mM de calcio; 30  $\mu$ M hierro no hemo (citrato de amonio férrico); y calcio + hierro no hemo (Ver figura 6). Además, observaron una disminución en los niveles de ferritina plasmáticas a concentraciones de calcio de 1.25 y 2.5 mM. Sin embargo, no encontraron diferencias en la expresión de ferroportina en la membrana basolateral de dichas células (157). Estos resultados sugieren que el calcio inhibiría la absorción de hierro no hemo a nivel de la captación, más no su exportación basolateral. La reducción en los niveles de ferritina corrobora dichos hallazgos, debido a que la ferritina es un marcador de la absorción de hierro. También sugieren que el propio hierro estaría ejerciendo un efecto inhibitorio luego de 4 horas, permitiendo regular la absorción.

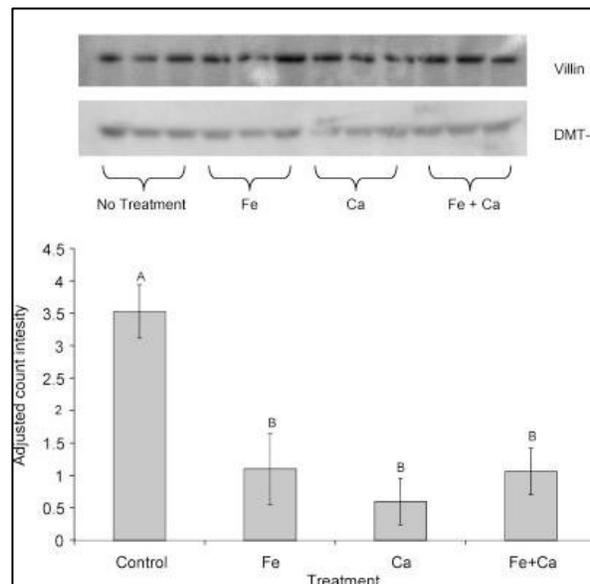


Figura 7. Expresión de DMT1 en membrana apical de células Caco-2

Western Blot muestra el efecto de diferentes tratamientos con 30  $\mu$ M de citrato de amonio férrico y/o 2.5 mM de cloruro de calcio sobre los niveles de DMT1 en la fracción de membrana de células Caco-2. Adaptado de: Thompson BA, Sharp PA, Elliott R, Fairweather-Tait SJ. Inhibitory effect of calcium on non-heme iron absorption may be related to translocation of DMT-1 at the apical membrane of enterocytes. *J Agric Food Chem.* 2010 Jul 28;58(14):8414-7.

## J. JUSTIFICACIÓN

La deficiencia de hierro es un problema a nivel mundial, siendo común entre las sociedades de bajos ingresos económicos (51, 158). Los efectos que ocasiona su deficiencia son conocidos, en especial durante los primeros años de vida, pudiendo afectar el desarrollo y el funcionamiento cerebral (159). En adultos ocasiona disminución de la capacidad para trabajar. Los grupos más vulnerables son los lactantes, preescolares, adolescentes y mujeres en edad fértil, especialmente las embarazadas (7).

Chile actualmente está viviendo una transición económica y epidemiológica nutricional, en la cual, al igual que en países desarrollados, ha aumentado el consumo de macro y microminerales, a través de suplementos o consumo de alimentos fortificados, pudiendo existir interacciones entre ellos y pudiendo ocasionar deficiencias nutricionales.

Existen resultados contradictorios en estudios que determinan el efecto del calcio sobre la absorción de hierro hemo y no hemo y/o el estado nutricional de hierro. Al revisar la literatura, los estudios que encontraron efecto del calcio sobre la absorción de hierro han sido, en su mayoría, a dosis de calcio por encima de 300 mg y en matrices alimentarias. Sin embargo, este patrón no parece ser replicado en niños, en donde no se pudo determinar cambio en la absorción de hierro, debido probablemente a la diferencia en los requerimientos nutricionales de este grupo.

Además, algunos estudios encontraron que el calcio efectivamente disminuye la absorción de hierro, más sin embargo no afecta a largo plazo el estado nutricional de hierro, siendo esto contradictorio.

La mayoría de los estudios que buscaban determinar el efecto del calcio sobre la absorción de hierro lo han hecho a través de experimentos en matrices alimentarias y determinando el efecto a corto plazo o agudo del calcio, es decir, evaluando la adición de calcio a alimentos y/o consumo de suplemento de calcio junto con los alimentos, sobre el efecto inmediato en la absorción de hierro.

Ninguno de los estudios revisados ha evaluado el efecto de la suplementación a largo plazo con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo a estómago vacío. Únicamente

Minihane y Fairweather-Tait (1998); Kalkwarf y Harrast (1998); y Mølgaard y cols. (2005) evaluaron el efecto a largo plazo de la suplementación con calcio, pero sobre marcadores de estado nutricional de hierro, los resultados fueron contundentes en los tres estudios, el calcio no afectó los marcadores de estado nutricional de hierro (147, 155, 156). Sin embargo, estos resultados no dejan claro el posible efecto inhibitorio de la suplementación a largo plazo con calcio sobre la absorción de hierro.

Por otro lado, existe evidencia en modelo celular (Caco2) del posible mecanismo por el cual el calcio estaría inhibiendo la absorción de hierro no hemo. Thompson y cols. (2010) encontraron que el calcio era capaz de inhibir la translocación del transportador de metales divalentes (DMT1) hacia la membrana apical del enterocito, evitando así la absorción de hierro (157).

Como estrategia de prevención y/o tratamiento de la deficiencia de hierro, existe una clara diferencia entre la fortificación y la suplementación, esta última consiste en la focalización de la intervención, permitiendo cubrir las necesidades de micronutrientes en grupos de alto riesgo, como los preescolares y las mujeres.

Este estudio, basado en un diseño en humanos no probado anteriormente, pretende determinar el efecto de 34 días de suplementación con 600 mg/día de calcio elemental como CaCO<sub>3</sub> sobre la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo. Los resultados contribuirán a aclarar las controversias que existen hasta el día de hoy y que impiden establecer recomendaciones respecto a la suplementación con ambos nutrientes.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Pregunta de investigación**

- ¿Un período de 34 días de suplementación con calcio disminuye la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo?

### **Hipótesis**

1. Un período de 34 días de suplementación con calcio disminuye la biodisponibilidad de hierro hemo.
2. Un período de 34 días de suplementación con calcio disminuye la biodisponibilidad de hierro no hemo.

### **Objetivo general**

- Determinar el efecto de la suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de 34 días de suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro hemo
2. Determinar el efecto de 34 días de suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro no hemo

### **III. MARCO METODOLÓGICO**

### **a. Diseño de estudio**

Se trata de un estudio de tipo experimental, controlado, prospectivo, aleatorio y doble ciego.

### **b. Descripción de la población**

La población objetivo estuvo conformada por mujeres pre menopáusicas de 33 a 47 años de edad, provenientes del sur-oriental de Santiago de Chile, específicamente de las comunas de Macul, Peñalolén y La Florida.

Para la selección de la muestra se colocaron anuncios de invitación en el Centro de Salud Familiar Dr. Felix de Amesti de la Comuna de Macul, en el Centro de Diagnóstico Nutricional del INTA (CEDINTA), en la Escuela Municipal E194 Julio Montt Salamanca de la comuna de Macul; así como en diferentes puntos de las comunas de Macul, Peñalolén y la Florida. Además, se habilitó un espacio virtual, utilizando herramientas desarrolladas para redes sociales, con el fin de interactuar con las posibles participantes; y una encuesta digital, utilizando herramienta Google Docs, para recopilar información de las participantes.

### **c. Cálculo del tamaño de la muestra y técnica de muestreo**

Las causas de la variabilidad fisiológica y variación día a día que presenta la absorción de hierro, en un mismo individuo (intra sujeto), no han sido plenamente identificadas, pero presumiblemente se asocian con cambios en la motilidad gastrointestinal y las secreciones gástrica, pancreática o biliar (94).

Sin embargo, es adecuado realizar protocolos de absorción de hierro, incluyendo grupos de entre 12 y 13 sujetos con un mínimo de 8 por protocolo de absorción (160). Por otro lado, postulamos encontrar diferencias de 5% de hierro absorbido entre las pruebas y la dosis de hemo solo, el n calculado para un ANOVA de dos vías fue de 9 voluntarios (error  $\alpha=0.05$  y poder=80%) (161).

Basado en lo anterior, se decidió trabajar con 14 sujetos por grupo (experimental y control) teniendo en cuenta las posibles pérdidas durante el protocolo experimental, ya sea por rechazo a la ingesta o efectos laterales no deseados después de la ingesta.

El muestreo se realizó por conveniencia.

#### **d. Criterios de inclusión/exclusión**

Fueron incluidas en el estudio mujeres entre 33 y 47 años. Además, se obtuvo el consentimiento informado firmado previo de las participantes.

Por otro lado, los criterios de exclusión contemplaron enfermedad aparente, excepto anemia ( $Hb < 120$  g/L); uso rutinario de medicamentos; embarazo e interés por embarazarse; lactancia materna; uso de suplemento de hierro y/o calcio; mujeres postmenopáusicas; participación en estudios previos, en especial que incluyeran la administración de hierro trazado radioactivamente; y fumar.

A cada participante se le realizó una prueba de embarazo antes del inicio del estudio.

#### **e. Definición de las variables**

##### Variable independiente

- Suplementación con calcio: variable cualitativa nominal categórica, expresada como sí o no, participantes recibieron 600 mg/día de calcio elemental como  $CaCO_3$  por 34 días

##### Variables dependientes

###### Outcome principal

- Biodisponibilidad de hierro hemo: variable cuantitativa continua de razón, expresada como % de absorción.
- Biodisponibilidad de hierro no hemo: variable cuantitativa continua de razón, expresada como % de absorción.
- Delta de biodisponibilidad de hierro hemo: variable cuantitativa continua de razón, expresada como la diferencia entre la biodisponibilidad final menos la biodisponibilidad inicial.
- Delta de biodisponibilidad de hierro no hemo: variable cuantitativa continua de razón, expresada como la diferencia entre la biodisponibilidad final menos la biodisponibilidad inicial.

## Outcome secundario

- Razón biodisponibilidad post intervención/pre intervención de hierro hemo: variable cuantitativa continua de razón, expresada como fracción sin unidad de medida.
- Razón biodisponibilidad post intervención/pre intervención de hierro no hemo: variable cuantitativa continua de razón, expresada como fracción sin unidad de medida.

## Variables control

- Consumo diario de calcio: variable cuantitativa continua de razón, expresada en miligramos de calcio/día
- Consumo diario de hierro: variable cuantitativa continua de razón, expresada en miligramos de hierro/día
- Consumo diario de energía: variable cuantitativa continua de razón, expresada en kilocalorías/día
- Consumo diario de proteínas: variable cuantitativa continua de razón, expresada en gramos/día
- Consumo diario de lípidos: variable cuantitativa continua de razón, expresada en gramos/día
- Consumo diario de carbohidratos: variable cuantitativa continua de razón, expresada en gramos/día
- Marcadores de estado nutricional de hierro: variables cuantitativas continuas intervalares, expresadas en sus respectivas unidades de medida: Hemoglobina; volumen corpuscular medio eritrocitario (VCM); hierro sérico; capacidad total de fijación de hierro (TIBC); % de saturación de transferrina; protoporfirina libre eritrocitaria; y ferritina sérica.
- Marcadores de estado nutricional: variables cuantitativas continuas intervalares, expresadas en sus respectivas unidades de medidas. Peso (Kg); talla (cm); e IMC (Kg/m<sup>2</sup>).

#### **f. Estudio experimental**

El estudio del efecto de la suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro consignó la administración, a estómago vacío, de 2 preparados de hierro hemo y 2 preparados de hierro no hemo, marcados con radioisótopos. Adicionalmente, 2 colecciones de sangre por punción venosa en cada protocolo.

El estudio incluye la suplementación supervisada con 600 mg/d de calcio elemental como  $\text{CaCO}_3$  o placebo durante 34 días, administrado los días de semana y fines de semana. Además, las participantes recibieron suplemento de Ca los siguientes 13 días posteriores a la realización del estudio de absorción post-intervención con el fin de mantener la exposición al calcio inclusive durante el período de integración de hierro al glóbulo rojo. La suplementación con calcio fue supervisada en terreno, para ello el suplemento de calcio estuvo en manos de monitoras de campo y cada día se visitó a las participantes para que, en presencia de ellas, se ingiriera el calcio. Con ello se aseguró la adherencia al tratamiento.

Se decidió realizar la suplementación con calcio durante 34 días (1 mes), entendiendo que a la fecha los estudios de suplementación a largo plazo con calcio han buscado cambios en marcadores del estatus de nutrición de hierro, más no en la biodisponibilidad de hierro. De igual manera, los estudios realizados sobre la absorción de hierro, lo han hecho a través de medir el efecto del calcio a corto plazo en matrices alimentarias o mediante la administración de suplementos. Esta mirada, de al menos un mes de suplementación con calcio, nos permitirá tener una idea clara del posible efecto a largo plazo de la suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro. Además, se decidió este período de 34 días entendiendo de que se estaría exponiendo al enterocito repetidamente a la presencia de calcio, y que se estaría cubriendo al menos 8 a 9 recambios del epitelio absortivo del intestino.

Por otro lado, se decidió realizar la suplementación con 600 mg de calcio elemental al día ya que, tal y como fue descrito por Hallberg y cols. (1991), la absorción de hierro se reduce en un 50 a 60% a dosis entre 300 y 600 mg de calcio (77), además de asegurar el 60% de las recomendaciones actuales de ingesta de calcio en las participantes (112, 117).

Además, se decidió trabajar con mujeres en edad fértil de 33 a 47 años porque es un grupo vulnerable de desarrollar anemia y/o deficiencia de hierro, como consecuencia de la menstruación y/o baja ingesta de hierro, por ende presentaría mayor absorción de hierro y permitiría un modelo apto para la evaluación del efecto del calcio sobre la biodisponibilidad de hierro. Además, el segmento de edad se seleccionó con el supuesto de que este grupo de mujeres ya tuvieron sus hijos, se han realizado un procedimiento quirúrgico de esterilización o están utilizando algún método anticonceptivo. Por último, hay que aclarar que no se descartaron aquellas mujeres de 45 años o menos que se consideraron como perimenopáusicas, ya que dicha condición no afectaría el estudio de absorción de hierro, más bien, la inestabilidad de su ciclo menstrual, en especial la persistencia de la menstruación durante un tiempo prolongado, favorecería el estudio de absorción de hierro con el supuesto de una mayor demanda de hierro por deficiencia.

A modo de aclaración, para el estudio de absorción de hierro post intervención las participantes continuaron recibiendo el suplemento de calcio, para asegurar que el efecto del posible cambio en la biodisponibilidad se dé mientras las participantes estén recibiendo el suplemento de calcio, por al menos 30 días. Para asegurar que el efecto agudo (es decir, a corto plazo) del calcio no afecte el estudio de absorción luego de al menos 1 mes de suplementación, se orientó a las participantes para ingerir el suplemento de calcio después de 4 horas de realizado el estudio de absorción, período de tiempo descrito por Gleerup y cols. (1993) en donde señalan que no se afecta la absorción de hierro por efecto del calcio después de 2 a 4 horas de diferencia entre ambos compuestos (146).

Para la administración del radioisótopo de hierro no hemo se utilizaron 50 ml de una solución acuosa con 3 mg de hierro como sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) marcado con 0.7  $\mu\text{Ci}$  del isótopo  $^{59}\text{FeCl}_3$ . Por otro lado, para la administración del radioisótopo de hierro hemo se emplearon 4 cápsulas con extracto de glóbulos rojos de cordero (CGR) desecados con 3 mg de hierro hemínico marcado con 3.0  $\mu\text{Ci}$  de  $^{55}\text{Fe}$  hemo, también de CGR. El procedimiento de marcación intrínseca de hierro hemo se describe más adelante.

Las participantes fueron asignadas en forma aleatoria a dos grupos (grupo calcio o grupo placebo).

La fase de intervención del estudio tuvo una duración de 62 días. A continuación se describen las actividades que se desarrollaron por día:

Tabla 5. Cronograma de actividades

Días	Actividades
Día 1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prueba de embarazo</li><li>• Extracción de 10 ml de sangre para determinación de estado nutricional de hierro</li><li>• Ingesta de 50 ml de solución acuosa con 3 mg de Fe como sulfato ferroso marcado con 0.7 <math>\mu\text{Ci}</math> <math>^{59}\text{Fe}</math></li></ul>
Día 2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ingesta de 4 cápsulas que contienen 3 mg de Fe como CGR marcado con 3.0 <math>\mu\text{Ci}</math> <math>^{55}\text{Fe}</math> hemo</li><li>• Realización de cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos resumido</li><li>• Evaluación antropométrica</li></ul>
Día 14	<ul style="list-style-type: none"><li>• Extracción de 20 ml sangre para medir radioactividad circulante (cpm/ml) de <math>^{59}\text{Fe}</math> y <math>^{55}\text{Fe}</math></li></ul>
Día 15	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inició período de suplementación supervisada con calcio o placebo</li></ul>
Día 48	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ingesta de 50 ml de solución acuosa con 3 mg de Fe como sulfato ferroso marcado con 0.7 <math>\mu\text{Ci}</math> <math>^{59}\text{Fe}</math></li></ul>
Día 49	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ingesta de 4 cápsulas que contienen 3 mg de Fe como CGR marcado con 3.0 <math>\mu\text{Ci}</math> <math>^{55}\text{Fe}</math> hemo</li></ul>
Día 61	<ul style="list-style-type: none"><li>• Finalizó período de suplementación con calcio o placebo</li></ul>
Día 62	<ul style="list-style-type: none"><li>• Extracción de 20 ml sangre para medir radioactividad circulante (cpm/ml) de <math>^{59}\text{Fe}</math> y <math>^{55}\text{Fe}</math></li></ul>

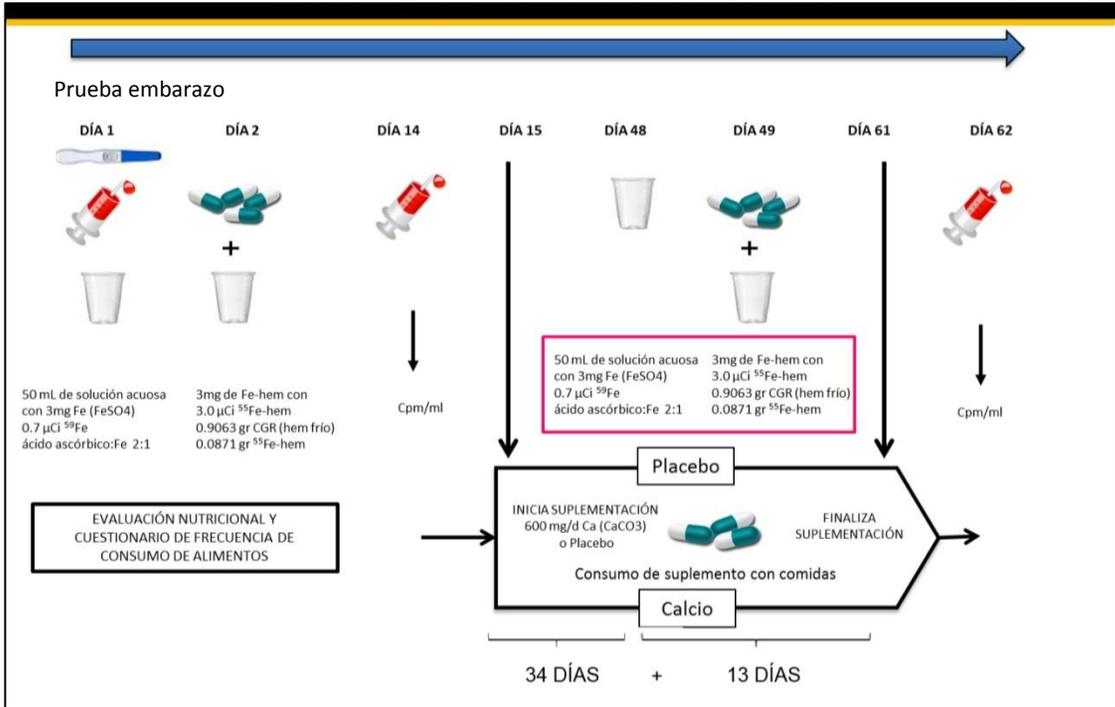


Figura 8. Diseño experimental

#### **g. Procedimientos y métodos**

Como trazadores de la absorción de hierro se utilizaron radioisótopos  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA). Las dosis de isótopos administradas estuvieron autorizadas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

Las ingestas de dosis de hierro no hemo y hierro hemo marcadas con radioisótopos se realizaron los días 1 y 2 y los días 48 y 49. Los días 14 y 62 se extrajeron 20 ml de sangre en cada oportunidad.

Con 10 ml de sangre del día 1 se determinaron los marcadores del estado nutricional de hierro de las voluntarias: Hemoglobina y VCM (Contador electrónico de células CELL-DYN 1700, ABBOTT Diagnostics, Abbott Park, IL), Fe sérico, TIBC y % de saturación de la transferrina (162), y protoporfirina libre eritrocitaria (Hematofluorímetro ZP-M206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ), ferritina sérica por ELISA (163).

El día 1 se realizó la medición de las variables antropométricas. Peso y talla fueron medidos con una balanza electrónica de precisión Hispana SECA con estadiómetro incluido y con una sensibilidad de 0.1 kg y 0.1 cm. Con los datos de peso y talla se obtuvo el índice de masa corporal (IMC), variable derivada, calculada como peso en kilogramo dividido por la altura en metros cuadrados ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Además, las variables antropométricas se obtuvieron con el fin de calcular su volemia (volumen total de sangre circulante) utilizando la tabla de Tulane (164). Para las mediciones antropométricas se tomaron tres lecturas y se promediaron los valores; las participantes vistieron ropa ligera, no utilizaron calzado y mantuvieron la posición de Frankfurt.

Consejería nutricional, por un nutricionista investigador, fue impartida para orientar sobre el consumo de hierro y calcio. Con esto se buscó asegurar una nutrición óptima para ambos minerales. Además, encuesta de frecuencia de consumo de alimentos resumida fue empleada para cuantificar el consumo diario de macronutrientes, hierro y calcio.

Marcación de hierro hemo (37): Para obtener hierro hemo marcado intrínsecamente se utilizó un cordero Suffolk de 6 meses de edad. El cordero se anestesió con inyección intramuscular

conteniendo Ketamina 10% (0.9 ml) y Xilacina 2% (0.3 ml). Una vez sedado el animal se le inyectó en la vena carótida 1.0 ml con 10 mCi de  $^{55}\text{Fe}$  citrato (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA).

El cordero marcado fue desangrado a las tres semanas, luego que el 80% del isótopo se incorporara a los glóbulos rojos. La sangre del cordero fue recibida en recipientes con anticoagulante de Wintrobe en una proporción de 1:9 (V/V) Wintrobe: sangre. A partir de la sangre se obtuvo hemoglobina sin estroma, hemolisando el concentrado de glóbulos rojos por la adición de agua desionizada. Luego se precipitaron las proteínas del estroma con sulfato de amonio al 20% seguido de ultracentrifugación a 20000 g por una hora. El sobrenadante se dializó contra agua sometiéndolo a liofilización a temperatura ambiente, en un liofilizador de bandeja (Eyela freezer dryer FD-1, Tokyo Rikakikai, Co Ltda, Tokio, Japón).

Un segundo cordero fue utilizado para la obtención de hierro hemo no marcado (hemo frío). El cordero fue desangrado para obtener sangre sin marca isotópica, la cual se utilizó para las dosis de hierro tipo hemo.

Estudio de biodisponibilidad de hierro: con 20 ml de sangre de los día 14 y 62 se midió la radiactividad circulante (cpm/ml) según la técnica doble isotópica descrita por Eakins y Brown (1966) (165). Para el cálculo de la radiactividad ingerida se contaron cuadruplicados de los compuestos marcados con  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA). La biodisponibilidad de hierro se calculó a partir de la sangre de las voluntarias, asumiendo que el 80% de hierro absorbido fue destinado a la síntesis de hemoglobina de los eritrocitos circulantes 14 días después de su ingestión.

La muestra de sangre y las ingestas de los compuestos marcados se efectuaron luego de 8 horas de ayuno nocturno, es decir, a estómago vacío evitando así el sesgo de posibles promotores/inhibidores de la dieta. Sólo después de 3 horas de administrados los compuestos estuvo permitida la ingesta de alimentos, a excepción de agua.

Para el estudio de absorción de hierro después de 34 días de suplementación con calcio, se permitió el consumo del suplemento de calcio sólo luego de 4 horas de administrados los compuestos marcados, esto con el fin de evitar una posible interacción aguda calcio – hierro al momento del estudio, consistente con lo reportado por Gleeup y cols. (1993) en referencia a la duración del efecto inhibitorio del calcio sobre la absorción de hierro en humanos (146).

La técnica doble radioisotópica de Eakins y Brown (1966) contempla el principio de que los radioisótopos emiten radiaciones electromagnéticas fácilmente cuantificables, característica importante para su identificación inequívoca. En el caso de hierro, su incorporación en la hemoglobina, en una proporción del 80%, permite cuantificar la cantidad de radiación emitida por el radioisótopo en este compartimiento específico. De esta manera, determinando la presencia de hierro en la hemoglobina y adicionando un 20% no ingresado en la misma, se determinó la biodisponibilidad del mineral.

Para la determinación de la radioactividad circulante, cada una de las muestras, sangre o compuestos, fueron dirigidas en un medio ácido con el fin de que el contenido total de hierro precipitara. Luego se determinó la radioactividad circulante utilizando 2 muestras blanco, cuadruplicados de los estándares de  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  y sextuplicados de las muestras de cada participante.

Las fases para desarrollar la técnica doble radioisotópica descrita por Eakins y Brown fueron las siguientes:

- 1) Fase de preparación de estándares, blanco y muestras: para lo cual se utilizaron cuadruplicados de las soluciones de hierro hemo y no hemo empleadas en los estudios de absorción, cuatro para el  $^{55}\text{Fe}$  y cuatro para  $^{59}\text{Fe}$ ; la preparación del componente de hierro blanco consistió en una muestra de sangre (5 ml) sin marcar; y las muestras como tal, marcadas, fueron las muestras de sangre (8 ml) de las participantes obtenidas en cada protocolo.
- 2) Fase de precipitado: separación inicial del suero de la fracción eritrocitos de las muestras.
- 3) Segunda fase de precipitación: extracción de hierro de los eritrocitos por precipitación.

4) Fase de conteo: A cada tubo se agregaron 4 ml de Ultrafluor (Complete liquid scintillation counting solution for aqueous radioactive samples; Nacional Diagnostics, USA) y se agitó en vortex. Luego, el contenido de los tubos fue trasvasiado a viales de conteo, previamente llenados a tres cuartos de su capacidad con CAB-O-SIL (Thixotropic gelling powder, scintillation grade; Nacional Diagnostics, USA). Los tubos fueron lavados posteriormente 2 veces con 4 ml de Ultrafluor y agitados en vortex para luego ser trasvasiados al vial. Finalmente, cada vial fue agitado en vortex durante 30 segundos hasta homogenizar el gel y se guardó en cajas en un lugar oscuro durante 48 a 36 horas. Cumplido este tiempo, las muestras estuvieron aptas para su lectura en el contador de centelleo líquido.

Las muestras fueron contadas el tiempo necesario hasta obtener un error menor al 3% en un contador de centelleo líquido (Packard 1600TR Tri-Carb Scintillation Counter System, Meriden CT).

La fórmula a utilizar para obtener la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo es la siguiente:

**Biodisponibilidad de Fe (%) =**

$$\frac{\frac{\text{cpm}}{\text{ml de sangre}} \times \text{Volemia}}{\frac{\text{cpm}}{\text{ml solución ingerida}} \times \text{Peso de solución ingerida}} \times 100 / 0.8^a$$

<sup>a</sup> Corrección de Bothwell (80% de hierro ingerido se destina a eritropoyesis)

Para los cálculos de biodisponibilidad de los días 48 y 49 se restó la radiactividad contadas los días 1 y 2, para evitar sobre exposición de ésta.

#### **h. Consideraciones éticas**

Este proyecto se encuentra aprobado por el Comité de Ética para Estudios en Seres Humanos y por el Comité de Bioética para Estudios en Animales del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile; las dosis de radioisótopos fueron aprobadas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear. A cada una de las participantes en este estudio se les informó de los beneficios, posibles riesgos y confiabilidad del estudio a través de un consentimiento informado.

#### **i. Plan de análisis estadístico**

El análisis de los datos se hizo por protocolo, es decir que se incluyeron sólo los datos de las participantes que cumplieron con todo el estudio.

Debido a que los datos de biodisponibilidad y razón de biodisponibilidad de hierro, hemo y no hemo; ferritina sérica; zinc protoporfirina e ingesta de calcio seguían una distribución asimétrica, fueron transformados a su logaritmo natural antes de los análisis estadísticos, y los resultados fueron reconvertidos a los antilogaritmos. Los datos logarítmicos siguieron una distribución normal verificada por la prueba Shapiro Wilks.

Los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (media  $\pm$  DE) en las variables que seguían una distribución normal. En el caso de las variables que fueron transformadas a su logaritmo natural, los datos se presentan como promedio geométrico (rango de  $\pm$  1DE). En el caso del delta de biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo, los datos son presentados como promedio (error estándar de la media-EEM).

Para medir el efecto de la suplementación con calcio, las variables de disponibilidad de hierro fueron sometidas a la prueba ANOVA de dos vías para determinar efecto tratamiento (calcio versus placebo), efecto tiempo (inicial versus final), y efecto interacción (tratamiento versus tiempo). Para corregir posibles diferencias entre los valores iniciales de la biodisponibilidad de hierro entre los grupos calcio y placebo, se utilizó análisis de covarianza (ANCOVA) para medir diferencias en el delta de la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo entre el grupo con calcio y placebo, teniendo como factor fijo el tratamiento y la biodisponibilidad basal (inicial) como covariable.

Los marcadores que miden el estado nutricional de hierro; la ingesta diaria de energía, macronutrientes, hierro y calcio; y las variables antropométricas fueron comparadas con la prueba t de Student para observaciones independientes. El nivel de significancia estadística, establecido a priori para el cálculo de la muestra, fue un valor p asociado a las pruebas  $<0.05$ .

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa computacional de estadística y análisis de datos STATA 11.0 (Stata Corp LP, College Station, Texas).

#### **IV. RESULTADOS**

## Resultados

26 sujetos terminaron el protocolo de investigación, dos mujeres no finalizaron ya que se retiraron voluntariamente.

La tabla 6 resume las características de los sujetos. La edad promedio en el grupo con calcio y placebo fue  $39.4 \pm 5.0$  y  $38.7 \pm 4.1$  años (NS); el IMC fue  $25.5 \pm 2.5$  y  $26.8 \pm 3.4$  Kg/m<sup>2</sup> (NS); el promedio geométrico (rango  $\pm 1$ DE) de ingesta de calcio fue 409.9 (277.2-606.1) y 342.2 mg (208.8-560.9) (NS), el promedio de ingesta de hierro fue  $12.8 \pm 3.7$  y  $13.3 \pm 3.3$  mg (NS), respectivamente. No se observó diferencia significativa en la ingesta basal de energía, proteínas, lípidos y carbohidratos.

Tabla 6. Características de los sujetos

Variables	Placebo	Calcio	P <sup>a</sup>
Edad (años)	$38.7 \pm 4.1$	$39.4 \pm 5.0$	0.7023
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	$26.8 \pm 3.4$	$25.5 \pm 2.5$	0.2698
Ingesta de energía (Kcal)	$2257.1 \pm 463.8$	$2039.9 \pm 481.8$	0.2532
Ingesta de proteínas (g)	$70.1 \pm 21.2$	$67.6 \pm 24.6$	0.7822
Ingesta de grasas (g)	$107.6 \pm 31.9$	$100.7 \pm 26.5$	0.5500
Ingesta de carbohidratos (g)	$251.6 \pm 53.8$	$217.9 \pm 49.9$	0.1103
Ingesta de calcio (mg) <sup>b</sup>	342.2 (208.8 - 560.9)	409.9 (277.2 - 606.1)	0.3120
Ingesta de hierro (mg)	$13.3 \pm 3.3$	$12.8 \pm 3.7$	0.7538

Valores presentados como promedio  $\pm$ DE

<sup>a</sup> Valor p de la prueba t de Student para observaciones independientes

<sup>b</sup> Promedio geométrico (rango de  $\pm 1$  DE)

La tabla 7 resume los marcadores de estado nutricional de hierro por grupo, calcio y placebo. No se encontró diferencia significativa entre los biomarcadores de nutrición de hierro. Ambos grupos presentaron marcadores de estado nutricional de hierro similares.

Tabla 7. Marcadores de estado nutricional de hierro

	Placebo	Calcio	P <sup>a</sup>
Hb (g/L)	142 ± 8	141 ± 11	0.7241
VCM (fL)	87 ± 4	86 ± 5	0.6868
Zpp (µg/dL GR) <sup>b</sup>	70 (52-95)	68 (55-83)	0.7312
Fe (µg/dL)	63 ± 18	71 ± 30	0.3923
TIBC (µg/dL)	336 ± 42	333 ± 60	0.8939
Saturación de transferrina (%)	19.1 ± 6.2	22.5 ± 11.3	0.3499
FS (µg/L) <sup>b</sup>	17.8 (7.8-40.6)	14.2 (4.5-44.5)	0.5642

Valores presentados como promedio ±DE

<sup>a</sup> Valor p de la prueba t de Student para observaciones independientes

<sup>b</sup> Promedio geométrico (rango de ±1 DE)

Hb: hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio eritrocitario; Zpp: Zinc protoporfirina; Fe: hierro sérico; TIBC: capacidad total de fijación de hierro; FS: ferritina sérica.

### **Análisis de la biodisponibilidad de hierro**

La tabla 8 resume la biodisponibilidad individual de hierro hemo, expresada como % de absorción, en las participantes. Análisis de varianza de dos vías demostró la no diferencia entre la biodisponibilidad de hierro hemo por efecto tratamiento, tiempo e interacción. El promedio geométrico (rango de ± 1DE) de la biodisponibilidad de hierro hemo inicial y final en el grupo placebo fue 21.8% (13.0 a 36.6) y 25.1% (16.5 a 38.3) y en el grupo calcio fue 16.5% (8.3 a 32.8) y 26.0% (15.5 a 43.6) [ANOVA de dos vías: Tratamiento F= 0.68 (p=0.4145); tiempo F=3.94 (p=0.0530); interacción F=1.10 (p=0.2991)].

La tabla 9 resume la biodisponibilidad individual de hierro no hemo. Análisis de varianza de dos vías demostró la no diferencia entre la biodisponibilidad de hierro no hemo por efecto tratamiento,

tiempo e interacción. El promedio geométrico (rango de  $\pm 1$ DE) de la biodisponibilidad de hierro no hemo inicial y final en el grupo placebo fue 44.6% (24.9 a 79.7) y 39.3% (24.3 a 63.4) y en el grupo calcio fue 39.5% (19.9 a 78.7) a 34.1% (19.1 a 60.6) [ANOVA de dos vías: Tratamiento F= 0.65 (p=0.4250); tiempo F=0.72 (p=0.4001); interacción F=0.00 (p=0.9467)].

De igual manera, no se observó diferencia en la razón de biodisponibilidad de hierro hemo entre los grupos placebo 1.15 (0.74 a 1.79) y calcio 1.58 (1.01 a 2.47) (ANCOVA F=0.04; p=0.8524) (tabla 8); tampoco se observó diferencia en la razón de biodisponibilidad de hierro no hemo entre los grupos placebo 0.88 (0.63 a 1.22) y calcio 0.86 (0.53 a 1.40) (ANCOVA F=0.05; p=0.8169) (tabla 9), luego de ajustar por la biodisponibilidad inicial respectiva.

La figura 9 muestra el delta de la biodisponibilidad de hierro hemo entre los grupos (calcio y placebo). En un modelo de análisis de covarianza no se observó diferencia en el delta de la biodisponibilidad de hierro hemo entre el grupo con calcio y placebo luego de ajustar por la biodisponibilidad de hierro hemo basal como covariable, el promedio (EEM) del delta de la biodisponibilidad de hierro hemo para el grupo con calcio fue 9.5% (2.5) y para el grupo placebo fue 2.9% (3.0) (ANCOVA; NS).

La figura 10 muestra el delta de la biodisponibilidad de hierro no hemo entre los grupos (calcio y placebo). En un modelo de análisis de covarianza no se observó diferencia en el delta de la biodisponibilidad de hierro no hemo entre el grupo con calcio y placebo luego de ajustar por la biodisponibilidad de hierro no hemo basal como covariable, el promedio (EEM) del delta de la biodisponibilidad de hierro no hemo para el grupo con calcio fue -8.9% (5.5) y para el grupo placebo fue -7.7% (4.6) (ANCOVA; NS).

Tabla 8. Biodisponibilidad\* individual de hierro hemo

<b>Sujetos Placebo</b> ***	Bio Fe Hem inicial	Bio Fe Hem final	Delta **	Razón	<b>Sujetos Calcio</b> ***	Bio Fe Hem inicial	Bio Fe Hem final	Delta **	Razón
VTSG	18.3	35	16.7	1.91	PALF	12.8	13.0	1.2	1.02
CACB	17.4	19.5	2.1	1.12	MEMK	3.6	18.2	14.6	5.06
SGCR	20.2	38.6	18.4	1.91	FAD	19.2	31.0	11.8	1.61
VCBS	16.6	33.9	17.3	2.04	JTCM	12.7	15.8	3.1	1.24
MCBD	48.5	47.1	-1.4	0.97	REMA	31.1	43.5	12.4	1.4
NERS	26.7	38.0	11.3	1.42	BCJP	44.7	54.6	9.9	1.22
JAVB	20.4	23.1	2.7	1.13	AVGL	19.6	55.2	35.6	2.82
PCPC	31.3	26.6	-4.7	0.85	CLVR	24.1	28.2	4.1	1.17
EVGD	33.2	15.7	-17.5	0.47	PFRA	7.3	14.6	7.3	2.00
PATP	5.5	10.4	4.9	1.89	ACSG	10.1	15.4	5.3	1.52
VCFF	31.9	24.2	-7.7	0.76	LJML	16.6	27.2	10.6	1.64
JJPC	20.2	20.1	-0.1	1.00	RCPJ	18.4	21.5	3.1	1.17
GCRP	24.6	20.5	-4.1	0.83	LEV	38.9	44.3	5.4	1.14
Promedio Geométrico	<b>21.8</b>	<b>25.1</b>	<b>2.9</b>	<b>1.15</b>		<b>16.5</b>	<b>26.0</b>	<b>9.5</b>	<b>1.58</b>
- 1DE	<b>13.0</b>	<b>16.5</b>	<b>3.0</b>	<b>0.74</b>		<b>8.3</b>	<b>15.5</b>	<b>2.5</b>	<b>1.01</b>
+ 1DE	<b>36.6</b>	<b>38.3</b>		<b>1.79</b>		<b>32.8</b>	<b>43.6</b>		<b>2.47</b>

\* Expresado como porcentaje (%) de absorción

\*\* Valores del delta son presentados como promedio (EEM)

\*\*\* Las abreviaturas corresponden a las iniciales de los nombres y apellidos de cada sujeto para el grupo placebo y calcio, respectivamente.

ANOVA de dos vías: Tratamiento F= 0.68 (p=0.4145); tiempo F=3.94 (p=0.0530); interacción F=1.10 (p=0.2991)

ANCOVA para razón de biodisponibilidad de hierro hemo por tratamiento F=0.04 (p=0.8524); ln\_biohemo\_inicial F=15.20 (p=0.0008); interacción F=0.20 (p=0.6617)

Bio Fe Hem = Biodisponibilidad de Fe hemo.

Tabla 9. Biodisponibilidad\* individual de hierro no hemo

<b>Sujetos Placebo</b> ***	Bio Sulf Fe inicial	Bio Sulf Fe final	Delta **	Razón	<b>Sujetos Calcio</b> ***	Bio Sulf Fe inicial	Bio Sulf Fe final	Delta **	Razón
VTSG	42.2	25.7	-16.5	0.61	PALF	37.3	17.5	-19.8	0.47
CACB	26.8	35.9	9.1	1.34	MEMK	15.6	14.7	-0.9	0.94
SGCR	84.1	62.1	-22.0	0.74	FAD	58.9	22.7	-36.2	0.39
VCBS	57.6	67.2	9.6	1.17	JTCM	13.6	17.2	3.6	1.26
MCBD	33.1	29.0	-4.1	0.88	REMA	45.1	24.2	-20.9	0.54
NERS	59.9	61.3	1.4	1.02	BCJP	96.1	81.5	-14.6	0.85
JAVB	32.0	35.0	3.0	1.09	AVGL	34.8	60.4	25.6	1.74
PCPC	91.5	85.0	-6.5	0.93	CLVR	35.3	36.3	1.0	1.03
EVGD	60.9	39.6	-21.3	0.65	PFRA	20.5	34.4	13.9	1.68
PATP	17.0	18.3	1.3	1.08	ACSG	19.7	26.6	6.9	1.35
VCFF	59.6	52.5	-7.1	0.88	LJML	98.3	68.8	-29.5	0.70
JJPC	16.5	19.5	3.0	1.18	RCPJ	65.3	61.6	-3.7	0.94
GCRP	85.1	34.9	-50.2	0.41	LEV	90.0	49.5	-40.5	0.55
<b>Promedio Geométrico</b>	<b>44.6</b>	<b>39.3</b>	<b>-7.7</b>	<b>0.88</b>		<b>39.5</b>	<b>34.1</b>	<b>-8.9</b>	<b>0.86</b>
<b>- 1DE</b>	<b>24.9</b>	<b>24.3</b>	<b>4.6</b>	<b>0.63</b>		<b>19.9</b>	<b>19.1</b>	<b>5.5</b>	<b>0.53</b>
<b>+ 1DE</b>	<b>79.7</b>	<b>63.4</b>		<b>1.22</b>		<b>78.7</b>	<b>60.6</b>		<b>1.40</b>

\* Expresado como porcentaje (%) de absorción

\*\* Valores del delta son presentados como promedio (EEM)

\*\*\* Las abreviaturas corresponden a las iniciales de los nombres y apellidos de cada sujeto para el grupo placebo y calcio, respectivamente.

ANOVA de dos vías: Tratamiento F= 0.65 (p=0.4250); tiempo F=0.72 (p=0.4001); interacción F=0.00 (p=0.9467)

ANCOVA para razón de biodisponibilidad de hierro no hemo por tratamiento F=0.05 (p=0.8169); ln\_bioSulfatoFe\_inicial F=9.33 (p=0.0058); interacción F=0.10 (p=0.7579).

Bio Sulf Fe = Biodisponibilidad de sulfato ferroso

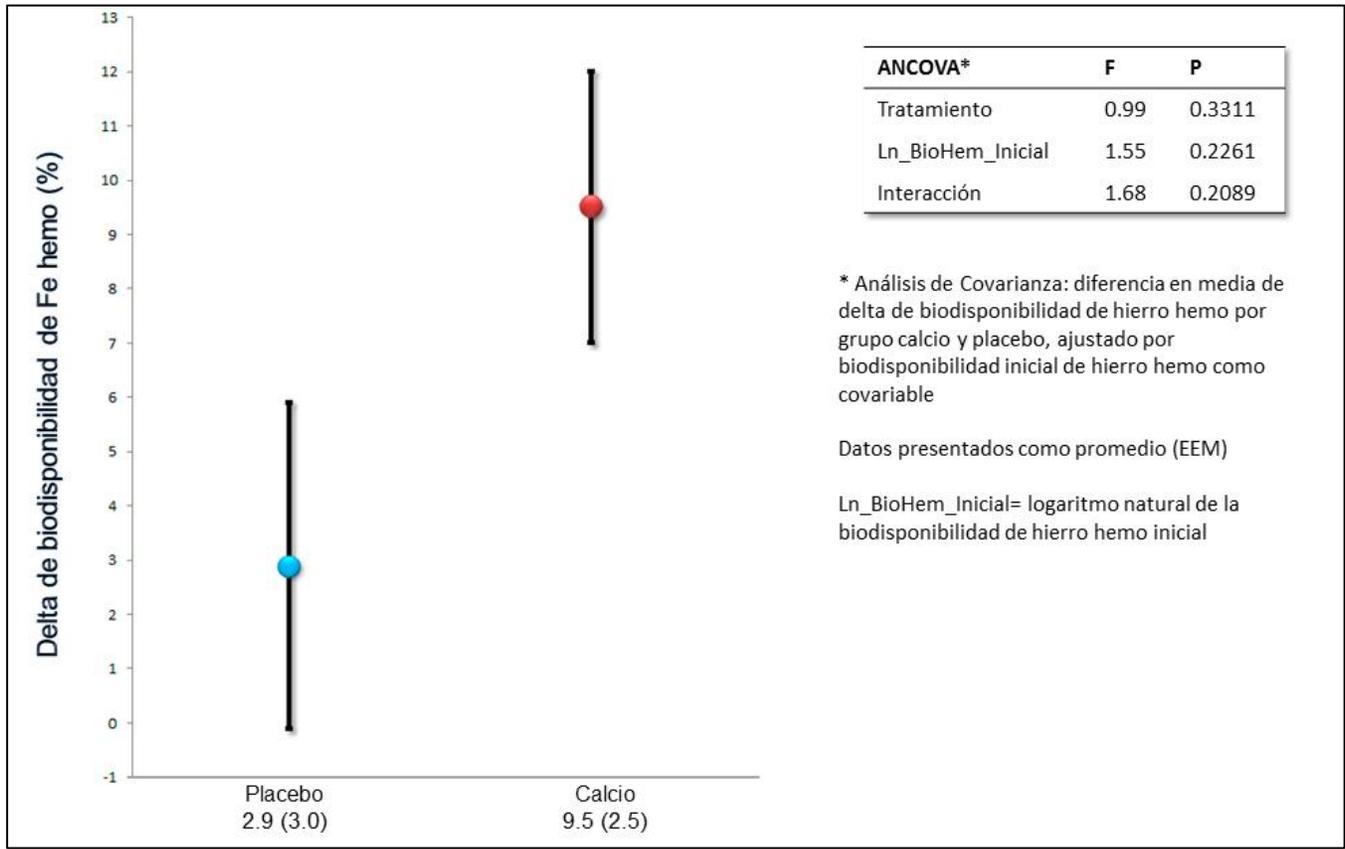


Figura 9. Efecto de la suplementación con 600mg Ca sobre el delta de la biodisponibilidad de hierro hemo

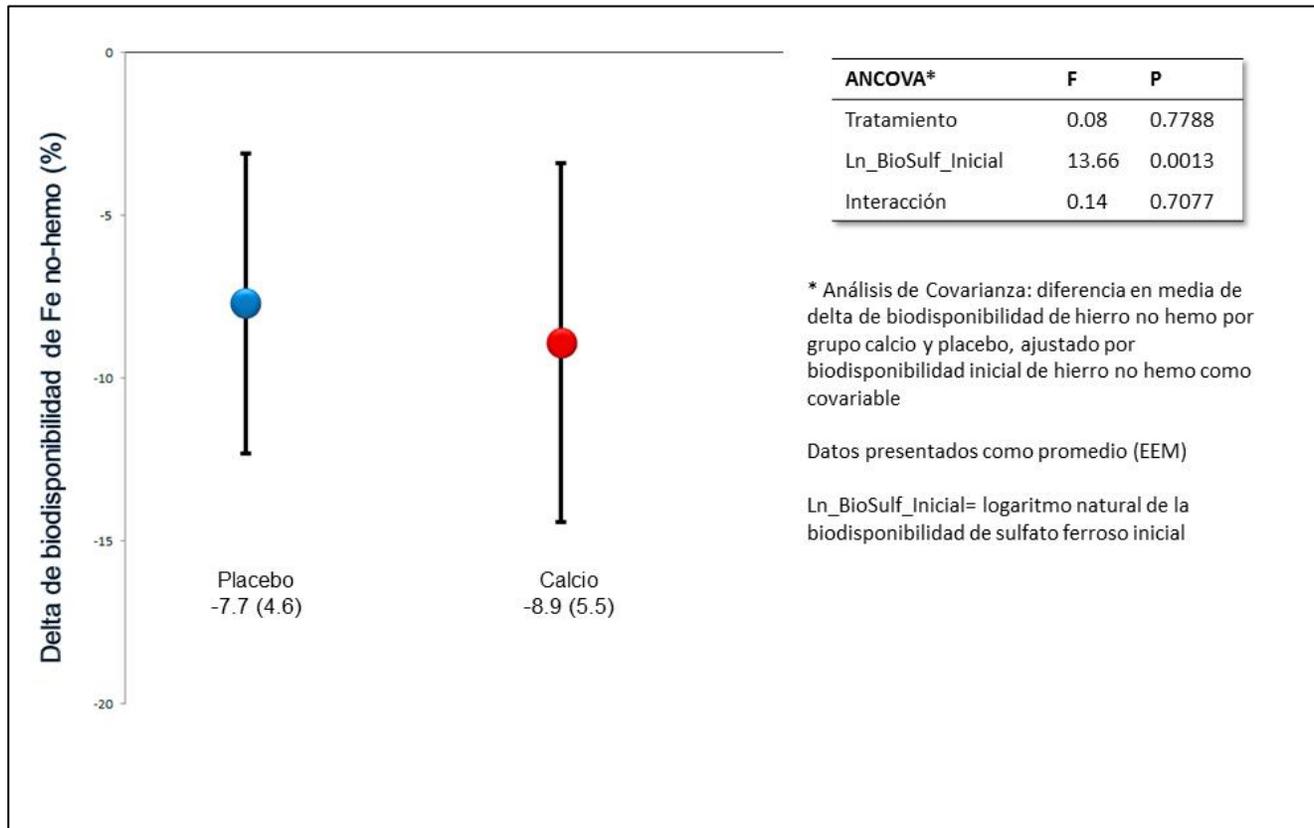


Figura 10. Efecto de la suplementación con 600mg Ca sobre el delta de la biodisponibilidad de hierro no hemo

## Discusión

Los resultados indican que la suplementación con calcio durante 34 días (1mes) no disminuyó la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo en mujeres de edad fértil.

Varios estudios usando isótopos, ya sean estables o radioactivos, para marcar hierro en comidas de prueba o matrices alimentarias, han mostrado que el calcio ejerce un efecto inhibitorio agudo sobre la absorción de ambos tipos de hierro, hemo y no hemo, y que el efecto ocurre indistintamente sea el tipo de sal de calcio utilizada (72-81). Así mismo, otros estudios no han encontrado efecto de la administración de calcio sobre la absorción y/o estado nutricional de hierro (147-153).

Sin embargo, a la fecha, ningún estudio ha descrito el efecto de la suplementación a largo plazo con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro, tanto de hierro hemo como no hemo. Por lo tanto, este es el primer estudio que determina el efecto de 34 días de suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro.

A pesar de que el calcio podría disminuir la absorción de hierro en matrices alimentarias o comidas de pruebas, como un efecto agudo, nuestros datos indican que la suplementación diaria con calcio durante 34 días no afecta negativamente la biodisponibilidad de hierro. Una posible explicación ante este escenario es que el organismo es capaz de regularla respuesta de absorción de hierro a exposiciones prolongadas de calcio, es decir, una respuesta adaptativa del enterocito ante la presencia diaria de calcio (147). Planteamos que dicha disminución aguda en la absorción de hierro podría ser un factor en sí que es capaz de modular la respuesta posterior en el enterocito en desarrollo en la cripta de la vellosidad intestinal, favoreciendo la eficiente absorción de hierro posterior. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados aún no están claros.

Nuestros datos nos permiten pensar en que es posible que el efecto inhibitorio agudo de calcio en la absorción de hierro disminuya con el tiempo en la presencia de los suplementos de calcio diariamente.

En un intento por realizar una comparación de nuestros resultados con la evidencia disponible, encontramos que el efecto a largo plazo de la suplementación con calcio sobre cambios en marcadores del estado nutricional de hierro ha sido descrito por Minihane y Fairweather-Tait (1998); Kalkwarf y Harrast (1998); y Mølgaard y cols. (2005), quienes administraron 1200, 500 y 500 mg/d de calcio elemental ( $\text{CaCO}_3$ ) durante 6, 6 y 12 meses, respectivamente. Los resultados fueron contundentes en los tres estudios, el calcio no afectó los marcadores de estado nutricional de hierro (147, 155, 156). En este sentido, nuestros hallazgos apuntan no solo a la ausencia de un efecto negativo de la suplementación con calcio sobre los biomarcadores de estado nutricional de hierro, sino sobre la propia absorción de hierro.

Cook y cols. (1991), en un estudio que buscaba ver el efecto de diferentes sales de calcio sobre la absorción de hierro no hemo, mostraron que 600 mg de calcio elemental, como citrato o fosfato, disminuyen la absorción de hierro no hemo aproximadamente 50% cuando es administrado a estómago vacío, pero este efecto no se observó cuando se administró la misma cantidad de calcio como carbonato (73). Estos resultados son consistentes con nuestros hallazgos de que 34 días de suplementación con 600 mg de calcio elemental como  $\text{CaCO}_3$  no disminuyen la biodisponibilidad, medida a estómago vacío, de hierro hemo y no hemo.

De igual forma, nuestros datos son consistentes con los de Gleerup y cols. (1993), quienes reportaron que no hay efecto de calcio sobre la absorción de hierro no hemo cuando ambos compuestos son consumidos por al menos 2 horas de diferencia entre ellos (146). De manera intencional, nuestro estudio limitó el posible efecto agudo de calcio sobre la absorción de hierro, puesto que nuestro objetivo fue determinar el efecto de la suplementación prolongada de calcio más no el posible efecto agudo inhibitorio del calcio sobre la absorción de hierro.

En el presente estudio, la estimación de ingesta dietaria de micronutrientes permitió conocer que las participantes del grupo con calcio cubrieron sus requerimientos diarios de este mineral, ya que la estimación dietaria indicó un aporte de  $\approx 400$  mg de calcio sumado a los 600 mg de calcio suministrados por la suplementación, recibiendo en total  $\approx 1000$  mg de calcio al día, acorde con las recomendaciones propuestas por el Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (166).

Una posible limitación del presente estudio es probablemente la duración de la suplementación con calcio. Los estudios que han descrito la ausencia de efecto negativo de la suplementación con calcio sobre marcadores de estado nutricional de hierro han sido realizados durante 6 y 12 meses. En el presente estudio consideramos que una duración de al menos un mes sería suficiente para observar si existe algún efecto de la suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro. Es por ello que no consideramos describir cambios en marcadores de estado nutricional de hierro, siendo que los estudios anteriores no los encontraron a 6 y 12 meses de suplementación con calcio.

En cuanto a las fortalezas del presente estudio, destacamos que la adherencia a la suplementación con calcio fue de 100%, debido a que la ingesta del suplemento fue supervisada diariamente en terreno. Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten tener una clara mirada del posible efecto a largo plazo de la suplementación con calcio sobre la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo. Sin embargo, los posibles mecanismos moleculares que se estarían llevando a cabo a nivel intestinal ante la exposición repetida de calcio sigue siendo tema de estudio.

Nuestros resultados sugieren que es posible suplementar con hierro (hemo y no hemo) y calcio a mujeres en edad fértil, un grupo vulnerable de desarrollar deficiencia de hierro, y que dicha suplementación es más conveniente por separado, entendiéndose que debe existir al menos dos horas de diferencia entre las ingestas de cada suplemento (hierro y calcio). Este estudio aporta evidencias para la nutrición básica y a su vez tiene implicancias para la salud pública. No obstante, es necesario realizar estudios adicionales para confirmar esta proposición.

## **Conclusión**

Un período de 34 días de suplementación supervisada con 600 mg de calcio elemental al día como CaCO<sub>3</sub> no disminuyó la biodisponibilidad de hierro hemo y no hemo en mujeres en edad fértil. Por tanto, se rechazan las hipótesis propuestas en este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3579.
2. Haidar AH. Prospective chemistry teachers' conceptions of the conservation of matter and related concepts. *Journal of Research in Science Teaching*. 1997;34(2):181-97.
3. Ramakrishnan U, Semba RD. Iron deficiency and anemia. *Nutrition and Health in Developing Countries*. 2 ed; 2008.
4. Landfried DA, Vuletic DA, Pond MP, Lecomte JT. Structural and thermodynamic consequences of heme binding for monomeric apoglobins and other apoproteins. *Gene*. 2007 Aug 15;398(1-2):12-28.
5. Aisen P, Wessling-Resnick M, Leibold EA. Iron metabolism. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1999;3(2):200-6.
6. Crichton RR. Iron. *Biochemical, Physiological & Molecular Aspects of Human Nutrition*. Second ed: Stipanuk MH. Saunder-Elsevier; 2006.
7. FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 13. Iron. *Human Vitamin and Mineral Requirements*. Bangkok, Thailand; 2002.
8. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):1697-702.
9. Hardison R. The Evolution of Hemoglobin Studies of a very ancient protein suggest that changes in gene regulation are an important part of the evolutionary story. *American Scientist*. 1999;87(2):126.
10. Kaplan J, O'Halloran TV. Iron Metabolism in Eukaryotes--Mars and Venus at It Again. *Science*. 1996;271(5255):1510.
11. Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins. *Annual review of biochemistry*. 1980;49(1):357-93.
12. Bello A. Consecuencias funcionales de la deficiencia de hierro. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2004;61(1):1-3.
13. Bothwell TH, Finch CA. *Iron metabolism*. Little, Brown; 1962.
14. Crichton RR. Solution chemistry of iron in biological media. R R Crichton, *Inorganic biochemistry of iron metabolism* Ellis Horwood Limited, West Sussex, England. 1991:13-28.
15. Crichton RR. *Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences*. Wiley; 2009.
16. Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton JWL, Tattersall MHN. Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):517-26.
17. Oexle H, Gnaiger E, Weiss G. Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1999;1413(3):99-107.
18. Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature reviews genetics*. 2001;2(5):342-52.

19. McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol.* 1998 Jan;35(1):5-12.
20. Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine.* 1997;23(5):783-92.
21. Rice-Evans C, Baysal E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. *Biochemical Journal.* 1987;244(1):191.
22. Touati D. Iron and Oxidative Stress in Bacteria\* 1. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2000;373(1):1-6.
23. Beard JL, Dawson H, Pinero DJ. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr Rev.* 1996 Oct;54(10):295-317.
24. Brown EB, Jr., Dubach R, Moore CV. Studies in iron transportation and metabolism. XI. Critical analysis of mucosal block by large doses of inorganic iron in human subjects. *J Lab Clin Med.* 1958 Sep;52(3):335-55.
25. Flanagan PR. Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1989;361:21-30.
26. Finch CA, Huebers H. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med.* 1982 Jun 24;306(25):1520-8.
27. Green R, Charlton R, Seftel H, Bothwell T, Mayet F, Adams B, y cols. Body iron excretion in man: a collaborative study. *Am J Med.* 1968 Sep;45(3):336-53.
28. Hallberg L, Hogdahl AM, Nilsson L, Rybo G. Menstrual blood loss--a population study. Variation at different ages and attempts to define normality. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1966;45(3):320-51.
29. Hytten FE, Cheyne GA, Klopper AI. Iron Loss at Menstruation. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1964 Apr;71:255-9.
30. Wienk KJ, Marx JJ, Beynen AC. The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr.* 1999 Apr;38(2):51-75.
31. Hallberg L. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr.* 1981;1:123-47.
32. Hallberg L, Hulthen L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr.* 2000 May;71(5):1147-60.
33. Bjorn-Rasmussen E, Hallberg L, Isaksson B, Arvidsson B. Food iron absorption in man. Applications of the two-pool extrinsic tag method to measure heme and nonheme iron absorption from the whole diet. *J Clin Invest.* 1974 Jan;53(1):247-55.
34. Theil EC, Chen H, Miranda C, Janser H, Walter T, Elsenhans B, y cols. Intestinal absorption of iron from ferritin is different than small non-heme iron complexes and heme. *Am J Clin Nutr "acceptada".* 2011.
35. Monsen ER, Hallberg L, Layrisse M, Hegsted DM, Cook JD, Mertz W, y cols. Estimation of available dietary iron. *Am J Clin Nutr.* 1978 Jan;31(1):134-41.
36. Hallberg L, Solvell L. Absorption of hemoglobin iron in man. *Acta Med Scand.* 1967 Mar;181(3):335-54.
37. Turnbull A, Cleton F, Finch CA. Iron absorption. IV. The absorption of hemoglobin iron. *J Clin Invest.* 1962 Oct;41:1897-907.

38. Hallberg L, Bjorn-Rasmussen E, Howard L, Rossander L. Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scand J Gastroenterol.* 1979;14(7):769-79.
39. Hallberg L, Hulten L, Gramatkovski E. Iron absorption from the whole diet in men: how effective is the regulation of iron absorption? *Am J Clin Nutr.* 1997 Aug;66(2):347-56.
40. Zimmermann MB, Biebinger R, Egli I, Zeder C, Hurrell RF. Iron deficiency up-regulates iron absorption from ferrous sulphate but not ferric pyrophosphate and consequently food fortification with ferrous sulphate has relatively greater efficacy in iron-deficient individuals. *Br J Nutr.* 2010 Dec 17:1-6.
41. Conrad ME, Benjamin BI, Williams HL, Foy AL. Human absorption of hemoglobin-iron. *Gastroenterology.* 1967 Jul;53(1):5-10.
42. Wheby MS. Site of iron absorption in man. *Scand J Haematol.* 1970;7(1):56-62.
43. Andrews NC. Understanding heme transport. *N Engl J Med.* 2005 Dec 8;353(23):2508-9.
44. Arredondo M, Kloosterman J, Nunez S, Segovia F, Candia V, Flores S, y cols. Heme iron uptake by Caco-2 cells is a saturable, temperature sensitive and modulated by extracellular pH and potassium. *Biol Trace Elem Res.* 2008 Nov;125(2):109-19.
45. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, y cols. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell.* 2006 Dec 1;127(5):917-28.
46. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, y cols. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 2005 Sep 9;122(5):789-801.
47. Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, Phillips JD, Sabo KM, Sabath DE, y cols. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell.* 2004 Sep 17;118(6):757-66.
48. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, y cols. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 2001 Mar 2;291(5509):1755-9.
49. Fleming MD, Trenor CC, 3rd, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF, y cols. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):383-6.
50. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, y cols. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997 Jul 31;388(6641):482-8.
51. Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet.* 2007 Aug 11;370(9586):511-20.
52. Uzel C, Conrad ME. Absorption of heme iron. *Semin Hematol.* 1998 Jan;35(1):27-34.
53. González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. Barcelona, España; 2010.
54. Devlin T. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínica. New Jersey; 2004.
55. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, y cols. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 2000 Feb 17;403(6771):776-81.

56. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, y cols. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):195-9.
57. Walczyk T, von Blanckenburg F. Deciphering the iron isotope message of the human body. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2005;242(2-3):117-34.
58. Conrad ME, Umbreit JN. Iron absorption and transport-an update. *Am J Hematol.* 2000 Aug;64(4):287-98.
59. Ganz T. Heparin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005 Jun;18(2):171-82.
60. Knutson MD. Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu Rev Nutr.* 2010 Aug 21;30:149-71.
61. Roe MA, Collings R, Dainty JR, Swinkels DW, Fairweather-Tait SJ. Plasma hepcidin concentrations significantly predict inter individual variation in iron absorption in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2009 Apr;89(4):1088-91.
62. Roy CN, Andrews NC. Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr Opin Hematol.* 2005 Mar;12(2):107-11.
63. Ruivard M, Laine F, Ganz T, Olbina G, Westerman M, Nemeth E, y cols. Iron absorption in dysmetabolic iron overload syndrome is decreased and correlates with increased plasma hepcidin. *J Hepatol.* 2009 Jun;50(6):1219-25.
64. Young MF, Glahn RP, Ariza-Nieto M, Inglis J, Olbina G, Westerman M, y cols. Serum hepcidin is significantly associated with iron absorption from food and supplemental sources in healthy young women. *Am J Clin Nutr.* 2009 Feb;89(2):533-8.
65. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, y cols. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4596-601.
66. McClung JP, Karl JP. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. *Nutr Rev.* 2009 Feb;67(2):100-4.
67. Zimmermann MB, Zeder C, Muthayya S, Winichagoon P, Chaouki N, Aeberli I, y cols. Adiposity in women and children from transition countries predicts decreased iron absorption, iron deficiency and a reduced response to iron fortification. *Int J Obes (Lond).* 2008 Jul;32(7):1098-104.
68. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, y cols. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004 Dec 17;306(5704):2090-3.
69. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology.* 2010 Aug;139(2):393-408, e1-2.
70. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, y cols. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005 Mar;1(3):191-200.
71. Krijt J, Cmejla R, Sykora V, Vokurka M, Vyoral D, Necas E. Different expression pattern of hepcidin genes in the liver and pancreas of C57BL/6N and DBA/2N mice. *J Hepatol.* 2004 Jun;40(6):891-6.

72. Benkhedda K, L'Abbe M R, Cockell KA. Effect of calcium on iron absorption in women with marginal iron status. *Br J Nutr.* 2010 Mar;103(5):742-8.
73. Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jan;53(1):106-11.
74. Dawson-Hughes B, Seligson FH, Hughes VA. Effects of calcium carbonate and hydroxyapatite on zinc and iron retention in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1986 Jul;44(1):83-8.
75. Deehr MS, Dallal GE, Smith KT, Taulbee JD, Dawson-Hughes B. Effects of different calcium sources on iron absorption in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1990 Jan;51(1):95-9.
76. Glerup A, Rossander-Hulthen L, Gramatkovski E, Hallberg L. Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *Am J Clin Nutr.* 1995 Jan;61(1):97-104.
77. Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hulten L. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jan;53(1):112-9.
78. Hallberg L, Rossander-Hulten L, Brune M, Glerup A. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur J Clin Nutr.* 1992 May;46(5):317-27.
79. Hallberg L, Rossander-Hulthen L, Brune M, Glerup A. Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *Br J Nutr.* 1992 Mar;69(2):533-40.
80. Monsen ER, Cook JD. Food iron absorption in human subjects. IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. *Am J Clin Nutr.* 1976 Oct;29(10):1142-8.
81. Roughead ZK, Zito CA, Hunt JR. Inhibitory effects of dietary calcium on the initial uptake and subsequent retention of heme and nonheme iron in humans: comparisons using an intestinal lavage method. *Am J Clin Nutr.* 2005 Sep;82(3):589-97.
82. Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD. Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. *Am J Clin Nutr.* 1988 Jan;47(1):102-7.
83. Simpson KM, Morris ER, Cook JD. The inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am J Clin Nutr.* 1981 Aug;34(8):1469-78.
84. Baig MM, Burgin CW, Cerda JJ. Effect of dietary pectin on iron absorption and turnover in the rat. *J Nutr.* 1983 Dec;113(12):2385-9.
85. Cook JD, Morck TA, Lynch SR. The inhibitory effect of soy products on nonheme iron absorption in man. *Am J Clin Nutr.* 1981 Dec;34(12):2622-9.
86. Disler PB, Lynch SR, Charlton RW, Torrance JD, Bothwell TH, Walker RB, y cols. The effect of tea on iron absorption. *Gut.* 1975 Mar;16(3):193-200.
87. Disler PB, Lynch SR, Torrance JD, Sayers MH, Bothwell TH, Charlton RW. The mechanism of the inhibition of iron absorption by tea. *S Afr J Med Sci.* 1975;40(4):109-16.
88. Ma Q, Kim EY, Han O. Bioactive dietary polyphenols decrease heme iron absorption by decreasing basolateral iron release in human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr.* 2010 Jun;140(6):1117-21.
89. Pizarro F, Olivares M, Chadud P, Stekel A. Efecto de la canela y del te sobre la absorción de hierro no hemínico; Effect of cinnamon and tea on non-hem iron absorption. *Rev chil nutr.* 1988;16(3):318.

90. Sayers MH, Lynch SR, Jacobs P, Charlton RW, Bothwell TH, Walker RB, y cols. The effects of ascorbic acid supplementation on the absorption of iron in maize, wheat and soya. *Br J Haematol.* 1973 Feb;24(2):209-18.
91. Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Amar M, Chadud P, Cayazzo M, y cols. The role of ascorbic acid in the bioavailability of iron from infant foods. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.* 1985;27:167-75.
92. Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Chadud P, Lopez I, Amar M. Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. *Am J Clin Nutr.* 1986 Jun;43(6):917-22.
93. Layrisse M, Martinez-Torres C, Leets I, Taylor P, Ramirez J. Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *J Nutr.* 1984 Jan;114(1):217-23.
94. Layrisse M, Martinez-Torres C. Model for measuring dietary absorption of heme iron: test with a complete meal. *Am J Clin Nutr.* 1972 Apr;25(4):401-11.
95. Lynch SR, Dassenko SA, Morck TA, Beard JL, Cook JD. Soy protein products and heme iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1985 Jan;41(1):13-20.
96. Martinez-Torres C, Layrisse M. Iron absorption from veal muscle. *Am J Clin Nutr.* 1971 May;24(5):531-40.
97. Lonnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr.* 2000 May;130(5S Suppl):1378S-83S.
98. Sandstrom B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr.* 2001 May;85 Suppl 2:S181-5.
99. Solomons NW. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. *J Nutr.* 1986 Jun;116(6):927-35.
100. Whittaker P. Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998 Aug;68(2 Suppl):442S-6S.
101. Sandstrom B, Davidsson L, Cederblad A, Lonnerdal B. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. *J Nutr.* 1985 Mar;115(3):411-4.
102. Crofton RW, Gvozdanovic D, Gvozdanovic S, Khin CC, Brunt PW, Mowat NA, y cols. Inorganic zinc and the intestinal absorption of ferrous iron. *Am J Clin Nutr.* 1989 Jul;50(1):141-4.
103. Friel JK, Serfass RE, Fennessey PV, Miller LV, Andrews WL, Simmons BS, y cols. Elevated intakes of zinc in infant formulas do not interfere with iron absorption in premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998 Sep;27(3):312-6.
104. Herman S, Griffin IJ, Suwanti S, Ernawati F, Permaesih D, Pambudi D, y cols. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in Indonesian children. *Am J Clin Nutr.* 2002 Oct;76(4):813-7.
105. Rossander-Hulten L, Brune M, Sandstrom B, Lonnerdal B, Hallberg L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jul;54(1):152-6.
106. Olivares M, Pizarro F, Ruz M. Zinc inhibits nonheme iron bioavailability in humans. *Biol Trace Elem Res.* 2007 Summer;117(1-3):7-14.
107. Olivares M, Pizarro F, Gaitán D, Ruz M. Acute inhibition of iron absorption by zinc. *Nutrition Research.* 2007;27(5):279-82.

108. Olivares M, Pizarro F, Ruz M. New insights about iron bioavailability inhibition by zinc. *Nutrition*. 2007 Apr;23(4):292-5.
109. Troost FJ, Brummer RJ, Dainty JR, Hoogewerff JA, Bull VJ, Saris WH. Iron supplements inhibit zinc but not copper absorption in vivo in ileostomy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2003 Nov;78(5):1018-23.
110. Olivares M, Pizarro F, de Romana DL, Ruz M. Acute copper supplementation does not inhibit non-heme iron bioavailability in humans. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Aug;136(2):180-6.
111. Wiedeman M, Olivares M, Pizarro F, Araya M. Suplementación con cobre entre comidas no tiene efecto sobre la nutrición de hierro en hombres. *Revista chilena de nutrición*. 2009;36(4):1114-9.
112. FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 11. Calcium. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 2002.
113. Nordin BEC. Nutritional considerations. Calcium, phosphate, and magnesium metabolism: clinical physiology and diagnostic procedures: Churchill Livingstone; 1976.
114. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium, Magnesium, Phosphorus, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC: National Academy Press. 1997.
115. US Department of Health and Human Services. Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General. 2004:68–70.
116. McCarron DA, Heaney RP. Estimated healthcare savings associated with adequate dairy food intake. *Am J Hypertens*. 2004 Jan;17(1):88-97.
117. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D; 2010 Contract No.: Document Number |.
118. Fleet JC. Molecular regulation of calcium and bone metabolism through the vitamin D receptor. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006 Oct-Dec;6(4):336-7.
119. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited. *Am J Clin Nutr*. 2003 Sep;78(3 Suppl):584S-92S.
120. Heaney RP, Weaver CM, Lee Fitzsimmons M. Influence of calcium load on absorption fraction. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1990;5(11):1135-8.
121. Harris WH, Heaney RP. Skeletal Renewal and Metabolic Bone Disease. *New England Journal of Medicine*. 1969;280(4):193-202.
122. Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption-bone flow theory. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1977;127:236.
123. Charles P, Eriksen EF, Hasling C, Sondergard K, Mosekilde L. Dermal, intestinal, and renal obligatory losses of calcium: relation to skeletal calcium loss. *The American journal of clinical nutrition*. 1991;54(1):266S.
124. NIH Consensus conference. Optimal calcium intake. NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake. *JAMA*. 1994 Dec 28;272(24):1942-8.
125. Bronner F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J Cell Biochem*. 2003 Feb 1;88(2):387-93.

126. Fleet JC, Wood RJ. Specific 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-mediated regulation of transcellular calcium transport in Caco-2 cells. *Am J Physiol.* 1999 Apr;276(4 Pt 1):G958-64.
127. Giuliano AR, Franceschi RT, Wood RJ. Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Arch Biochem Biophys.* 1991 Mar;285(2):261-9.
128. Wasserman RH. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J Nutr.* 2004 Nov;134(11):3137-9.
129. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Nov 4;1600(1-2):6-11.
130. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.* 2005 Jan;85(1):373-422.
131. Lieben L, Benn BS, Ajibade D, Stockmans I, Moermans K, Hediger MA, y cols. Trpv6 mediates intestinal calcium absorption during calcium restriction and contributes to bone homeostasis. *Bone.* 2010 Aug;47(2):301-8.
132. Peng JB, Brown EM, Hediger MA. Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News Physiol Sci.* 2003 Aug;18:158-63.
133. Bronner F, Pansu D, Stein WD. An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am J Physiol.* 1986 May;250(5 Pt 1):G561-9.
134. Wasserman RH, Fullmer CS. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *J Nutr.* 1995 Jul;125(7 Suppl):1971S-9S.
135. Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev.* 1991 Jan;71(1):129-53.
136. Wood RJ, Tchack L, Taparia S. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases the expression of the CaT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line. *BMC Physiol.* 2001;1:11.
137. Wasserman RH, Smith CA, Brindak ME, De Talamoni N, Fullmer CS, Penniston JT, y cols. Vitamin D and mineral deficiencies increase the plasma membrane calcium pump of chicken intestine. *Gastroenterology.* 1992 Mar;102(3):886-94.
138. Zelinski JM, Sykes DE, Weiser MM. The effect of vitamin D on rat intestinal plasma membrane CA-pump mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Sep 16;179(2):749-55.
139. Wong V, Goodenough DA. Paracellular channels! *Science.* 1999 Jul 2;285(5424):62.
140. Bass JK, Chan GM. Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutrition.* 2006 Oct;22(10):1057-66.
141. Belkacemi L, Simoneau L, Lafond J. Calcium-binding proteins: distribution and implication in mammalian placenta. *Endocrine.* 2002 Oct;19(1):57-64.
142. Shennan DB, Peaker M. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev.* 2000 Jul;80(3):925-51.
143. Bindels RJ, Hartog A, Abrahamse SL, Van Os CH. Effects of pH on apical calcium entry and active calcium transport in rabbit cortical collecting system. *Am J Physiol.* 1994 Apr;266(4 Pt 2):F620-7.

144. Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev.* 1995 Jul;75(3):429-71.
145. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Molecular mechanism of active Ca<sup>2+</sup> reabsorption in the distal nephron. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:529-49.
146. Glerup A, Rossander-Hulten L, Hallberg L. Duration of the inhibitory effect of calcium on non-haem iron absorption in man. *Eur J Clin Nutr.* 1993 Dec;47(12):875-9.
147. Minihane AM, Fairweather-Tait SJ. Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. *Am J Clin Nutr.* 1998 Jul;68(1):96-102.
148. Abrams SA, Griffin IJ, Davila P, Liang L. Calcium fortification of breakfast cereal enhances calcium absorption in children without affecting iron absorption. *J Pediatr.* 2001 Oct;139(4):522-6.
149. Ames SK, Gorham BM, Abrams SA. Effects of high compared with low calcium intake on calcium absorption and incorporation of iron by red blood cells in small children. *Am J Clin Nutr.* 1999 Jul;70(1):44-8.
150. Grinder-Pedersen L, Bukhave K, Jensen M, Hojgaard L, Hansen M. Calcium from milk or calcium-fortified foods does not inhibit nonheme-iron absorption from a whole diet consumed over a 4-d period. *Am J Clin Nutr.* 2004 Aug;80(2):404-9.
151. Matteucci MJ, Habibe M, Robson K, Baldassano AA, Riffenburgh RH, Tanen DA. Effect of oral calcium disodium EDTA on iron absorption in a human model of iron overdose. *Clin Toxicol (Phila).* 2006;44(1):39-43.
152. Mendoza C, Peerson JM, Brown KH, Lonnerdal B. Effect of a micronutrient fortificant mixture and 2 amounts of calcium on iron and zinc absorption from a processed food supplement. *Am J Clin Nutr.* 2004 Feb;79(2):244-50.
153. Roughead ZK, Zito CA, Hunt JR. Initial uptake and absorption of nonheme iron and absorption of heme iron in humans are unaffected by the addition of calcium as cheese to a meal with high iron bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2002 Aug;76(2):419-25.
154. Reddy MB, Cook JD. Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr.* 1997 Jun;65(6):1820-5.
155. Kalkwarf HJ, Harrast SD. Effects of calcium supplementation and lactation on iron status. *Am J Clin Nutr.* 1998 Jun;67(6):1244-9.
156. Molgaard C, Kaestel P, Michaelsen KF. Long-term calcium supplementation does not affect the iron status of 12-14-y-old girls. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jul;82(1):98-102.
157. Thompson BA, Sharp PA, Elliott R, Fairweather-Tait SJ. Inhibitory effect of calcium on non-heme iron absorption may be related to translocation of DMT-1 at the apical membrane of enterocytes. *J Agric Food Chem.* 2010 Jul 28;58(14):8414-7.
158. Oski FA. Iron deficiency--facts and fallacies. *Pediatr Clin North Am.* 1985 Apr;32(2):493-7.
159. Addy DP. Happiness is: iron. *British Medical Journal.* 1986;292(6526):969.
160. Cook JD, Lipschitz DA. Clinical measurements of iron absorption. *Clin Haematol.* 1977 Oct;6(3):567-81.
161. Glantz SA. Primer of biostatistics: The program V 3.02. In: McGraw-Hill, editor.; 1992.

162. Fischer DS, Price DC. A Simple Serum Iron Method Using the New Sensitive Chromogen Tripyridyl-S-Triazine. *Clin Chem.* 1964 Jan;10:21-31.
163. International Anemia Consultative Group (INACG). Measurements of iron status. Washington, D.C.: Nutrition Foundation; 1985. p. 35-54.
164. Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T. The Tulane table of blood volume in normal men. *Surgery.* 1962;51:224-32.
165. Eakins JD, Brown DA. An improved method for the simultaneous determination of iron-55 and iron-59 in blood by liquid scintillation counting. *Int J Appl Radiat Isot.* 1966 Jul;17(7):391-7.
166. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for calcium, phosphorous, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington, DC: National Academies Press; 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2002; 2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019; 2020; 2021; 2022; 2023; 2024; 2025. 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2002; 2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019; 2020; 2021; 2022; 2023; 2024; 2025.

## **ANEXOS**

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO SOBRE BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO ANTES Y DESPUÉS DE UN PERÍODO DE SUPLEMENTACIÓN CON CALCIO**

A usted se le está invitando a participar en esta investigación en nutrición. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes aspectos.

Una vez que haya comprendido el estudio, y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

#### **QUE DEBE SABER ACERCA DE ESTE ESTUDIO**

Esta forma se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Título del estudio: Disponibilidad del hierro antes y después de un período de suplementación con calcio.

El estudio será realizado en el Laboratorio de Micronutrientes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

El investigador responsable de este estudio es el Sr. Israel Ríos Castillo, postulante a Magister en Nutrición y Alimentos del INTA. Fono 66204988 ó 62239575; correo electrónico: israel.rios@inta.uchile.cl. El Director de Tesis es el Profesor Fernando Pizarro, investigador del INTA, fono 9781522; correo electrónico: fpizarro@inta.uchile.cl.

Usted tiene el derecho de participar o no de este estudio, pues su participación es voluntaria. Si decide participar, también tiene el derecho a cambiar de opinión posteriormente.

#### **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO**

El calcio es un mineral utilizado para la formación de huesos y dientes, especialmente en la niñez. Se encuentra principalmente en leche y derivados. Por muchos años se ha creído que el calcio disminuye la absorción intestinal del hierro y se ha recomendado que no se debieran administrar conjuntamente. El objetivo de este estudio es determinar el efecto de un período de suplementación con calcio sobre la absorción del hierro. Los resultados contribuirán a aclarar las controversias que existen hasta el día de hoy y que impiden establecer recomendaciones respecto a la suplementación con ambos nutrientes.

#### **BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Con este estudio usted sabrá si tiene anemia u otra forma más leve de carencia de hierro. En el caso de presentar anemia o carencia de hierro, se le derivará a su centro de salud o médico personal para su tratamiento.

Además, al final del estudio usted recibirá \$70.000 por su participación. Cabe aclarar que sólo se compensará siempre y cuando complete todo el estudio.

### **RIESGOS DEL ESTUDIO**

Usted no corre ningún peligro. La dosis de radioactividad que recibirá es menor a la recibida cuando se le toma una radiografía de tórax. Por razones de seguridad, sólo serán seleccionadas mujeres que utilicen algún método anticonceptivo, además se les realizará un test de embarazo, el día 1 del estudio, a fin de no incluir personas embarazadas.

En el sitio de punción de la vena pudiera aparecer, en algún caso, un moretón, para disminuir este riesgo, la muestra será tomada por un Tecnólogo Médico de mucha experiencia en tomar muestras de sangre.

### **PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

En caso de aceptar participar en el estudio, será invitada a una reunión informativa en donde se le explicará todos los términos del estudio, y la cual tendrá una duración de 45 minutos.

Deberá asistir en 6 ocasiones al INTA en ayuno de 8 horas. Dos días consecutivos al inicio del estudio, en donde se le administrará radioisótopos de hierro. El día 1 se le tomará una muestra de sangre de 10 ml para hacer mediciones de nutrición del hierro. El día 14 días deberá asistir al INTA para realizarle una segunda extracción de 20 ml de sangre para determinar cuánto del hierro ingerido fue incorporado en su hemoglobina. Luego usted recibirá durante 43 días suplemento de calcio o placebo. Al día 34 de la suplementación se le realizará nuevamente los estudios de absorción iniciales, en donde deberá asistir nuevamente por dos días consecutivos para la administración del hierro y luego de 14 días, para la extracción de una muestra de sangre. Cada visita al INTA tendrá una duración de 30 minutos.

Además, en la reunión informativa se le evaluará su estado nutricional, para ello se deberán medir peso, talla y circunferencia de cintura, y tendrá una duración de 15 minutos.

Se aplicará una encuesta alimentaria en 3 días distintos, dos días de semana y un día de fin de semana. Cada encuesta tendrá una duración de 15 a 20 minutos. Si usted cuenta con correo electrónico o acceso a internet, podrá completar las encuestas alimentaría desde su casa, de lo contrario se le realizará el día de la reunión informativa.

### **ACLARACIONES**

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que así lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no las razones de su decisión, la cual será respetada en su

integridad. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada participante, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, sí así lo desea, firmar la carta de consentimiento informado que forma parte de este documento.

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:**

Yo, \_\_\_\_\_, he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado(a) y convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante:

Fecha:

### ENCUESTA DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS RESUMIDA

N°	Nombre:				Peso:	Talla:	IMC:
ALIMENTO	FRECUENCIA				TAMAÑO / PORCIÓN Med. Casera.	CANTIDAD APROX. (g)	OBSERVACIONES
	diario	semanal	quincenal	mensual			
Lácteos							
Carne de vacuno							
Cerdo y fiambres							
Pollo							
Cordero y otros							
Vísceras							
Pescado							
Mariscos							
Huevos							
Leguminosas							
Papas							
Verduras							
Frutas							
Arroz							
Avena							
Pastas							
Pan							
Aceite							
Mantequilla							
Mayonesa							
Crema							
Azúcar							
Bebidas alcohólicas							
Bebidas gaseosas							
Jugos en polvo							
Golosinas							
Otros							