



Programa de Magíster en Nutrición y Alimentos

---

***EFFECTO DEL RETINOL PALMITATO Y  $\beta$ -CAROTENO  
SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO NO  
HEMÍNICO EN MUJERES EN EDAD FÉRTIL***

---

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

Giannina Pomarolli Rizzoli  
Nutricionista  
Tesisista

Prof. Fernando Pizarro Aguirre  
Director de tesis

*SANTIAGO DE CHILE, NOVIEMBRE 2016*

**COMISIÓN DE TESIS:**

Dra. Bárbara Ángel – Profesora INTA

Dr. Luis Valladares– Profesor INTA

Dr. Julio Espinoza – Profesor Facultad de Medicina, Universidad de Chile

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

Calificación Final: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y pareja por el apoyo entregado durante el transcurso del programa.

Al Profesor Fernando Pizarro por ser mi guía durante todo el programa de magíster y por brindarme la oportunidad de aprender de su amplia experiencia en el campo de la investigación, especialmente en micronutrientes.

Al cuerpo académico del laboratorio de micronutrientes del INTA, de quienes me he beneficiado en mi formación académica. De igual manera, al equipo profesional, técnico y auxiliar del laboratorio quienes me ofrecieron su ayuda.

A mis profesores de Comisión quienes apoyaron y entregaron críticas constructivas al proyecto que permitieron mejorar el trabajo.

A Rose Marie Valenzuela por las gestiones realizadas.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
Índice de figuras y tablas	5
Resumen	6
Summary	7
I. Marco teórico	
A. Introducción	8
B. Hierro	9
C. Absorción del hierro	11
D. Factores que influyen en la absorción del hierro	13
E. Vitamina A y $\beta$ -caroteno	14
F. Absorción vitamina A y $\beta$ -caroteno	16
G. Interacción hierro y vitamina A	17
H. Justificación	19
II. Hipótesis y Objetivos	21
III. Marco metodológico	
A. Sujetos	22
B. Tamaño muestral	22
C. Protocolo del estudio	22
D. Justificación de la dosis a entregar	23
E. Métodos	24
F. Consideraciones éticas	24
G. Diseño del estudio	25
H. Variables de interés	25
I. Plan de análisis	26
IV. Resultados	27
V. Discusión y conclusión	32
VI. Referencias bibliográficas	36
VII. Anexos	
A. Certificado de Ética	40
B. Consentimiento informado	42
C. Cuestionario de Frecuencia de Consumo Modificada	44
D. Figura	47

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	<b>Pág.</b>	
Tabla 1	Ingestas requeridas de hierro para crecimiento en menores de 18 años, mediana de pérdida basal, pérdidas menstruales y total de requerimiento absoluto	10
Tabla 2	Factores que influyen en la absorción de hierro dietario	14
Tabla 3	Estimación del requerimiento promedio y nivel seguro de ingesta para vitamina A por grupo	16
Tabla 4	Características de los sujetos de estudio	27
Tabla 5	Marcadores del estado nutricional del hierro	28
Tabla 6	Biodisponibilidad individual de hierro no hemo	30
Tabla 7	Retinol sérico de las voluntarias del estudio	31
Figura 1	Absorción de hierro hemo y no hemo	12
Figura 2	Digestión, absorción, transporte y metabolismo de la vitamina A	17
Figura 3	Protocolo de estudio de absorción de hierro no hemo	23
Figura 4	ANOVA de una vía para la biodisponibilidad de hierro no hemo (4 estudios)	31
Figura 5	ANOVA de una vía para la biodisponibilidad de hierro no hemo (3 estudios)	33
Figura 6	Etapa del ciclo menstrual de los sujetos al inicio del estudio	47

## RESUMEN

**Introducción:** La anemia por deficiencia de hierro y deficiencia de vitamina A afectan a más del 30% de la población global, siendo lactantes, niños mujeres en edad fértil y embarazadas los grupos más vulnerables. Como consecuencia, en múltiples países se han instaurado políticas de fortificación de alimentos donde coexiste el hierro con vitamina A, siendo el efecto de esta interacción controversial.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de retinol palmitato y  $\beta$ -caroteno a dos concentraciones diferentes sobre la absorción intestinal de hierro no hemínico en mujeres en edad fértil.

**Metodología:** Ensayo experimental, transversal, en bloque, donde cada sujeto fue control de sí mismo. Participaron 13 mujeres (edad promedio:  $39,8 \pm 3,7$  años) aparentemente sanas quienes recibieron una dosis de retinol palmitato (1,832 mg) y dos dosis de  $\beta$ -caroteno (1,874 mg y 3,748 mg respectivamente). Se determinó la biodisponibilidad de hierro no hemo antes y después de la intervención. Se utilizaron los trazadores  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  para medir biodisponibilidad de hierro y ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas a los promedios de la absorción del hierro.

**Resultados:** El promedio geométrico (rango  $\pm 1$  DE) de la absorción basal de hierro de los sujetos estudiados fue 14,91% (4,08-54,48). El porcentaje de absorción de hierro aumenta a 16,74% (3,01-92,96) cuando se adiciona 1,832 mg de retinol palmitato y a 18,05% (8,88-36,71%) y 23,71% (9,63-58%) al adicionar 1,874 mg y 3,748 mg  $\beta$ -caroteno respectivamente. Al aplicar ANOVA no se encontraron diferencias significativas.

**Conclusión:** Vitamina A como retinol palmitato y  $\beta$ -caroteno no modificaron la absorción del hierro no hemínico.

**Palabras claves:** Absorción, Biodisponibilidad, Hierro no hemo, Retinol Palmitato,  $\beta$ -caroteno.

## **SUMMARY**

**Introduction:** Iron deficiency anemia and vitamin A deficiency affects more than 30% of the global population. Infants, children, women of childbearing age and pregnant women, are the most vulnerable groups. Many countries have established food fortified program which coexists iron with vitamin A, being controversial the effect of this interaction.

**Objective:** To evaluate the effect of retinyl palmitate and  $\beta$ -carotene at two different concentrations on the intestinal absorption of non-heme iron in women of childbearing age.

**Methodology:** Experimental, controlled, in block study, where each subject was self-control test. Participants 13 women (age:  $39.8 \pm 3.7$  years) who were apparently healthy received a dose of retinyl palmitate (1.832 mg) and two doses of  $\beta$ -carotene (1.874 mg and 3.748 mg respectively). Non-heme iron bioavailability was determined before and after intervention. The tracers  $^{55}\text{Fe}$  and  $^{59}\text{Fe}$  were used to measure iron bioavailability and one-way ANOVA to determine significant differences repeated averages samples iron absorption.

**Results:** The geometric mean (range  $\pm 1$  SD) of the basal iron absorption with soybean oil study subjects was 14.91% (4.08 to 5.48). The percentage of absorption of iron is increased to 16.74% (from 3.01 to 92.96) when 1.832 mg of retinol palmitate is added, and is increased to 18.05% (from 8.88 to 36.71%) and 23.71% (9.63 to 58.0%) by adding 1.874 mg and 3.748 mg  $\beta$ -carotene respectively. When applying ANOVA no significant differences were found

**Conclusion:** Vitamin A as retinyl palmitate and  $\beta$ -carotene did not change the absorption of non-heme iron.

**Keywords:** Absorption, Bioavailability, Non-heme iron, Retinyl Palmitate,  $\beta$ -carotene.

## I.- MARCO TEÓRICO

### INTRODUCCIÓN

La anemia por deficiencia de hierro y deficiencia de vitamina A afectan a más del 30% de la población global, siendo lactantes, niños y mujeres en edad fértil y embarazadas los grupos más vulnerables (1,2).

El hierro es un micronutriente esencial para la vida (3). Su homeostasis está regulada principalmente por su absorción intestinal en el enterocito (4). Sin embargo la biodisponibilidad del mineral está en función de su forma química e interacción con otros componentes alimentarios dentro de los cuales está la vitamina A.

La fortificación de alimentos se ha planteado a nivel mundial como una estrategia de políticas públicas. En nuestro país la harina de trigo se fortifica por ley desde la década del año 1950 con 30 mg/kg de hierro como sulfato ferroso, y la leche purita fortificada desde el año 1999 con 10 mg de hierro como sulfato ferroso, 5 mg de zinc, 0,5 mg de cobre y 70 mg de ácido ascórbico por 100 gramos de producto. Sin embargo en otros once países, ya se está fortificando o pretenden fortificar la harina de trigo o maíz con vitamina A sumado a hierro y otros minerales (5). La interacción de estos dos micronutrientes (Vitamina A y hierro) pueden tener implicancias para el desarrollo de diseños de programas de intervención dirigida a poblaciones con bajos niveles de vitamina A y anemia por deficiencia de hierro. Sin embargo, las evidencias actuales sobre el efecto que genera la vitamina A y el  $\beta$ -caroteno sobre la absorción del hierro no hemínico han sido controversiales (72,76).

Por lo tanto esta tesis propuso estudiar el efecto que genera la vitamina A y los  $\beta$ -caroteno sobre la biodisponibilidad de hierro no hemínico en mujeres en edad fértil considerando que en algunos países ya entregan alimentos fortificados con ambos componentes.

## A.- HIERRO

En 1985 se estimó que la deficiencia de hierro era la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial, siendo además la principal causa de anemia (6). Una estimación basada en los criterios de la OMS indica que alrededor de 600-700 millones de personas en el mundo han presentado anemia por deficiencia de hierro y la mayor parte de ellas vive en países en desarrollo (7). Se estima que un 39% de los niños menores de 5 años, 48% de los niños entre 5 a 14 años, 42% de todas las mujeres y 52% de las mujeres embarazadas en los países en desarrollo son anémicas mientras que en los países desarrollados la prevalencia de anemia es mucho menor variando entre 2-8% (7).

La prevalencia nacional de anemia por deficiencia de hierro en lactantes ha disminuido notablemente a cerca de un 8%, cuando históricamente era de un 30% o más. Mientras que en hombres adultos no es un problema (8) en mujeres en edad fértil la prevalencia nacional de anemia ferropriva, entre las décadas de 1981 y 2010 fue 9, 6 y 10% respectivamente (9), y en embarazadas la prevalencia aumenta a un 20% durante el segundo y tercer trimestre de gestación (10,11).

El hierro es el cuarto elemento químico más abundante de la tierra, su peso molecular es 55,847 gramos por mol (12,13). En la superficie terrestre el hierro se encuentra en la forma de isótopos estables  $\text{Fe}^{56}$  (91.7% del hierro total),  $\text{Fe}^{54}$  ( $\approx 5.8\%$ ),  $\text{Fe}^{57}$  ( $\approx 2.2\%$ ), y  $\text{Fe}^{58}$  ( $\approx 0.28\%$ ), pero además existen dos isótopos radioactivos,  $\text{Fe}^{55}$  (vida media 2.6 años) y  $\text{Fe}^{59}$  (vida media 45.1 días) que emiten radiaciones K y gama respectivamente (14). Los isótopos radioactivos, y los isótopos estables  $\text{Fe}^{57}$  y  $\text{Fe}^{58}$  se utilizan para estudiar la biodisponibilidad del metal (15). 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 (16).

El hierro participa en una amplia variedad de procesos metabólicos incluyendo síntesis de DNA, respiración celular, transporte de oxígeno y electrones (17). Sin embargo, en su forma libre tiene la capacidad de generar radicales oxidativos que dañan componentes biológicos como

lípidos, proteínas y DNA (18). 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 (19-21). Este mecanismo de regulación homeostático de hierro es controlado a nivel de la absorción intestinal en el enterocito, ya que no hay un mecanismo fisiológico para su excreción (4). Sólo se generan pérdidas a través de descamación de células epidérmicas y epiteliales del tracto gastrointestinal sumado al micro sangramiento fisiológico intestinal, alcanzando una pérdida total de 0,8 mg de hierro diario en adulto sano (22), cifra que aumenta con las necesidades del crecimiento y sangramiento menstrual generando que las mujeres en edad fértil sean más vulnerable a experimentar deficiencia de hierro (14) (Tabla 1).

La cantidad aproximada de hierro corporal en un adulto son 3,5 gramos en hombres y 2,5 gramos en mujeres. La mayor parte está presente en los eritrocitos como hemoglobina ( $\approx$ 2,5 gramos), reservas hepáticas ( $\approx$ 1 gramo), en la mioglobina a nivel muscular y otras enzimas que contienen hierro ( $\approx$ 0,3 gramos) (22).

**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 <sup>a</sup>	
					Mediana (mg/día)	Percentil 95 (mg/día)	Mediana (mg/día)	Percentil 95 (mg/día)
Lactantes y Niños	0,5-1	9	0,55	0,17			0,72	0,93
	1-3	13	0,27	0,19			0,46	0,58
	4-6	19	0,23	0,27			0,50	0,63
	7-10	28	0,32	0,39			0,71	0,89
Masculino	11-14	45	0,55	0,62			1,17	1,46
	15-17	64	0,60	0,90			1,50	1,88
	18+	75		1,05			1,05	1,37
Femenino	11-14 <sup>b</sup>	46	0,55	0,65			1,20	1,40
	11-14	46	0,55	0,65	0,48	1,90	1,68	3,27
	15-17	56	0,35	0,79	0,48	1,90	1,62	3,10
	18+	62		0,87	0,48	1,90	1,46	2,94
Post-menopausia		62		0,87			0,87	1,13
Nodriza		62		1,15			1,15	1,50

<sup>a</sup>Total Requerimientos absoluto = requerimiento para crecimiento + pérdida basal + pérdida menstrual

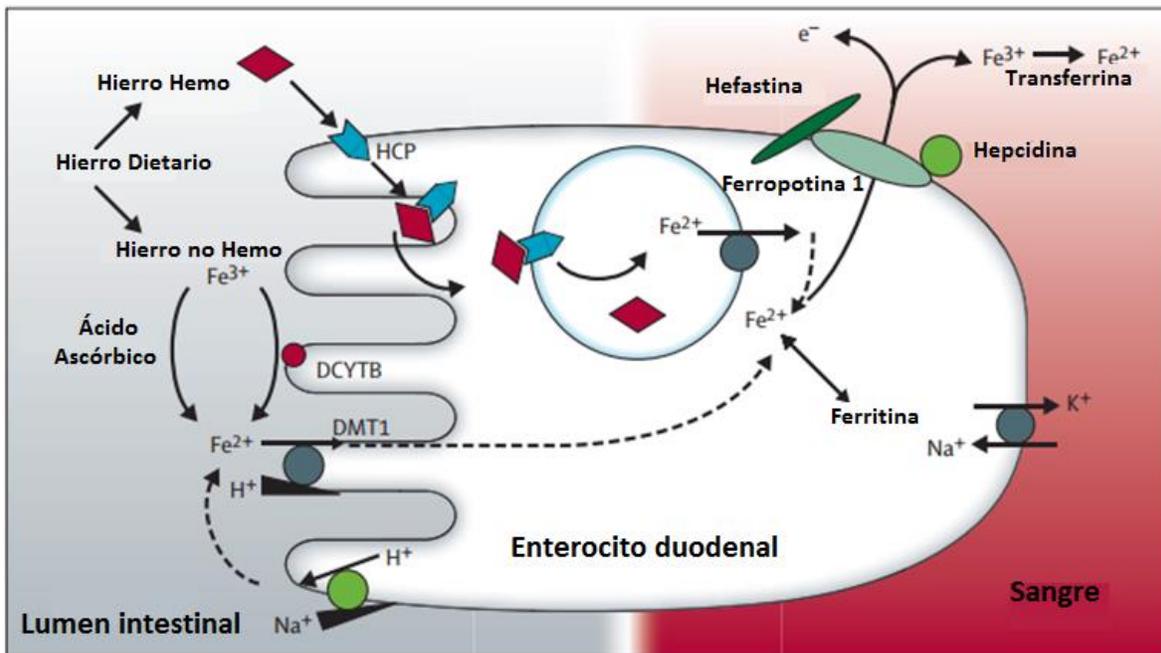
<sup>b</sup> Pre menarquia

De: FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 13. Iron. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 1998.

## B.- ABSORCIÓN DEL HIERRO

Existen dos tipos de hierro en la dieta; uno es el hierro hemínico (Fe-hemo) que forma parte de la estructura del grupo hem (Fe unido a porfirina), y proviene de la hemoglobina y mioglobina. El Fe-hemo contribuye del 10-15% del total ingerido, pero como posee una alta absorción aporta con más del 40% del total de hierro absorbido (23, 24). El otro es el hierro no hemínico (Fe no-hemo) que se encuentra presente en los alimentos de origen vegetal, sales minerales y algunos alimentos de origen animal como la leche y huevo, este hierro por estar ionizado es menos absorbido que el Fe-hemo. Su biodisponibilidad varía desde menos de 1% hasta un 20% debido a que su absorción es influenciada por: a) las reservas corporales de hierro; b) varios factores de la dieta que pueden aumentar o disminuir la eficacia con la cual es solubilizado y/o reducido por el pH gástrico; c) competir con el transportador DMT1 en la membrana apical del enterocito (14). Tanto Fe-hemo como Fe no-hemo tienen transportadores específicos para su absorción (25). El Fe-hemo es solubilizado en el estómago y sin ser modificado se transporta hacia el duodeno donde es capturado e internalizado en el borde del enterocito por la proteína transportadora HCP-1 (Hem Carrier Protein). Esta proteína está sobre regulada en hipoxia y en deficiencia de hierro (26). Una vez en el citoplasma del enterocito, el Fe-hemo es hidrolizado por la enzima hemoxigenasa que libera el hierro y lo hace indistinguible del Fe no-hemo. Por su parte, el Fe no-hemo primero es reducido y solubilizado en el estómago. En el borde en cepillo del enterocito la oxidoreductasa Dcytb (Citocromo b reductasa duodenal) u otros agentes reductores como el ácido ascórbico reducen el hierro de  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  (28), posteriormente el Fe no-hemo es capturado por el transportador de metales divalentes (DMT1) (29) que lo internaliza al enterocito. Una vez dentro de la célula tanto el hierro liberado del hem como el Fe no-hemo puede seguir varios destinos: a) formar parte del pool de hierro lábil; b) ser almacenado en la proteína citoplasmática ferritina; b) ser utilizado en los procesos metabólicos celulares o; d) ser exportado hacia la sangre por medio del transportador de hierro (IREG-1), también denominado ferroportina (26, 27). Esta proteína también media la exportación de hierro a partir de otras células incluyendo los macrófagos (30). El hierro luego de ser exportado del enterocito es re oxidado a  $Fe^{+3}$  por acción

de la hefastina o ceruloplasmina. De esta forma el hierro se une a la transferrina y es transportado hacia los tejidos periféricos (Figura 1) (14).



**Figura 1:** Absorción de Fe-hemo y no hemo en el enterocito.

HCP: Proteína transportadora de Fe-hemo, DCYTB: Citocromo B duodenal, DMT-1: Transportador de metales divalentes

De: Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet*. 2007; 370:511-20.

Como mecanismo clave de regulación de la absorción de hierro se ha propuesto la acción de la hormona hepática hepcidina (31) secretada en el hígado en respuesta a sobrecarga de hierro o inflamación (32,33). En el enterocito, la hepcidina actúa uniéndose a la ferroportina en la membrana basolateral, generando una señalización que induce endocitosis y su posterior degradación lisosomal (34) disminuyendo la transferencia de hierro a la sangre. Cuando hay deficiencia de hierro se reduce la liberación de hepcidina desde el hígado aumentando al máximo la absorción del metal (25).

### **C.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ABSORCIÓN DEL HIERRO**

La biodisponibilidad de hierro se puede definir como la fracción de hierro absorbido que es incorporado a la síntesis de hemoglobina durante la eritropoyesis (23,35). La biodisponibilidad del hierro depende del estado nutricional del hierro de los sujetos, de algunos eventos que requieran modificar la movilización de hierro entre los tejidos como la eritropoyesis aumentada, la hipoxia, infección e inflamación (36). La absorción de hierro se encuentra aumentada durante la deficiencia del metal, anemias hemolíticas y en la hipoxia, mientras que en los procesos infecciosos o inflamatorios existe una reducción de la absorción del mismo. Además influye el tipo de hierro suministrado en los alimentos, la cantidad del mismo y la combinación con otros alimentos en las comidas (23,37). La adición de sustancias reductoras deben estar presentes para que el hierro sea absorbido, por lo tanto la presencia de ácido ascórbico (38,39), y proteínas que contienen aminoácidos ricos en histidina y enlaces sulfhídricos (40) favorecerían la absorción del Fe no-hemo. Por su parte dentro de los factores inhibidores de la absorción del hierro están: a) los fitatos, que unen varios metales en el duodeno inhibiendo su absorción, y cuyo efecto es dependiente de la dosis y comienza a concentraciones muy bajas de 2-10 mg/comida (41); b) los compuestos fenólicos, principalmente los que contienen grupos galoil (42), polifenoles del té, café y cacao; c) el calcio que interfiere en la absorción de Fe-hemo y no hemo (43); d) y las proteínas de origen animal como la de la leche, huevo y albúmina (44) (Tabla 2). El efecto que genera la vitamina A y  $\beta$ -caroteno sobre la absorción del hierro sigue sin resolver.

**Tabla 2:** Factores que influyen en la absorción de hierro dietario

Absorción del hierro hemo	Absorción del hierro no hemo
Factores que determinan el estado de hierro de los sujetos:	Factores que determinan el estado de hierro de los sujetos:
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cantidad de hierro hemo, especialmente aquel proveniente de las carnes</li><li>• Contenido de calcio en la comida</li><li>• Preparaciones de los alimentos (tiempo, temperatura)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cantidad potencialmente disponible de hierro no hemo</li><li>• Balance entre factores favorecedores e inhibidores<ul style="list-style-type: none"><li>❖ Favorecedores: Ácido ascórbico, carnes, pescados u otros alimentos marinos, vegetales fermentados como salsa de soya fermentada, etc.</li><li>❖ Inhibidores: Fitatos y otros inositol fosfatos, Compuestos fenólicos (te, café, ciertas especias, ciertos vegetales y la mayoría de los vinos tintos) y proteína de soya</li></ul></li></ul>

*Adaptado de: Informe de una consulta de expertos. Capítulo 13. Hierro. Requerimientos humanos de vitaminas y minerales. Bangkok, Tailandia; 1998.*

#### **D.- VITAMINA A Y $\beta$ -CAROTENO**

En el año 1987, la OMS calculó que la carencia de vitamina A era endémica en 39 países, siendo en el año 1995 un problema de salud pública en 60 países (45). En el período de 1995 a 2005 se estimó que a nivel mundial 19,1 millones de embarazadas y 190 millones de niños en edad preescolar presentaron concentración bajas de retinol sérico ( $< 0,70 \mu\text{mol/l}$ ), siendo África y Asia Sudoriental los más afectados por la carencia (45). En Chile, la OMS estimó que entre los años 1995-2005, la deficiencia de vitamina A afectaba a 97.000 preescolares y 6.000 mujeres, caracterizando el problema de deficiencia de vitamina A como leve (45).

La vitamina A es el término genérico utilizado para describir los compuestos que presentan la actividad biológica del retinol como los retinoides y carotenoides pro-vitamina A. Los retinoides se encuentran de tres formas en la naturaleza: alcohol (retinol), aldehído (Retinal o retinaldehido) y ácido (ácido retinoico) (46). Los carotenoides pro-vitamina A son llamados así ya que al

metabolizarse generan retinoides, de los cuales alrededor de 50 generan retinol. El  $\beta$ -caroteno es el carotenoide provitamina A más activo ya que puede dar lugar a dos moléculas de retinol, mientras que el  $\alpha$ -caroteno, el  $\gamma$ -caroteno y el  $\beta$ -criptoxantina solo pueden aportar una molécula de retinol y muestran una actividad pro-vitamínica en un 30-50% (47,48).

Dentro de las funciones de la vitamina A destaca su participación en el mantenimiento de la visión normal, crecimiento y diferenciación celular, síntesis de glicoproteínas y glicosaminoglucanos, embriogénesis, respuesta inmune, función tiroidea, reproducción, hemopoyesis y otras funciones como balance energético, regulación del sistema dopaminérgico, transducción de señal y apoptosis (49). Estas funciones celulares están mediadas a través de receptores nucleares específicos, los cuales una vez activados se unen a elementos respuesta de DNA de genes específicos para regular la expresión génica y con ello la síntesis de un gran número de proteínas vitales para mantener diversas funciones fisiológicas (50).

La vitamina A preformada como ésteres de retinilo, principalmente como retinol palmitato, se encuentra en alimentos de origen animal tales como la leche humana, carnes, hígado, yema de huevo, entre otros. Los carotenoides pro-vitamina A se encuentran en alimentos de origen vegetal como vegetales de hojas verdes y verduras con colores amarillo y anaranjado (52). A pesar de que estos últimos tienen una actividad biológica de vitamina A menos disponible, son más accesibles que los productos de origen animal, por lo tanto es la principal fuente de vitamina A de las poblaciones económicamente desfavorecidas. Se estima que la vitamina A preformada contribuye a casi el 65% del total de la ingesta de vitamina A y los carotenoides el 35% por lo que el consumo de un solo componente no alcanza para completar la recomendación de la vitamina (53).

Las recomendaciones de consumo se expresan en equivalentes de retinol y son las cantidades necesarias para prevenir la deficiencia de la ingesta segura para la población. Las estimaciones de los requerimientos promedios se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Estimación del requerimiento promedio y nivel seguro de ingesta para vitamina A por grupo

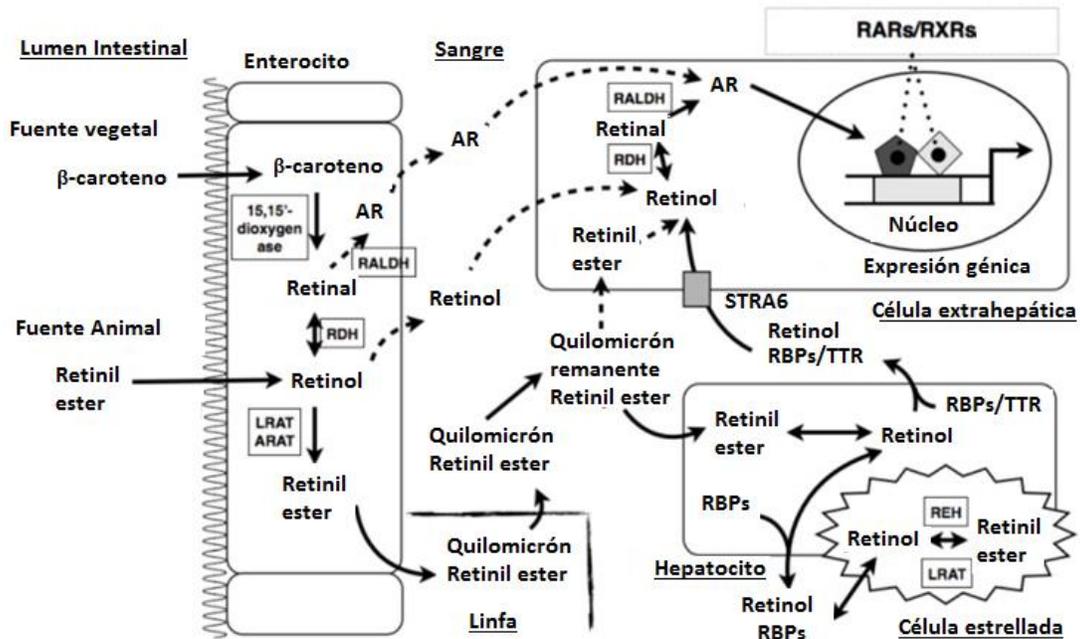
Grupo	Requerimiento promedio (µg ER/día)	Recomendación ingesta segura (µg ER/día)
<b>Lactantes y niños</b>		
0-6 meses	180	375
7-12 meses	190	400
1-3 años	200	400
4-6 años	200	450
7-9 años	250	500
<b>Adolescentes</b>		
10-18 años	330-400	600
<b>Adultos</b>		
<b>Mujeres</b>		
19-65 años	270	500
65+ años	300	600
<b>Hombres</b>		
19-65 años	300	600
65+ años	300	600
Embarazadas	370	800
Nodrizas	450	850

De: *FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 13. Iron. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 1998.*

## E.- ABSORCIÓN DE VITAMINA A Y β-CAROTENO

La digestión de la vitamina A y carotenoides comienza en el estómago donde son liberados de las proteínas a través de proteólisis. A su vez, en el duodeno los esteres de retinol son hidrolizados a retinol por las lipasas y esterases (49). El retinol libre es absorbido tanto por difusión facilitada por la fase micelar como por transporte activo mediada por la proteína celular fijadora de retinol tipo II (CRBP-II). Por otra parte, los carotenoides pueden absorberse intactos en el enterocito donde son hidrolizados por acción de las dioxigenasas. Después, estos compuestos son convertidos a retinol por medio de la enzima retinaldehído reductasa. Finalmente, las moléculas de retinol son re-esterificadas por acción de la enzima lecitin-retinol acetil transferasa (LRAT) contenida en los microsomas (51, 54). Estos ésteres de retinol junto con retinol en forma libre y algunos carotenoides que no han sido hidrolizados previamente, sumado a ésteres de colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y apolipoproteínas, son incorporados a los quilomicrones para ser secretados a la linfa y eventualmente entran a la circulación (55). Los esteres de retinol captados por los hepatocitos se hidrolizan nuevamente a retinol, el cual puede re-esterificarse a través de retinil ester hidrolasa (REH) y almacenarse en las células estrelladas del hígado, o puede unirse a

la proteína transportadora de retinol (RBP) y transtiretina (TTR) para transportarse a los tejidos diana, donde el complejo es reconocido por el receptor celular estimulado por el ácido retinoico 6 (STRA6) y el retinol es catabolizado a retinal a través de RDH, y posteriormente a ácido retinoico (AR), el cual activa a receptores nucleares RAR  $\alpha$ , RAR  $\beta$  y RAR  $\gamma$ , enlazando elementos respuesta en genes específicos que pueden aumentar o disminuir la expresión del gen (49). Además 9 *cis* AR activa a otros tres receptores nucleares RXR  $\alpha$ , RXR  $\beta$  y RXR  $\gamma$ , por lo que hay cientos de genes que pueden ser inducidos o reprimidos por los retinoides (Figura 2) (49).



**Figura 2:** Digestión, absorción, transporte y metabolismo de la vitamina A

LRAT: Lecitina retinol aciltransferasa, ARAT: Acil-Coa aciltransferasa retinol, RBP: Proteína de unión al retinol, RDH: Retinol deshidrogenasa, ALDH: Deshidrogenasa de la retina, REH: Retinil éster hidrolasa, STRA6: Receptor celular estimulado por el ácido retinoico 6, RA: Ácido retinoico, RAR: Receptor de ácido retinoico, RXR: Receptor X retinoide. TTR: Transtiretina. Adaptado de: Chen W, Chen G. Rol de la vitamina A en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. *J Clin Med.* 2014; 3(2): 453–479.

## F.- INTERACCIÓN HIERRO Y VITAMINA A

Se ha reportado ampliamente una relación estrecha entre la vitamina A y el estado de nutrición del hierro. Los primeros estudios en animales realizados por Findlay y MacKenzie en 1922 reportaron que ratas deficientes en vitamina A desarrollaban parches de degeneración gelatinosa

en la médula ósea y en aquellos que sobrevivían, el tejido hematopoyético había sido reemplazado casi completamente con estroma fibroso, sin embargo, al restaurar la dieta con vitamina A se regeneraba la médula ósea y desaparecía la hemosiderina del hígado y bazo (56). En los experimentos de Koesler et al. en 1926, las ratas desarrollaron bajos niveles de recuento de hemoglobina y eritrocitos pero a medida que la deficiencia de vitamina A avanzaba los animales se deshidrataban, los volúmenes celulares y niveles de hemoglobina aumentaban (57). En 1933 Blackfan y Wolbach demuestran anemia ferropénica en pacientes que presentaban carencia de vitamina A además de hemosiderosis del bazo e hígado, y una vez repletada la vitamina A se observó regeneración de la médula ósea, desaparición de la hemosiderosis en bazo e hígado y mejora de la actividad eritroblástica (58). Wagner en 1940 muestra que sujetos que mantenían una dieta deficiente en vitamina A durante seis meses desarrollaban bajos niveles de hemoglobina y hematocrito, concluyendo que la hematopoyesis se veía afectada (59). En las décadas siguientes Hodges et al. describe un estudio en humanos que recibieron una dieta con muy bajos niveles de vitamina A y observaron que varios meses después del inicio del estudio, los voluntarios desarrollaron una anemia gradual que no respondió al hierro medicinal, pero sí a la reposición con  $\beta$ -caroteno o vitamina A (60). Posteriormente Mejía y Arroyave en 1982 evaluaron el programa de fortificación de vitamina A en Guatemala e informaron que después de seis meses de aplicación del programa de fortificación las variables del hierro habían mejorado llegando a la conclusión de que en deficiencia de vitamina A el hierro almacenado se incrementa y que la intervención con vitamina A puede afectar positivamente el nivel de transferrina plasmática, lo que aumentaría la disponibilidad de hierro para la hematopoyesis (61). Semba et al en 1992 muestra que la suplementación de vitamina A en niños preescolares se asoció a un aumento en la ferritina plasmática y un aumento en la hemoglobina en niños con baja hemoglobina basal (62). Roodenburg et al. en 1996 demuestra en ratas que la deficiencia de vitamina A produce una anemia leve como primer cambio en el metabolismo de hierro, seguido por un aumento en la absorción aparente de hierro y un aumento en los niveles de hierro en el bazo (63). Por lo tanto, hasta ese momento, los posibles mecanismos de esta interacción entre vitamina A y hierro estaría dada porque la deficiencia de vitamina A disminuiría la síntesis de transferrina y por lo tanto

reduciría el transporte a la médula ósea (64,65,66), disminuyendo la diferenciación de células sanguíneas debido a una falta de ácido retinoico (67,68); resultando en una eritropoyesis ineficaz (69) y perjudicando la movilización de los depósitos de hierro de transferrina (61). Además, como alternativa, se sugirió que la alta prevalencia de infecciones que se presentan con frecuencia durante la deficiencia de vitamina A es indirectamente responsable de la disminución de las concentraciones de hemoglobina debido a que el organismo secuestra hierro durante las infecciones (70).

Layrisse y Gracia Casal posteriormente sugieren que tanto la vitamina A como el  $\beta$ -caroteno se unen al hierro liberado del proceso digestivo y actuarían como agentes para ligar el hierro manteniéndolo soluble en el lumen intestinal y previniendo la inhibición de los polifenoles y fitatos sobre la absorción del hierro no hemínico (71,72,74,75). Sin embargo Walczyk (76) concluye que la vitamina A no tiene ningún efecto en la absorción del hierro e inclusive determinan un efecto ligeramente negativo.

Por lo tanto en base a la literatura actual, no hay consenso sobre el efecto que genera la vitamina A y el  $\beta$ -caroteno sobre la absorción del Fe no-hemo.

## **G.- JUSTIFICACIÓN**

La anemia por deficiencia de hierro y deficiencia de vitamina A afectan a más del 30% de la población global. Desde hace 90 años que se conoce la existencia de interacción entre ambos nutrientes, pero la evidencia actual sobre el efecto que genera la vitamina A sobre la biodisponibilidad del hierro es controversial. Considerando que estos dos nutrientes pueden tener implicancia para el desarrollo de diseño de programas de intervención dirigida a población con bajos niveles de retinol sérico y anemia por deficiencia de hierro, se hace necesario aclarar la interacción entre ambos componentes.

Los estudios publicados recientemente en humanos miden la absorción del hierro utilizando radioisótopos o isótopos estables de hierro junto a matrices alimentarias que podrían estar contribuyendo a la heterogeneidad de los resultados obtenidos, por lo que se propone

estudiar el efecto de la vitamina A en forma de retinol palmitato y carotenoide pro-vitamina A como  $\beta$ -caroteno sobre la biodisponibilidad de hierro no hemínico a estómago vacío. Además se plantea la necesidad de realizar el estudio en mujeres en edad fértil considerando que son un grupo de riesgo para presentar deficiencia de hierro. Por otro lado es necesario medir el retinol sérico, que hasta ahora no se ha realizado en los otros estudios en discusión, considerando que se presume que podría explicar las diferencias de los resultados obtenidos. En base a ese argumento, sumando a la estadística publicada por la OMS, la deficiencia de vitamina A en Chile es leve, por lo que se esperaría que la vitamina A no afecte a la absorción del hierro. Sin embargo, se esperaría que  $\beta$ -caroteno aumente la absorción del Fe no-hemo por una posible capacidad para aumentar su solubilidad.

Esta investigación novedosa, basada en humanos, pretende ayudar a determinar el efecto de la vitamina A y del  $\beta$ -caroteno sobre la biodisponibilidad de Fe no-hemo. Los resultados contribuirán a aclarar las controversias que existen hasta el día de hoy y que impiden establecer recomendaciones respecto al consumo de ambos nutrientes.

## **II.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### ***Pregunta de investigación:***

¿Qué efecto genera el consumo de retinol palmitato y  $\beta$ -caroteno sobre la absorción intestinal del hierro no hemínico en mujeres en edad fértil?

### ***Hipótesis de trabajo:***

La absorción intestinal de hierro no hemínico es favorecida por el  $\beta$ -caroteno (siendo mayor al aumentar la concentración entregada), no así por el retinol palmitato.

### ***Objetivo general:***

Evaluar el efecto de  $\beta$ -caroteno a dos concentraciones diferentes y retinol palmitato sobre la absorción intestinal de hierro no hemínico en mujeres en edad fértil.

### ***Objetivos específicos:***

- I. Determinar el estado de nutrición de hierro de los participantes
- II. Establecer la absorción basal de 5 mg de hierro
- III. Establecer el efecto del consumo de 1,832 mg de retinol palmitato equivalente a 1 mg de retinol sobre la absorción de 5 mg de hierro no hemínico en mujeres en edad fértil (1mg retinol=3,49  $\mu$ mol)
- IV. Establecer el efecto del consumo de 1,874 mg de  $\beta$ -caroteno (3,49  $\mu$ mol) sobre la absorción de 5 mg de hierro no hemínico en mujeres en edad fértil.
- V. Establecer el efecto del consumo de 3,748 mg de  $\beta$ -caroteno (6,98  $\mu$ mol) sobre la absorción de 5 mg de hierro no hemínico en mujeres en edad fértil.
- VI. Determinar mediante encuestas alimentarias el consumo de hierro y vitamina A de los participantes.

### III.- MARCO METODOLÓGICO

#### A. *Sujetos*

Participaron 14 mujeres con edades que fluctuaron entre 35 a 45 años, aparentemente sanas, con IMC  $<30 \text{ kg/m}^2$ . Criterio de exclusión, no haber recibido ningún suplemento mineral en los últimos 6 meses previos al inicio del estudio. Debido a que se utilizaron isótopos radioactivos, todas las mujeres que participaron en el estudio estaban utilizando un método anticonceptivo (DIU, anticonceptivos orales o ligadura de trompas). Además se realizó una prueba de embarazo previo a comenzar el estudio para descartar posible embarazo.

#### B. *Tamaño muestral*

Un tamaño de muestra de 10 sujetos se calculó para detectar una diferencia en la absorción (por ANOVA) entre los grupos de  $5 \pm 5\%$  (media geométrica  $\pm$  SD) usando datos de la absorción de Fe y Zn que se informaron anteriormente (77-80), se consideró un error  $\alpha$  de 0,05 y 80% de potencia (81). Un total de 14 sujetos se consideraron para cubrir las posibles pérdidas durante el seguimiento.

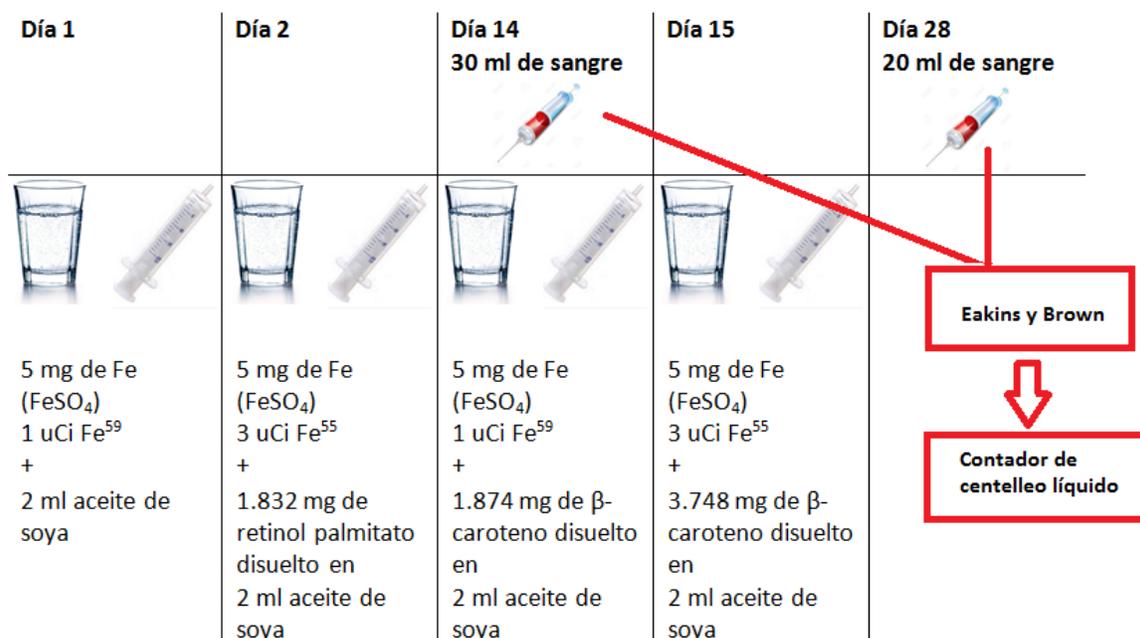
#### C. *Protocolo del estudio*

Los sujetos se presentaron con previo ayuno nocturno de ocho horas los días que se realizaron las intervenciones. Sólo después de 3 horas de administrados los compuestos estaba permitida la ingesta de una colación estándar entregada por el laboratorio.

- **Día 1:** Los sujetos ingirieron 50 ml de una solución acuosa que contenía 5 mg de hierro como sulfato ferroso marcado con  $1 \text{ uCi Fe}^{59}$  junto con 2 ml de aceite de soya.
- **Día 2:** Los sujetos ingirieron 50 ml de una solución acuosa que contiene 5 mg de hierro como sulfato ferroso marcado con  $3 \text{ uCi Fe}^{55}$  junto con  $3,49 \text{ } \mu\text{mol}$  de retinol como retinol palmitato (Sigma PHR1235) disueltos en 2 ml de aceite de soya. (Relación molar Retinol: Fe, 1:26).
- **Día 14:** Se tomó una muestra de 30 ml de sangre para determinar el retinol sérico y estado de nutrición del hierro. Luego, los sujetos ingirieron 50 ml de una solución acuosa que

contiene 5 mg de hierro como sulfato ferroso marcado con 1 uCi Fe<sup>59</sup> junto con 3,49 μmol de β-caroteno (Sigma C9750) disueltos en 2 ml de aceite de soya. (Relación molar Carotenoide: Fe, 1:26).

- **Día 15:** Los sujetos ingirieron 50 ml de una solución acuosa que contiene 5 mg de hierro como sulfato ferroso marcado con 3 uCi Fe<sup>55</sup> junto con 6,98 μmol de β-caroteno (Sigma C9750) disueltos en 2 ml de aceite de soya. (Relación molar Carotenoide: Fe, 1:13).
- **Día 28:** Se realizó una toma de muestra de 20 ml de sangre para medir la radioactividad circulante.



**Figura 3:** Protocolo de estudio de absorción de hierro no hemo

**D. Justificación de las dosis a entregar:**

Se decidió entregar 2 veces la recomendación de ingesta segura de vitamina A y se calculó equivalentes en β-caroteno para 2 y 4 veces la recomendación de ingesta segura de Vitamina A. Se entregan estas dosis considerando las cantidades previamente utilizadas en los estudios descritos (72, 76).

### **E. Métodos:**

Radio-isótopos de  $Fe^{55}$  y  $Fe^{59}$  (NEN, Vida Ciencia Products, Inc., Boston, MA) se utilizaron para determinar la absorción de hierro. La dosis de isótopos que se administró ha sido previamente autorizada por la Comisión Chilena de Energía Nuclear. Estos isótopos se entregaron como una solución junto con los suplementos en los días 1, 2, 14 y 15. En los días 14 y 28, se obtuvo una muestra de 30 y 20 ml de sangre, respectivamente (Figura 3). Usando 10 ml de la muestra de sangre en el día 14 se determinó el retinol sérico y además el estado de nutrición de hierro de los sujetos utilizando los siguientes biomarcadores: hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM) (contador electrónico de células, CELL-DYN 1700, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL), hierro sérico, la capacidad total de unión a hierro (TIBC) y la saturación de transferrina (82), zinc protoporfirina (ZnPP) (Hematofluorimeter ZP-M206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ), la ferritina sérica (SF) por ELISA. Los 20 ml de sangre del día 14 y 28 se utilizaron para medir la radioactividad circulante (cpm/ml) de acuerdo con la técnica de doble isotópica de Eakins y Brown (83). Con el fin de calcular la radiactividad ingerida, se midieron muestras de solución de hierro marcados con  $Fe^{55}$  o  $Fe^{59}$ . Para determinar la biodisponibilidad de hierro se hará a partir de muestras de sangre en duplicado, suponiendo que 80% de la absorción de Fe se utiliza para la síntesis de hemoglobina de los eritrocitos circulantes (84).

La volemia se calculó utilizando la tabla de Tulane (Nadler et al. 1962). Las muestras se contaron repetidamente con un contador de centelleo líquido (Packard 1600TR Tri-Carb Scintillation Counter System, Meriden CT), hasta que el error fue inferior al 3%.

### **F. Consideraciones éticas:**

La anemia por deficiencia de hierro es un problema de salud pública nutricional con alta prevalencia en países en desarrollo. Según los criterios de la OMS indican que entre 600 a 700 millones de personas alrededor del mundo presentan este problema. El hierro es un componente biológicamente esencial de todos los organismos vivos. Participa en una amplia variedad de procesos metabólicos, incluyendo el transporte de oxígeno, síntesis de DNA, y transporte de electrones. La absorción del hierro no-hemínico es afectada por factores intraluminares y dietarios,

la presencia de ácido ascórbico favorece su absorción, en cambio los taninos y fitatos la inhiben. En los países en vías de desarrollo la deficiencia de hierro coexiste con otras carencias de vitaminas y minerales. Como estrategia, se han utilizado suplementos y alimentos fortificados con multi-vitaminas y minerales que pueden presentar interacciones entre ellos. Por lo tanto, se hace necesario establecer el efecto que pueda tener la vitamina A sobre la absorción de hierro para así determinar las dosis a utilizar en suplementos y/o alimentos fortificados que contribuyan a disminuir las altas tasas de anemia por deficiencia de hierro que afecta a gran población mundial. El “Gold Estándar” para medir absorción de hierro es la que utiliza isótopos de hierro (estables y radiactivos). La medición de absorción de hierro con isótopos estables solo está disponible en países del primer mundo. En el laboratorio de micronutrientes del INTA por más de 40 años se han utilizado isótopos radiactivos de hierro para medir absorción de hierro, desde sus inicios el uso ha sido respaldado por la Comisión Chilena de Energía Atómica quienes han calculado que la exposición de los voluntarios a la radiactividad es de 0,35 mSv (la dosis permisible anual es de 1 mSv). Además esta investigación está ajustada a los principios establecidos por la declaración de Helsinki y también se ajusta a las normas y criterios éticos establecidos en Fondecyt y por Normas de Bioseguridad de dicha institución.

Previo al estudio, se realizó una charla obligatoria a los sujetos, donde se explicó en detalle el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado de todas las voluntarias. El proyecto fue aprobado por el comité de ética del INTA, Universidad de Chile (Acta de aprobación N°22).

#### **G. *Diseño del estudio:***

Ensayo experimental, transversal, en bloque, donde cada sujeto fue control de sí mismo.

#### **H. *Variables de interés:***

- **Variables independientes:**

Concentración de compuestos de retinol palmitato y  $\beta$ -caroteno.

- **Variables dependientes:**

Absorción del hierro.

***I. Plan de análisis:***

Se aplicó ANOVA para muestras repetidas a los promedios de la absorción del hierro, y en caso de diferencias significativas se aplicó el test post hoc de Dunnett. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $P < 0,05$ .

#### IV.- RESULTADOS

De las 14 voluntarias ingresadas al estudio, 13 terminaron el protocolo de investigación, una mujer no finalizó ya que se retiró voluntariamente.

La tabla 4 resume las características de las participantes. La edad promedio fue  $39,8 \pm 3,7$  años edad; el índice de masa corporal (IMC) fue  $26,1 \pm 2,2$  Kg/m<sup>2</sup>; en cuanto a los resultados obtenidos de la encuesta de frecuencia de consumo modificada (Anexos, Encuesta frecuencia de consumo) el promedio  $\pm 1$ DE de ingesta de hierro fue  $59,05 \pm 28,06$  mg y  $303 \pm 61$  ER de Vitamina A (61% de adecuación en base a la Recomendación de nivel seguro de ingesta, pero 112% de adecuación en base al requerimiento promedio, es decir 270  $\mu$ g ER/día).

**Tabla 4:** Características de los sujetos de estudio

Variable	Promedio $\pm 1$ DE	% Adecuación <sup>a</sup>
Edad (años)	$39,8 \pm 3,7$	-
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	$26,1 \pm 2,2$	120 <sup>c</sup>
% Grasa corporal	$30,8 \pm 4,8$	123 <sup>d</sup>
Consumo de calorías (Kcal)	$2147 \pm 554$	119
Consumo de proteínas (g)	$95 \pm 24$	141
Consumo de lípidos (g)	$87 \pm 25$	145
Consumo de carbohidratos (g)	$259 \pm 80$	104
Consumo de hierro (mg)	$59 \pm 28$	328 <sup>e</sup>
Consumo de Vitamina A total (ER)	303	61 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> En base al % del Valor Diario de Referencia para un adulto en base a 1800 Kcal, Considerando una distribución de molécula calórica: 55% carbohidratos, 15% proteínas y 30% lípidos.

<sup>c</sup> En base a IMC ideal para mujeres en edad fértil 21,7 kg/m<sup>2</sup>

<sup>d</sup> En base a la recomendación 25%

<sup>e</sup> En base a DRI, 18 mg/d para mujeres entre 31-50 años

<sup>f</sup> En base a Recomendación de ingesta segura, 500 ER/d para mujeres entre 19-65 años

La tabla 5 resume los marcadores de estado nutricional de hierro en el grupo. Una voluntaria presentó anemia por deficiencia de hierro (Hb<12,0 g/dl más dos o más parámetros bioquímicos alterados: VCM>80 fl y/o ZPP>70 µg/dlGR y/o Sat<15% y/o FS<15 µg/l), 2 sujetos presentaron deficiencia de hierro sin anemia (Hb normal y dos o más parámetros bioquímicos alterados) y 3 voluntarias presentaron solo estados depletados de hierro (FS<15 µg/l).

**Tabla 5:** *Marcadores del estado nutricional del hierro e inflamación*

<b>Sujeto</b>	<b>Hb (g/dl)</b>	<b>VCM (fl)</b>	<b>ZPP (µg/dlGR)</b>	<b>Sat (%)</b>	<b>FS (µg/l)</b>
<b>1</b>	12,8	85	57,3	14,8	5,4
<b>2</b>	13,6	85	68,6	27,2	12,8
<b>3</b>	11,4	82	108,7	8,6	5,1
<b>4</b>	14,5	92	85,7	45,5	53,4
<b>5</b>	14,1	85	65,8	13,1	6,4
<b>6</b>	15,8	89	37,1	16,2	24,8
<b>7</b>	14,8	87	74,2	24,5	23,7
<b>8</b>	15,2	89	68,7	33,9	22,9
<b>9</b>	15,2	82	51,3	23,6	9,4
<b>10</b>	15,0	88	65,7	49,1	20,1
<b>11</b>	14,9	86	71,4	19,7	10,3
<b>12</b>	14,4	88	68,5	28,9	30,5
<b>13</b>	14,6	86	74,3	19,1	21,6
<b>Promedio</b>	14,3	86,5	69,0	24,9	19
<b>DE</b>	1,2	2,8	16,8	12,1	13,3

Hb: hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio eritrocitario; Zpp: Zinc protoporfirina; Sat%: porcentaje de saturación de transferrina; FS: ferritina sérica; PCR: Proteína C Reactiva

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

La Tabla 6 resume la biodisponibilidad individual de Fe no-hemo, expresado como % de absorción. El promedio geométrico (rango  $\pm$  1 DE) de la absorción basal de hierro con aceite de soya de los sujetos estudiados fue 14,91% (4,08-54,48). En el día 2 del estudio donde cada sujeto en estado de ayuno ingirió 50 ml de solución que contenía 5 mg de hierro como sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) marcado con  $^{55}\text{Fe}$  más 1,832 mg de Retinol Palmitato disuelto en 2 gramos de aceite de soya, el promedio geométrico (Rango  $\pm$  1DE) del porcentaje de absorción de hierro del fue de 16,74% (3,01-92,96). En el día 14 del estudio, donde cada sujeto en estado de ayuno ingirió 50 ml de solución que contenía 5 mg de hierro como sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) marcado con el isótopo  $^{59}\text{Fe}$  más 1,874 mg de  $\beta$ -caroteno (equivalente a dos veces el nivel seguro de ingesta de vitamina A) disuelto en 2 gramos de aceite de soya, el promedio geométrico fue 18,05% (8,88-36,71%), y finalmente el día 15 del estudio donde cada sujeto en estado de ayuno ingirió 50 ml de solución que contenía 5 mg de hierro como sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) marcado con el isótopo  $^{55}\text{Fe}$  más 3,748 mg de  $\beta$ -caroteno (equivalente a cuatro veces el nivel seguro de ingesta de vitamina A) disuelto en 2 gramos de aceite de soya el promedio geométrico fue 23,71% (9,63-58,38%). Al aplicar ANOVA de una vía para muestras repetidas a los 4 tratamientos (hierro solo, retinol-palmitato,  $\beta$ -caroteno equivalente a 2 y 4 veces el nivel seguro de ingesta) el F fue de 1,43 con un p no significativo (Tabla 6 y Figura 4). A pesar de que para esta tesis se había calculado un tamaño de muestra para encontrar diferencia significativa de 5%, la no diferencia encontrada puede explicarse por la variación en la absorción obtenida por el consumo de 1,832 mg de retinol palmitato cuyo promedio fue 16,74% con un rango máximo de valores que abarcó de 0,2 a 98,9%, anulando cualquier probabilidad de encontrar diferencias.

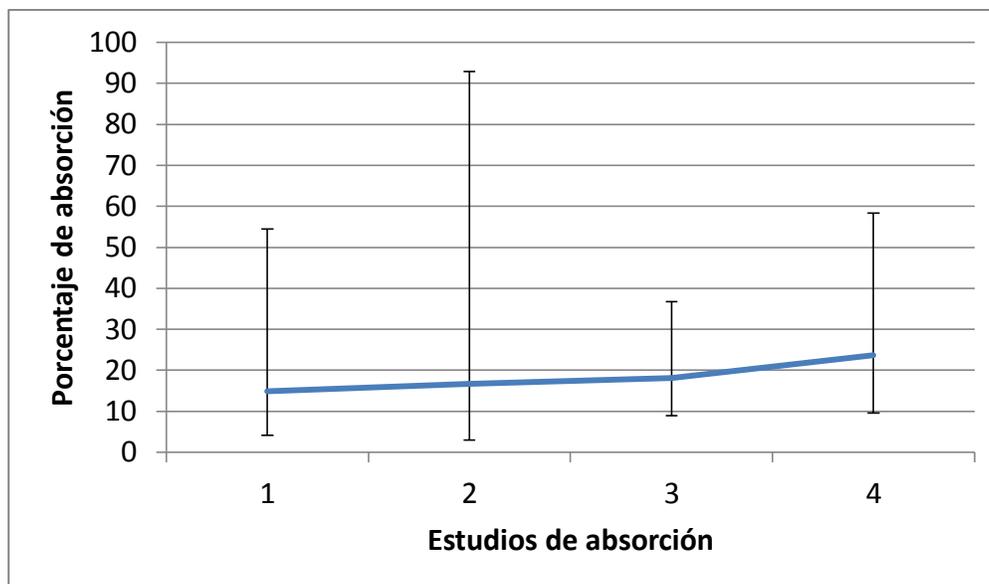
**Tabla 6:** Biodisponibilidad individual de hierro no hemo

Sujetos	Absorción de Fe no-hem (%)				Razón de absorción		
	Día 1 <sup>59</sup> FeSo4 + Aceite de Soya (C)	Día 2 <sup>55</sup> FeSo4 + Aceite de Soya +1,832 mg Retinol Palmitato (A)	Día 14 <sup>59</sup> FeSo4 + Aceite de Soya +1,874 mg β-caroteno (B)	Día 15 <sup>55</sup> FeSo4 + Aceite de Soya +3,748 mg β-caroteno (D)	A/C	B/C	D/C
1	46,5	90,0	37,3	68,3	1,94	0,80	1,47
2	15,3	12,6	27,5	27,5	0,82	1,80	1,80
3	44,4	98,9	44,1	92,8	2,23	0,99	2,09
4	9,7	22,7	5,6	11,2	2,35	0,58	1,16
5	73,7	92,2	48,8	59,7	1,25	0,66	0,81
6	8,1	18,9	17,2	25,2	2,34	2,13	3,12
7	15,9	12,4	13,8	14,3	0,78	0,86	0,90
8	26,4	17,4	17,6	23,7	0,66	0,67	0,90
9	0,6	0,2	5,2	4,6	0,25	8,59	7,57
10	11,9	9,0	18,2	15,7	0,76	1,53	1,32
11	24,4	21,4	22,2	43,0	0,88	0,91	1,76
12	3,1	4,5	8,9	6,6	1,46	2,92	2,15
13	43,9	64,8	22,2	36,9	1,48	0,51	0,84
<b>Promedio<sup>a</sup></b>	14,9	16,7	18,0	23,7	1,12	1,21	1,59
<b>-1 DE</b>	4,1	3,0	8,9	9,63	0,59	0,55	0,85
<b>+1DE</b>	54,5	93,0	36,7	58,4	2,14	2,68	2,98

C: Control

<sup>a</sup> Promedios geométricos (rango ±1 DE)

ANOVA para medias repetidas p=0.2493, N.S.



**Figura 4:** ANOVA de una vía para la biodisponibilidad de hierro no hemo (4 estudios)

Estudio 1:  $^{59}\text{FeSO}_4$  + aceite de soya ; Estudio 2:  $^{55}\text{FeSO}_4$  + aceite de soya +1,832 mg retinol palmitato; Estudio 3:  $^{59}\text{FeSO}_4$  + aceite de soya +1,874 mg  $\beta$ -caroteno; Estudio 4:  $^{55}\text{FeSO}_4$  + aceite de soya +3,748 mg  $\beta$ -caroteno

ANOVA para medias repetidas  $F=1.43$ ,  $p=0.2493$ , N.S.

La tabla 7 muestra el retinol sérico de los sujetos del estudio. Ninguna voluntaria presentó deficiencia de vitamina A al inicio del estudio. El promedio fue  $34,95 \pm 8,72 \mu\text{g/dl}$ .

Sujeto	$\mu\text{g/dl}$
1	39,6
2	23,7
3	33,6
4	48,9
5	40,6
6	33,6
7	29,8
8	36,4
9	46,6
10	43,7
11	31,6
12	22,1
13	24,1
Promedio $\pm$ DE	$34,95 \pm 8,72$

**Tabla 7:** Retinol sérico de las voluntarias del estudio

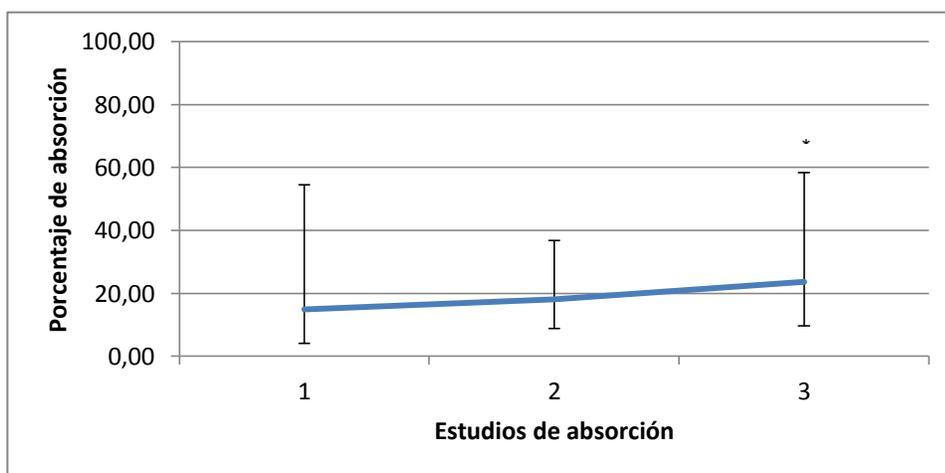
## V.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesis se asemejan a los encontrados por Walczyk et al. (76) en Europa, quienes investigan la influencia de la vitamina A en la absorción de hierro en adultos jóvenes que consumen comidas de prueba; pan de maíz con y sin vitamina A servidos con agua o café donde concluyen que la vitamina A no tiene ningún efecto en la absorción del hierro e inclusive determinan un efecto ligeramente negativo, por lo que no confirman los resultados previamente descritos por García-Casal (72), quien también a través de un desayuno en sujetos Venezolanos basado en tres cereales, (arroz, trigo y maíz), margarina y queso observa que en presencia de vitamina A aumenta la absorción del hierro hasta el doble para el arroz, 0,8 veces para el trigo y 1,4 veces para el maíz, mientras que el  $\beta$ -caroteno aumenta la absorción del hierro en más de tres veces para el arroz, 1,8 veces para el trigo y maíz, frente a estos resultados, la autora sugiere que tanto la vitamina A como el  $\beta$ -caroteno se unen al hierro liberado del proceso digestivo y actúan como un agente para ligar el hierro manteniéndolo soluble en el lumen intestinal y previniendo la inhibición de los polifenoles y fitatos sobre la absorción del hierro no hemínico (72,73).

A pesar de que ambos estudios (Walczyk y García-Casal en humanos; ref. 76,72) utilizaron los mismos procedimientos metodológicos, obtuvieron resultados contradictorios. Las diferencias entre ambos estudios podría estar dado por varios factores; en primer lugar los componentes de hierro fueron diferentes. Walczyk (76) utilizó sulfato ferroso y fumarato ferroso mientras que García Casal (72) solo utilizó fumarato ferroso; en segundo lugar, el tiempo en que fue adicionada la vitamina A al alimento fue diferente, en caso de García Casal (72) fue administrada previo a su preparación, donde el tratamiento térmico pudo haber generado degradación y alteración de la vitamina, mientras que Walczyk la administró posteriormente por lo que la relación molar de vitamina A y hierro no estaría alterada; en tercer lugar, ninguno de los dos estudios midió el retinol sérico previo a comenzar el estudio, sin embargo se presume que el grupo de estudio de Walczyk (76) no tendría deficiencia de vitamina A ya que consideró a una población de adultos jóvenes de nivel socioeconómico alto que vivían en Zürich y Gotemburgo, mientras que

el grupo de García Casal (72) estaba conformados por un grupo de nivel socioeconómico bajo los cuales podrían haber presentado deficiencia de la vitamina previo a comenzar el estudio.

Tanto el estudio de Walczyk (76) como de García Casal (72) entregaron los compuestos acompañados de un desayuno (marcado con isótopo radioactivo  $Fe^{55}$  y  $Fe^{59}$ ). Mientras que en esta tesis probamos los componentes con aceite de soya y a estómago vacío, donde se evidencia que el retinol palmitato no modificó biológicamente la absorción de hierro, pero el  $\beta$ -caroteno a dosis de 3,748 mg aumentó en 8,8% la absorción de hierro, diferencia que ANOVA no la distingue como estadísticamente significativa. Se destaca que la alta variabilidad en la absorción de hierro por efecto de retinol nos impidió encontrar diferencias. Al hacer el ejercicio comparando el control con ambas absorciones de  $\beta$ -caroteno (1,874 mg y 3,748 mg respectivamente), se observa una diferencia significativa, con un  $F= 3,66$  y  $P=0,04$  al aplicar ANOVA (Figura 5). El test pos hoc de Dunnett reveló la diferencia entre el control y 3,748 mg de  $\beta$ -caroteno  $P<0,05$ .



**Figura 5:** Efecto de el  $\beta$ -Caroteno sobre *biodisponibilidad de hierro no hemo*, ANOVA de una vía. Estudio 1:  $^{59}FeSO_4$  + aceite de soya; Estudio 2:  $^{59}FeSO_4$  + aceite de soya +1,874 mg  $\beta$ -caroteno; Estudio 3:  $^{55}FeSO_4$  + aceite de soya +3,748 mg  $\beta$ -caroteno. ANOVA para medias repetidas  $F= 3.66$ ,  $p=0.04$ , D.S

La evidencia existente hasta hoy indicaría que la deficiencia de vitamina A afectaría de manera indirecta al estado de nutrición del hierro provocando una redistribución del mismo más que un aumento de la absorción, no así cuando no existe deficiencia de vitamina A que es nuestro caso y posiblemente el del grupo de Walczyk (76). La literatura ha mostrado que en animales deficientes en vitamina A el hierro es retenido en el hígado y en el bazo, siendo menos disponible para la eritropoyesis, lo que sugiere como resultado una sobrecarga de hierro en algunos tejidos

(85,86). Debido a que metabolitos de la vitamina A son ligandos que regulan la transcripción de muchos genes hepáticos, es posible que el estado de la vitamina A podría modular la síntesis o catabolismo de proteínas implicadas en el almacenamiento de hierro hepático. Frente a deficiencia de vitamina A se sobre regulan los niveles de mRNA de ferritina y hepcidina, pero no se promueve cambios en la expresión de genes que participan en la absorción de hierro (87,88). Además, en los casos de deficiencia de vitamina A aumentaría la susceptibilidad a infecciones y se deterioraría la respuesta inmune (considerando que el ácido retinoico induciría la diferenciación de las células T promoviendo la respuesta antiinflamatoria del cuerpo) (87), aumentando la expresión de hepcidina y afectando nuevamente a la homeostasis de hierro.

Por lo tanto la vitamina A afectaría más a la movilización de hierro desde los tejidos, teniendo un efecto indirecto sobre la absorción de hierro no hemínico.

En esta tesis el  $\beta$ -caroteno no tuvo efecto estadístico significativo sobre la absorción del hierro pero sí tuvo un efecto biológico, 8,8% de diferencia en absorción de hierro. Un estudio reciente muestra que el  $\beta$ -caroteno reduce la IL8 de manera significativa y con ello también la ferritina, aumentando la expresión de ferroportina (89). Por su parte García Casal (73,75) muestra que el  $\beta$ -caroteno aumenta la absorción del Fe no-hemo posiblemente porque es capaz de solubilizar el hierro a pH 6 formando un complejo con hierro, lo cual podría estar explicado por cambios que genera en la solubilidad del hierro como resultado de la asociación del hierro con la molécula de carotenoides. Lo cual podría explicar los resultados obtenidos al comparar el control con la mayor dosis de  $\beta$ -caroteno entregada a las voluntarias (Figura 5).

Dentro de las fortalezas de este estudio encontramos que al ser cada sujeto control de sí mismo le da mayor validez a los resultados obtenidos. Además las mujeres comenzaron el estudio representando todo el ciclo menstrual (Anexo, Figura 6) por lo que se descarta su efecto sobre la absorción de hierro.

En cuanto a debilidades encontramos que es un estudio agudo, y además que los resultados presentaron una alta dispersión.

Se recomienda realizar estudio para evaluar el efecto de  $\beta$ -Caroteno como pro-vitamina A y otros carotenoides no provitamina A (Luteína, zeaxantina, licopeno) sobre la absorción de hierro no hemínico a concentraciones de 1000ER, 2000 ER y 4000 ER en mujeres en edad fértil e in vitro, para ayudar a solucionar la controversia existente, y evaluar si el efecto se obtiene en los carotenoides independiente de su capacidad de formar vitamina A.

## **CONCLUSIÓN**

Se rechaza parcialmente la hipótesis ya que tal como se planteó, la vitamina A como retinol palmitato no modificó la absorción del hierro no hemínico, pero  $\beta$ -caroteno (en cantidades equivalentes a 1000 y 2000 ER) tampoco lo hizo, siendo que se esperaba que este componente sí ejerciera modificaciones en la absorción del Fe no-hemo en mujeres en edad fértil.

## REFERENCIAS

1. WHO. Vitamin A deficiency and iodine deficiency disorders: prevalence estimates for the global burden of disease. Micronutrient Deficiency Information System (MDIS). Geneva: World Health Organization, 2001.
2. WHO/UNICEF/UNU. IDA: prevention, assessment and control. Report of a joint WHO/UNICEF/UNU consultation. Geneva: World Health Organization, 1998.
3. Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Aspect Med.* 2001;22:1-87
4. Finch CA, Huebers H. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med.* 1982; 306:1520-8.
5. OMS, FAO, UNICEF, GAIN, MI, & FFI. Recomendaciones sobre el enriquecimiento de la harina de trigo y de maíz. Informe de reunión: Declaración de consenso provisional. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2009
6. DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anaemia in the world. *World Health Stat Q.* 1985;38:302-16.
7. WHO/UNICEF/UNU. Iron Deficiency Anemia Assessment, Prevention, and Control. Geneva: World Health Organization; 2001
8. Olivares M, Pizarro F, Hertrampf E, Walter T, Arredondo M, Letelier A. Fortificación de alimentos con hierro en Chile. *Rev Chil Nutr.* 2000;27:340-344
9. Ríos-Castillo I, Brito A, Olivares M, López-de Romaña D, Pizarro F. Low prevalence of iron deficiency anemia between 1981 and 2010 in Chilean women of childbearing age. *Salud Publica Mex.* 2013;55:478-83.
10. Lira P, Foradori A, Grebe G, Vela P. Iron and folate deficiency in pregnant women at term. *Rev Med Chil.* 1984;112:127-31.
11. Mardones F, Rioseco A, Ocqueteau M, Urrutia MT, Javet L, Rojas I, Villarroel del L. Anemia in pregnant women from the community of Puente Alto, Chile. *Rev Med Chil.* 2003, 131: 520-5.
12. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:3579-83
13. Haidar AH. Prospective chemistry teachers' conceptions of the conservation of matter and related concepts. *J Res Sci Teach.* 1997;34:181-97.
14. Gaitán D, Manuel Olivares G, Miguel Arredondo O, F Pizarro A. Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev Chil Nutr.* 2006; 33: 142-148
15. Fairweather-Tait SJ. Iron. *J Nutr.* 2001;131:1383S-6S
16. Ramakrishnan U, Semba RD. Iron deficiency and anemia. In: Semba RD, Bloem MW Eds, *Nutrition and Health in Developing Countries*,. 2nd edition; Human press: Totowa, NJ; 2008:475-505
17. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014; 19: 164–174.
18. Roy CN, Enns CA. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood.* 2000;96:4020-7.
19. Beard JL, Dawson H, Pinero DJ. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr Rev.* 1996;54:295-317.
20. 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;52:335-55.
21. Flanagan PR. Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1989;361:21-30.
22. FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 13. Iron. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 1998.

23. Hallberg L. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr.* 1981;1:123-47.
24. Carpenter CE, Mahoney AW. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1992;31:333-67.
25. Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet.* 2007;370:511-20.
26. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 2005; 122:789–801.
27. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29:336-55.
28. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 2001;291:1755–59.
29. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997;388:482–88.
30. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1:191–200.
31. 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 USA.* 2002;99:4596-601.
32. McClung JP, Karl JP. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. *Nutr Rev.* 2009;67:100-4.
33. 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.* 2008;32:1098-104.
34. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, y cols. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306:2090-3.
35. Hallberg L, Hulthen L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1147-60.
36. Raja KB, Simpson RJ, Pippard MJ, Peters TJ. In vivo studies on the relationship between intestinal iron (Fe<sup>3+</sup>) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse. *Br J Haematol.* 1988;68:373-8.
37. Lynch SR. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr Rev.* 1997;55:102-10
38. Greenberg SM, Tucker RG, Heming AE, Mathues JK. Iron absorption and metabolism. Interrelationship of ascorbic acid and vitamin E. *J Nutr.* 1957; 63:19-31.
39. Conrad ME, Schade SG. Ascorbic acid chelates in iron absorption: a role for hydrochloric acid and bile. *Gastroenterology.* 1968;55:35-45.
40. Mulvihill B, Kirwan FM, Morrissey PA, Flynn A. Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron. *Int J Food Sci Nutr.* 1998;49:187-92
41. Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD. Soy protein, phytate, and iron-absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1992;56:573–8
42. Brune M, Rossander L, Hallberg L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur J Clin Nutr.* 1989;43:547-57.
43. Hallberg L et al. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:112–119.
44. Cook JD, Monsen ER. Food iron absorption in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. *Am J Clin Nutr.* 1976;29:859–67
45. WHO. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva, World Health Organization, 2009
46. Olivares M, Arredondo M, Pizarro F, Hierro. En: Gil A., ed. *Tratado de nutrición.* 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010:668-686

47. Bauernfeind, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* 1972;20:456–473.
48. Van Vliet T, Vanschaik F, Schreurs W.H.P, Van Den Berg H. In vitro measurement of beta-carotene cleavage activity: Methodological considerations and the effect of other carotenoids on beta-carotene cleavage. *Int J Vitam Nut Res.* 1996;66:77–85
49. McLaren DS, Kraemer K. Vitamin A in health. *World Rev Nutr Diet.* 2012;103:33-51.
50. Pemrick SM, Lucas DA, Grippo JF. The retinoid receptors. *Leukemia.* 1994;8:1797-806.
51. Reboul E. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients.* 2013;5:3563-81.
52. FAO/WHO. Report of a joint expert consultation. Chapter 2. Vitamin A. Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand; 1998.
53. Weber D, Grune T. The contribution of  $\beta$ -carotene to vitamin A supply of humans. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56:251-8.
54. Harrison, E.H. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:87–103.
55. Ong DE. Absorption of vitamin A. In: Blomhoff R, ed. *Vitamin A in health and disease.* New York, NY, Marcel Dekker, 1994:37–72.
56. Findlay G, MacKenzie R. The bone marrow in deficiency diseases. *J Pathol.* 1992;25:402-403.
57. Koessler K, Maurer S., Loughlin R. The relation of anemia, primary and secondary, to vitamin A deficiency. *JAMA.* 1926;87:476-482.
58. Blackfan K, Wolbach S. Vitamin A deficiency in infants. *J Pediatr.* 1933;3:679-706.
59. Wagner K. Die Experimentell Avitaminose A beim Menschen. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie.* 1940;246:153-189.
60. Hodges R, Sauberlich H, Canham J, Wallace D, Rucker R, Mejia L, Mohanram M. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr.* 1978;31:876-885
61. Mejia L, Arroyave G. The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *Am J Clin Nutr.* 1982;36:87-93.
62. Semba R, Muhilal, West K, Winget M, Natadisastra G, Scott A, Sommer A. Impact of vitamin A supplementation on hematological indicators of iron metabolism and protein status in children. *Nutr Res.* 1992;12:469-478.
63. Roodenburg AJ, West CE, Hovenier R, Beynen AC. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br J Nutr.* 1996;75:623-36.
64. Bloem MW, Wedel M, van Agtmaal EJ, Speek AJ, Saowakontha S, Schreurs WH. Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:76-9.
65. Beynen AC, Sijtsma KW, Van Den Berg GJ, Lemmens AG, West CE. Iron status in rats fed a purified diet without vitamin A. *Biol Trace Elem Res.* 1992;35:81-4.
66. Sijtsma KW, Van Den Berg GJ, Lemmens AG, West CE, Beynen AC. Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A. *Br J Nutr.* 1993;70(3):777-85.
67. Douer D, Koeffler HP. Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. *J Clin Invest.* 1982;69:1039-41.
68. Schroeder C, Gibson L, Zenke M, Beug H. Modulation of normal erythroid differentiation by the endogenous thyroid hormone and retinoic acid receptors: a possible target for v-erbA oncogene action. *Oncogene.* 1992;7:217-27.
69. Roodenburg AJ, West CE, Beynen AC. Does vitamin A deficiency affect erythropoiesis in rats? *Eur J Clin Nutr.* 1996;50:S84.
70. Thurnham DI. Vitamin A, iron, and haemopoiesis. *Lancet.* 1993;342:1312-3.

71. Layrisse M, García-Casal M, Solano L, Baron M, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets I, Tropper E. The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: preliminary results, *J. Nutr. Biochem.* 1997;8:61-67
72. Garcia-Casal MN, Layrisse M, Solano L, Baron MA, Arguello F, Llovera D, et al. Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J Nutr.* 1998;128:646-50
73. García-Casal MN, Leets I, Layrisse M. Beta-carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr.* 2000;130:5-9.
74. Garcia-Casal MN. Carotenoids increase iron absorption from cereal-based food in the human. *Nutr Res.* 2006;26:340-4.
75. García-Casal MN, Leets I. Carotenoids, but not vitamin A, improve iron uptake and ferritin synthesis by Caco-2 cells from ferrous fumarate and NaFe-EDTA. *J Food Sci.* 2014;79:706-12.
76. Walczyk T, Davidsson L, Rossander-Hulthen L, Hallberg L, Hurrel RF. No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:144-9.
77. Adams CL, Hambidge M, Raboy V, Dorsh J, Sian L, Westcott JL, et al. Zinc absorption from a low-phytic acid maize. *Am Clin Nutr.* 2002;76:556-59.
78. Hambidge K, Huffer J, Raboy V, Grunwald G, Westcott J, Sian L, et al. Zinc absorption from low-phytate hybrids of maize and their wild-type isohybrids. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:1053-59.
79. Gaitan G, Flores S, Saavedra P, Miranda C, Olivares M, Arredondo M et al. Calcium Does Not Inhibit the Absorption of 5 Milligrams of Non heme or Heme Iron at Doses Less Than 800 Milligrams in Non pregnant Women. *J Nutr.* 2011;141:1652–56.
80. Pizarro F, Olivares M, Hertrampf E, Nuñez S, Tapia M, Cori H, et al. Ascorbylpalmitate enhances iron bioavailability in iron-fortified bread. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:830-34.
81. Primer of biostatistics, 3.02. Glant SA (ed). McGraw-Hill Inc, 1992.
82. Fischer D, Price D. A simple serum iron method using the new sensitive chromogentripyridil-striazine. *Clin Chem.* 1964;10:21-31.
83. 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;17:391-7
84. Hosein F, Marsaglia G, Finch CA. Blood ferrokinetics in normal man. *J Clin Invest.* 1967;46:1–9.
85. Mehdad A, Siqueira EM, Arruda SF. Effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability. *Ann Nutr Metab.* 2010;57:35-9.
86. Zimmermann MB, Biebinger R, Rohner F, Dib A, Zeder C, Hurrell RF, Chaouki N. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:580-6
87. da Cunha MS, Siqueira EM, Trindade LS, Arruda SF. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. *J Nutr Biochem.* 2014;25:1035-44.
88. Citelli M, Bittencourt LL, da Silva SV, Pierucci AP, Pedrosa C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149:64-70.
89. Katz O, Reifen R, Lerner A.  $\beta$ -Carotene can reverse dysregulation of iron protein in an vitro model of inflammation. *Immunol Res.* 2015;61:70-8

## ANEXOS

### 1) CERTIFICADO DE ETICA



**COMITÉ DE ÉTICA**

**Acta de Aprobación N° 22**  
**Miércoles 14 de Octubre de 2015**

**Asisten:** Ana María Pino presidenta (Bioquímico, Prof. Asociado), Laura Leiva (Tecnólogo Médico, Prof. Adjunto), Gerardo Weisstaub (Médico Cirujano, Prof. Asistente), José Luis Valdés (Representante de la comunidad).

**Preside:** Prof. Ana María Pino Z.

**Proyecto:** "Efecto del retinol palmitato y  $\beta$ -caroteno sobre la biodisponibilidad de hierro no-hemínico en mujeres en edad fértil".

**Investigador:** Giannina Pomarolli R.

**Documentos revisados:** Proyecto, documento de consentimiento informado.

Se analiza el Proyecto a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, del Código de Núremberg y del Reglamento para comités de Ética de la Universidad de Chile.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto (Copia en archivo) y de los antecedentes aportados personalmente por la investigadora, el Comité de Ética, estima que el estudio no significa para los sujetos involucrados, riesgos físicos, psíquicos, social, legal o de otra naturaleza, propios de este tipo de investigación.

En la evaluación del proyecto el comité de ética del INTA consideró los siguientes fundamentos: 1- el valor social del proyecto corresponde al conocimiento científico sobre el efecto de vitamina A sobre la biodisponibilidad del hierro no hemínico en mujeres de 35 a 45 años. 2- El proyecto tiene validez científica, según se desprende del análisis del documento completo, incluyendo los antecedentes de los investigadores. 3- El estudio se hará en mujeres no embarazadas a quienes se les dará a beber soluciones con hierro usando como trazador los radioisótopos de hierro 55 y 59. 4- En el diseño no hay discriminación arbitraria de participantes. 5- Se estimó que el consentimiento informado expresa la información necesaria en un lenguaje claro, incluyendo la protección de los derechos de las personas al establecer la posibilidad de no participar y de contactar a este comité en caso de algún reclamo sobre el trato recibido. 6 - Los miembros del Comité no tienen ninguna relación con el patrocinante, ni con el investigador que pudiera ser motivo de conflicto de interés.

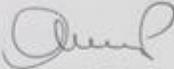
Red: 511.8000.8024, Mail: [comite@inta.uchile.cl](mailto:comite@inta.uchile.cl)  
Calle 736, Correo 11, Santiago Chile  
[www.inta.uchile.cl](http://www.inta.uchile.cl)

<small>■ Sección: Informaciones: (56) 2 2979 1409 División: (56) 2 2979 1411</small>	<small>Sección: (56) 2 2979 1401 Extensión: (56) 2 2979 1407 CD3967a: (56) 2 2979 1407</small>	<small>Asistencia Técnica: (56) 2 2979 1404 Contabilidad: (56) 2 2979 1410 Fax: (56) 2 2221 4734</small>
----------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

En virtud de tales consideraciones el Comité otorga la autorización correspondiente para la realización del estudio dentro de las especificaciones señaladas en el Proyecto de Investigación y en el consentimiento informado.

Cualquiera modificación del protocolo debe ser autorizada por este Comité. Una vez finalizado el estudio, el comité deberá ser informado de los resultados de éste.

Atentamente,



Ana María Pino Z.  
Presidenta



## 2) CONSENTIMIENTO INFORMADO

### **Consentimiento de participación en el Proyecto “Efecto del retinol palmitato y $\beta$ -caroteno sobre la biodisponibilidad de hierro no hemínico en mujeres en edad fértil”**

Investigadores: Prof. Fernando Pizarro, Tesista. Giannina Pomarolli.

#### **1. INFORMACION SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

##### **1.1. ¿Cuál es el propósito del estudio?**

La anemia por deficiencia de hierro y deficiencia de vitamina A afectan a más del 30% de la población global, siendo las mujeres en edad reproductiva, infantes y niños los grupos más vulnerables. El hierro es considerado un micronutriente esencial para la vida. La biodisponibilidad del mineral está en función de su forma química e interacción con otros componentes alimentarios, dentro de los cuales se encuentra la vitamina A. Esta vitamina está presente en los alimentos en diferentes formas; en alimentos de origen animal como ésteres de retinilo (principalmente retinol palmitato), y en frutas y verduras se presenta como carotenoides provitamina A (Principalmente  $\beta$ -caroteno). Estudios que evalúan el efecto que genera la vitamina A sobre la biodisponibilidad del hierro son contradictorios. En este estudio trataremos de aclarar este punto. Por lo tanto, lo invitamos a participar.

##### **1.2. ¿Quién puede participar en este estudio?**

Pueden participar mujeres sanas de entre 35 a 45 años con IMC  $<30$  kg/mt<sup>2</sup>, que no hayan recibido ningún suplemento mineral en los últimos 6 meses; que no estén embarazadas, ni programen embarazarse. Por tanto, estar con un método anticonceptivo (DIU, anticonceptivos orales o ligadura de trompas), y que no hayan recibido transfusiones de sangre en los últimos 4 meses.

##### **1.3. ¿Tengo necesariamente que participar en este estudio? ¿Si acepto participar, puedo cambiar de opinión o retirarme? ¿Si decido no participar en este estudio, que me puede suceder, o que otras opciones tengo si necesito tratamiento?**

Usted no tiene ninguna obligación de participar en el estudio. Si acepta participar puede retirarse en cualquier momento del estudio sin ningún perjuicio para usted. No participar en el estudio no tiene consecuencias para usted.

##### **1.4. ¿Si decido participar en el estudio, en qué consisten precisamente las evaluaciones, y que tipo de tratamientos o procedimientos me van a practicar?**

Usted será citado al INTA para participar en una charla donde se le explicará en detalle de que se trata el estudio. Si usted decide participar, deberá concurrir en ayunas al INTA durante 5 mañanas (días 1, 2, 14, 15 y 28 del estudio). Los días 1, 2, 14 y 15 usted recibirá líquidos que contienen 5 mg de hierro y; día 1 del estudio recibirá 2 ml de aceite de soya; el día 2 del estudio recibirá 1,832 mg de retinol palmitato disuelto en 2 ml de aceite de soya; el día 14 del estudio recibirá 1,874 mg de  $\beta$ -caroteno disuelto en 2 ml de aceite de soya; y el día 15 del estudio recibirá 3,748 mg de  $\beta$ -caroteno disuelto en 2 ml de aceite de soya. El hierro será marcado con una pequeña cantidad de marca radioactiva. Después de recibido el hierro usted deberá permanecer 3 horas sin recibir ningún alimento. En dos oportunidades se les extraerá una muestra de sangre de una vena del brazo: una de 30 ml (2 cucharadas soperas), el día 14 del estudio para medir la absorción de hierro y para saber su nutrición de hierro y el día 28 del estudio una muestra de 20 ml (2 cucharadas de postre) para medir la absorción de hierro.

##### **¿Qué peligros podría experimentar en este estudio, y que harán los investigadores para reducir el riesgo de que éstos se presenten?**

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 si están utilizando algún método anticonceptivo y 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

podiera aparecer en algún caso un moretón lo que se tratará de evitar haciendo que quién le tome la muestra sea un Tecnólogo Médico de mucha experiencia en tomar muestras de sangre.

**1.5. ¿Qué harán los investigadores para asegurar que la información que recolectarán sobre mí, no caerá en manos equivocadas?**

Usted será identificado con un código, siendo su identidad sólo conocida por el investigador responsable del proyecto. En la comunicación de los resultados no figurará su identidad.

**1.6. ¿Qué beneficios personales puedo yo esperar al participar en 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. Los resultados de los exámenes se entregaran en 30 días

**1.7. ¿Recibiré algún pago por participar en este estudio?**

Usted recibirá un aporte de \$70.000 (setenta mil pesos) al final del estudio como compensación por el tiempo ocupado.

**1.8. ¿Se cobrará a mí, a mi Isapre o FONASA el costo de algunos de estos estudios?**

Este estudio no tiene ningún costo para usted o su sistema de salud.

**1.9. ¿Una vez que yo haya ingresado como sujeto de estudio, a quien tendría que dirigirme para averiguar más acerca del estudio o para hacer llegar algún reclamo respecto al trato que hubiese recibido?**

Usted se podrá dirigir a profesor Fernando Pizarro (fono 9781522) en INTA, El Libano 5542, Macul  
**Cualquier reclamo sobre el trato recibido lo puede hacer a la Presidenta del Comité de Ética del INTA, Profesora Ana María Pino, fono 9781418.**

**2. DOCUMENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

**2.1. ¿Después que firme el documento, quien lo guardará?**

El investigador responsable del proyecto y se le entregará una copia a usted

**. Declaro haber leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto y deseo participar en él.**

Nombre del participante :                      Firma:

Fecha:

**2.2. Declaración del investigador**

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna. He sido testigo que el sujeto firmó el documento.

Nombre del Investigador

Firma:

Fecha:

### 3) CUESTIONARIO FRECUENCIA DE CONSUMO MODIFICADA

Efecto del retinol palmitato y B-caroteno sobre la biodisponibilidad de hierro no hemínico en humanos

2015

Nombre \_\_\_\_\_

Alimento	Frecuencia	Medida casera	Gramaje	Observaciones
<b>Legumbres</b>				
Arvejas (chícharos)				
Porotos				
Garbanzos				
Habas				
Poroto verde (verdura)				
Lentejas				
Soya				
<b>Frutos Secos</b>				
Almendras				
Maní				
Nuez				
<b>Cereales</b>				
Cereales de desayuno				
Galletas (soda, dulces, etc)				
Avena				
Pan				
Pan integral				
Arroz (integral/blanco)				
Fideos (integral/blanco)				
Papa				
Choclo				
Chuño				
<b>Lácteos</b>				
Leche				
Yogurt				
Queso/Quesillo				
<b>Otros</b>				

Té				
Café				
Chocolate (cocoa)				
Hierbas/Especies				
<b>Alimento</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Medida casera</b>	<b>Gramaje</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Origen animal</b>				
Carne vacuno				
Pollo				
Pescado (conserva,fresco)				
Mariscos (choritos, ostra, almejas, piure, machas)				
Huevo				
Cerdo				
Vísceras (hígado, riñón, corazón)				
Procesadas (Jamón, mortadela, longaniza, vienesa, salame)				
<b>Verduras</b>				
Brócoli (cocido)				
Brucelas				
Coliflor (cocida)				
Espinaca*				
Lechuga				
Pimentón				
Rábano				
Repollo				
Tomate				
Zanahoria				
Porotos verdes				
Betarraga (cocida)				
Acelga				
Pimentón rojo				

Palta				
<b>Frutas</b>				
Frutilla				
Granada				
Kiwi				
Mandarina				
Melón				
Moras				
Naranja				
Pomelo				
Uva *				
Manzana				
Damasco				
Membrillo				
Ciruelas				
<b>Aceites y grasas</b>				
Mantequilla				
Margarina				
Crema ácida o chantilly				
Aceites (Oliva, maravilla, soya, canola, etc)				
Paté				

4) FIGURA 6

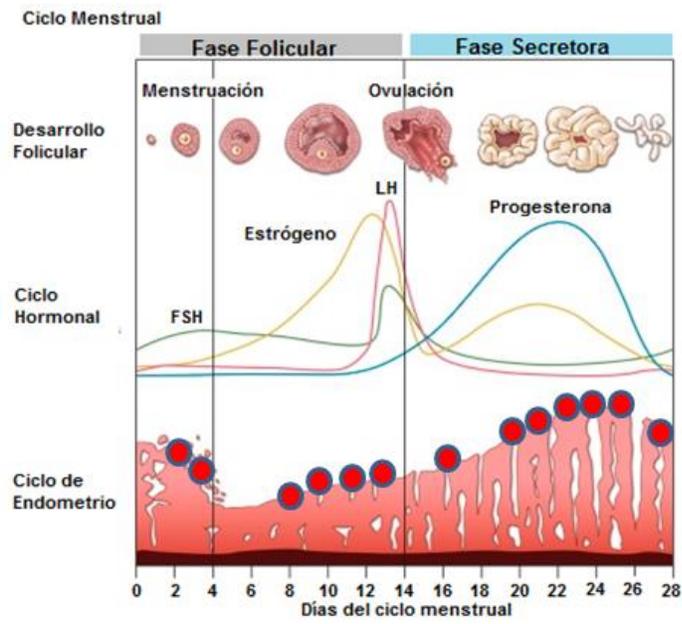


Figura 6: Etapa del ciclo menstrual de los sujetos al inicio del estudio