



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DEL CONSUMO DE LECHE FORTIFICADA CON
VITAMINA A SOBRE EL RETINOL SÉRICO, LA RESERVA
CORPORAL TOTAL Y LA RESERVA HEPÁTICA DE
VITAMINA A EN PREESCOLARES**

Por:

VERÓNICA LÓPEZ TEROS

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Experimental de la Coordinación de Nutrición, en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección del Dr. Humberto Astiazarán García; con financiamiento de la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA) a través del proyecto No. 15198.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.


La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

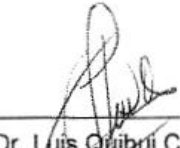
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Verónica López Teros, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.




Dr. Humberto Astiazarán García

Director de Tesis



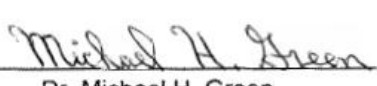
Dr. Luis Quihui Cota

Asesor



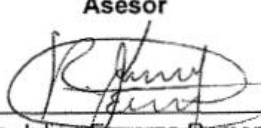
Dr. Mauro E. Valencia Juillerat

Asesor



Dr. Michael H. Green

Asesor



Dr. Julian Esparza Romero

Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca-crédito que se me otorgó para continuar con mi formación profesional.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por abrirme nuevamente sus puertas y por las facilidades otorgadas durante la realización de este trabajo.

A la Agencia Internacional de Energía Atómica por el financiamiento al presente proyecto a través del contrato No. 15198.

A la Secretaría de Educación y Cultura, particularmente al Dr. José Romeo Planagumá Paredes de la Coordinación General de Salud y Seguridad Escolar de la Subsecretaría de Educación Básica, por conceder el permiso para realizar este estudio.

A los niños, padres y personal docente del preescolar Tomás Grijalva Dávila y del Jardín de Niños Nueva Creación, quienes colaboraron con nosotros para concretar este proyecto.

Al Dr. Humberto Astiazarán García por apostar en contra de las probabilidades, por compartir su experiencia y por brindarme su confianza y amistad.

Al Dr. Luis Quihui Cota por su apoyo en la realización del estudio y por las facilidades otorgadas para el análisis de muestras.

Al Dr. Harold Furr por su comentario oportuno y ser guía para las nuevas generaciones interesadas en el metabolismo de vitamina A.

Al Dr. Michael H. Green por su enseñanza en el modelado matemático en nutrición empleando el análisis por compartimentos, con lo cual amplió mi visión para la evaluación del metabolismo de vitamina A.

A la Dra. Guangwen Tang por abrir las puertas de su laboratorio y por compartir sus conocimientos en el análisis de isótopos estables de vitamina A.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca por abrir las puertas de su laboratorio y por su apoyo académico.

A la Q.B. Bertha I. Pacheco Moreno por su apoyo incondicional e intensivo en el trabajo de campo y en el análisis de las muestras, pero sobre todo por su amistad.

A la Q.B. María de los Ángeles Gutiérrez y Q.B. María Elena Duarte por su arduo trabajo en campo; ustedes fueron parte clave para la realización de este proyecto.

Al M. en C. Orlando Tortoledo Ortiz por su asistencia en la toma y análisis de las muestras de sangre de los preescolares y por su apoyo en el HPLC.

A la M. en C. Lucila Rascón Durán por su apoyo en la toma de muestras de sangre, lo cual siempre implicó trabajo extra.

Al Q.B. José René Valenzuela, Q.B. Ana Cristina Gallegos, Q.B. Diana Mendoza, por su apoyo en el trabajo de campo y de laboratorio.

Al Dr. Julián Esparza Romero por su enseñanza, siempre consistió en un reto.

Al Dr. Mauro E. Valencia Juillerat por enriquecer este trabajo y por la confianza depositada en mí.

Al personal de biblioteca y cómputo por su ayuda en la búsqueda de información y para solucionar problemas técnicos.

A todos aquellos que aportaron nuevas perspectivas en el desarrollo del presente proyecto y que estuvieron conmigo durante el proceso de investigación.

DEDICATORIA

La formación académica es una decisión personal, sin embargo es gracias al apoyo incondicional de mi familia que pude culminar este proyecto de vida. Sin ustedes yo no podría ser lo que soy, los amo...

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras	IX
Lista de Tablas	X
Resumen.....	XI
Abstract.....	XIII
Sinopsis.....	1
Capítulo I. Vitamina A: Desde Su Descubrimiento y Propiedades Químicas Hasta los Avances en las Metodologías Para Su Determinación.	9
Capítulo II. Patrones Y Componentes Alimentarios Y Su Asociación Con Indicadores Antropométricos En Preescolares De Hermosillo, Sonora.....	27
Capítulo III. Vitamin A-Fortified Milk Increases Total Body Vitamin A Stores In Mexican Preschoolers.	50
Apéndice Metodológico	76

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura del retinol	12
2. Distribución del consumo promedio de energía por comida.	49
3. Study protocol for the determination of total body vitamin A stores in Mexican preschool age children.....	74
4. Schematic flow of the participants in the study.	75
5. Protocolo completo para evaluar la reserva corporal de vitamina A en preescolares.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Consumos promedio de nutrimentos, así como porcentajes de inadecuación en los preescolares participantes.....	47
2. Menús típicos para los menores preescolares.	48
3. Características antropométricas de los preescolares participantes (n=57). 49	
4. Correlación entre el consumo dietario de energía y macronutrimentos con el puntaje Z talla para la edad.	49
6. Changes in vitamin A-related variables for intervention (n=11) and control (n=13) group of Mexican preschoolers who completed the 3-month-study	71
7. Changes in serum pro-vitamin A carotenoids concentrations for intervention (n=11) and control (n=13) group of Mexican preschoolers who completed the 3 month study with or without daily vitamin A-fortified milk intake.....	72
8. Calculated daily nutrient intakes for subjects who completed the study.....	73

RESUMEN

La deficiencia de vitamina A (DVA) es uno de los principales problemas nutrimentales en los países emergentes, incluyendo América Central. En México, la leche es un alimento ampliamente aceptado, por lo cual se utiliza como vehículo para la administración de micronutrientes, entre los que se encuentra la vitamina A (VA). Algunos programas de asistencia alimentaria proporcionan leche fortificada a sectores de la población en riesgo como los menores en edad preescolar. Por lo anterior, es de interés evaluar el efecto del consumo de ésta leche sobre la distribución corporal de vitamina A en los preescolares. Se realizó un ensayo clínico aleatorizado y controlado para investigar la eficacia del consumo diario de 250 mL de leche fortificada con VA (la cual proporcionó 196 equivalentes de retinol/día) por 3 meses sobre la reserva corporal total de VA en preescolares con deficiencia marginal de VA quienes no eran beneficiarios de programas de asistencia social alimentaria. Veintisiete menores con deficiencia marginal de VA (retinol sérico 0.35 - 1.05 $\mu\text{mol/L}$), se asignaron aleatoriamente al grupo de intervención ($n=14$) o al grupo control ($n=13$) con base en determinaciones bioquímicas, antropométricas y dietarias del proceso de selección. El 89% de los menores ($n=24$) completó el protocolo del estudio. Se estimó la concentración de la reserva corporal total de VA (RCVA) empleando la técnica de dilución isotópica con vitamina A marcada con deuterio antes y después de la intervención. Después de los 3 meses, los cambios en la mediana de la concentración sérica de retinol para el grupo de intervención y control fueron 0.13 $\mu\text{mol/L}$ vs -0.21 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente ($P=0.009$). Los cambios en la mediana de la RCVA fueron 0.06 mmol vs 0.01 mmol, respectivamente ($P=0.006$). Los cambios en la mediana de la concentración hepática de VA fueron 0.09 $\mu\text{mol/g}$ de hígado vs 0.01 $\mu\text{mol/g}$ de

hígado, respectivamente ($P=0.002$). El consumo dietario de vitamina A presentó una correlación positiva y significativa con la RCVA ($r = 0.49$; $P=0.018$) y las principales fuentes dietarias fueron mango, zanahoria, leche, huevos y cereales fortificados. Los prescolares participantes aceptaron la leche fortificada con vitamina A y su consumo diario por 3 meses incrementó significativamente la reserva corporal total de vitamina A, la reserva hepática y la concentración sérica de retinol, lo cual indica que puede ser un medio efectivo para reducir la deficiencia de vitamina A en menores en edad preescolar.

ABSTRACT

Vitamin A deficiency (VAD) continues to be a major nutritional problem in developing countries, including Central America. In Mexico, milk is a well accepted vehicle for the administration of micronutrients, including vitamin A (VA), to preschoolers. Thus, we conducted a randomized, controlled clinical trial to investigate the effectiveness of daily consumption of 250 mL of VA-fortified milk (which provided 196 retinol equivalents/d) for 12 weeks on VA stores in marginal VAD preschoolers who were not enrolled in a food assistance program. Twenty-seven marginal VAD children were randomly assigned based on screening measurements (biochemical, anthropometric and dietary data) to either the intervention (n=14) or control group (n=13). Eighty nine percent (n=24) completed the study. Total body VA (TBVA) pool size was estimated using the deuterated retinol dilution technique (DRD) before and after the intervention. After 3 months, median changes in serum retinol concentration for the intervention and control group were 0.13 $\mu\text{mol/L}$ vs. -0.21 $\mu\text{mol/L}$, respectively ($P=0.009$), Median changes in TBVA stores were 0.06 mmol vs. 0.01 mmol, respectively ($P=0.006$). Estimated median changes in liver VA concentration were 0.09 $\mu\text{mol/g}$ vs. 0.01 $\mu\text{mol/g}$ ($P=0.002$), respectively. Vitamin A dietary intake had a significant and positive association with TBVA stores ($r = 0.49$; $P=0.018$) and main vitamin A dietary sources were mangoes, carrots (raw and cooked), egg, milk and fortified cereals. The vitamin A-fortified milk was well accepted among preschoolers and significantly increased total body VA stores, liver VA stores and serum retinol concentration indicating that it may be an effective means to ameliorate VAD in young Mexican children.

SINOPSIS

Dentro de las principales deficiencias nutrimentales que prevalecen hoy en día en los países emergentes, encontramos la deficiencia de vitamina A (DVA). El más reciente reporte de la Organización Mundial de la Salud (2009), sobre la situación mundial de la prevalencia de deficiencia de vitamina A, muestra que en México la DVA subclínica es un problema de salud pública severo (>20%) en los menores en edad preescolar (WHO, 2009). Precisamente éste grupo es el más vulnerable a las deficiencias de micronutrientes y con altas tasas de enfermedades infecciosas (West, 2002).

Desafortunadamente, la única información disponible para México sobre el estado de vitamina A de la población, es la publicada en 2001 por la Encuesta Nacional de Nutrición 1999, donde la prevalencia de DVA subclínica en niños de 1 a 8 años fue del 25 % (retinol sérico 0.35-0.7 $\mu\text{mol/L}$)(Rivera et al., 2001).

Debido a que la DVA es multifactorial, y el consumo dietario no es el único condicionante para la presencia de la deficiencia, se plantean tres estrategias principales para su combate en los países emergentes: la diversificación dietaria, la suplementación con megadosis de vitamina A y la fortificación de alimentos (Bloem et al., 2002), estrategias que a su vez se recomienda estén ligadas a otros programas de salud pública como la administración de tratamiento antiparasitario (Astiazarán et al., 2010; Quihui et al., 2008; Tanumihardjo et al., 1996). Aunque la diversificación dietaria es la opción de elección, es la más difícil de implementar. Al igual que la mayor parte de América Central, en México la dieta se basa en una combinación de cereales y leguminosas, pero además en la región noroeste del país (sitio donde se desarrolló el presente estudio), los alimentos de origen animal (res, huevo y

leche) son parte importante de la dieta y el consumo de frutas y vegetales es muy bajo comparado con el resto del país (Valencia et al., 1998). La suplementación con megadosis de vitamina A ofrece una mejoría más rápida sobre el estado de vitamina A y en México se ha administrado desde 1993 a niños de 6 meses a 4 años (60 mg)(SSA, 2009), pero a pesar de ofrecer un efecto inmediato, éste es limitado (Robles et al., 1998). Más aún, datos publicados por la UNICEF en 2009, muestran que para México no existen datos sobre la cobertura de la suplementación en preescolares. Otra estrategia que promete resultados con un efecto más duradero, es la fortificación de los alimentos (Olson, 1987). En México, el programa nacional de desayunos escolares provee una fuente alternativa de micronutrientes (hierro, zinc y vitamina A) a través de la fortificación de alimentos y en niños beneficiarios en el estado de Sonora ha demostrado ser efectivo en reducir la prevalencia de deficiencia de hierro y zinc pero no de vitamina A (González, 2005). Desafortunadamente, este programa no es de carácter obligatorio en los planteles escolares de Sonora y depende además de la voluntad de participación de los padres y las autoridades escolares. En México, Liconsa ha distribuido leche fortificada con micronutrientes desde 2001, a aquellas familias cuyo estado nutricional se encuentre comprometido debido a un bajo nivel socioeconómico o a un acceso limitado a alimentos. El consumo de leche fortificada Liconsa, a través de información recabada en encuestas se ha asociado estadísticamente con una reducción en la prevalencia de anemia en niños Mexicanos, sin embargo se desconoce su impacto sobre el estado de vitamina A en preescolares (Villalpando et al., 2009).

Por otra parte, para la evaluación del estado de vitamina A frente a una intervención, metodológicamente se sugiere el uso de las pruebas de dosis respuesta (relative dose response y modified relative dose response) cuando se desea observar un efecto cualitativo sobre la reserva hepática de vitamina A (Tanumihardjo, 2004). Sin embargo, cuando se desea cuantificar el efecto de la intervención sobre la reserva total de vitamina A la técnica de dilución isotópica (TDI) es la única evaluación indirecta que proporciona esta información

(Tanumihardjo, 2004). La TDI se puede emplear para evaluar la eficacia o efectividad de programas de intervención ya que responde a la suplementación o a cambios dietarios con vitamina A (VATTF, 2004).

Considerando lo anterior, se planteó la evaluación del efecto del consumo diario de leche fortificada con vitamina A (Liconsa), durante tres meses sobre la distribución corporal total de vitamina A en preescolares. La hipótesis primaria del estudio fue que la concentración sérica de retinol, la reserva corporal total y la reserva hepática de vitamina A mejorarían en el grupo de intervención con respecto del grupo control, después de tres meses de consumo diario de 250 mL de leche fortificada con vitamina A. Sin embargo, para hacer la selección de los participantes en el proyecto fue necesario plantear una hipótesis secundaria, la cual establecía que en los menores existía una asociación entre su ingestión dietaria y su desarrollo físico (evaluado con indicadores antropométricos); lo anterior con la finalidad de evaluar el estado nutricional de los preescolares y posteriormente en aquellos que cumplieron los criterios de participación, evaluar el efecto del consumo de leche fortificada sobre el estado de vitamina A.

En el capítulo 1 se presenta el desarrollo en las técnicas para el análisis de vitamina A desde su descubrimiento, haciendo uso de sus propiedades fisicoquímicas. Posteriormente, empleando el papel fisiológico de la vitamina A se abordan dos metodologías que revolucionaron la evaluación del estado de vitamina A: las pruebas de dosis respuesta y la técnica de dilución isotópica. Así, el avance en la bioquímica nutricional siempre dependerá del progreso en el análisis de los nutrientes de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y a su función biológica.

El capítulo 2 presenta la evaluación del estado nutricional de menores en edad preescolar con base en parámetros dietarios y su asociación con indicadores antropométricos. Como se mencionó anteriormente, esta información es relevante para conocer de forma integral el estado nutricional de una muestra de menores en edad preescolar a partir de la cual se seleccionaron los sujetos que participaron en el ensayo clínico aleatorizado

para evaluar el efecto del consumo de leche fortificada sobre las reservas de vitamina A (hipótesis primaria).

Participaron 57 preescolares, los cuales completaron 3 encuestas dietarias y a partir de su peso, talla y edad se calcularon los indicadores antropométricos. La información dietaria mostró que el 63% de los preescolares presentó un consumo inadecuado de energía, sin embargo, la distribución de la energía a partir de carbohidratos, grasa y proteína se encontró dentro del intervalo aceptable para estos aportadores. El consumo de energía y macronutrientes se asoció significativamente con el puntaje Z talla para la edad, el cual por su naturaleza crónica nos indica que en los menores evaluados las deficiencias nutrimentales han estado presentes a lo largo de su desarrollo. No se encontró asociación entre el consumo de energía y macronutrientes con los puntajes Z peso para la edad, peso para la talla e índice de masa corporal para la edad en los preescolares participantes. En los menores evaluados, estadísticamente el consumo de grasas resultó ser factor de protección contra la aparición de desmedro. Si bien el desmedro no puede corregirse, es importante considerar estas recomendaciones para poblaciones que se desarrollan en condiciones similares a los participantes del presente estudio.

Además de los macronutrientes dietarios, los resultados mostraron que se debe reforzar el consumo de frutas y vegetales para garantizar el aporte adecuado de micronutrientes y fibra en los preescolares. Asimismo, el consumo de grasas resultó un factor de protección contra el desmedro en nuestra población por lo cual se recomienda incrementar su ingestión dietaria, sin embargo la estrategia a seguir es educar a los padres o responsables de la preparación de los alimentos de los niños sobre la elección de la grasa dietaria (ácidos grasos poli-insaturados, omega 3 y 6) para prevenir el desmedro y a su vez no contribuir al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Por lo anterior, se requieren estrategias de educación nutrimental desde las etapas tempranas del desarrollo a fin de promover buenos hábitos alimentarios en el futuro cercano.

La información obtenida al contrastar la hipótesis secundaria, permitió caracterizar la dieta típica de los preescolares participantes, así como evaluar el aporte de energía, macro y micronutrientes en la misma. La asociación entre la ingestión dietaria y el desarrollo físico de los menores, únicamente se estableció entre el consumo de energía y macronutrientes con el puntaje Z talla para la edad, el cual es un marcador de desnutrición crónica. Los indicadores antropométricos obtenidos en este sub-estudio se emplearon como variables en la aleatorización de los sujetos que cumplieron con los criterios de participación en el proyecto para contrastar la hipótesis primaria.

El capítulo 3 muestra los resultados de la evaluación del efecto del consumo de leche fortificada con vitamina A durante 3 meses, sobre la distribución de la misma en los preescolares participantes. La hipótesis primaria se evaluó mediante un ensayo clínico aleatorizado y controlado que incluyó 27 preescolares (3-6 años) con deficiencia subclínica de vitamina A (retinol sérico $0.35 < \text{retinol sérico} < 1.05 \mu\text{mol/L}$) y estado nutricional adecuado de acuerdo a los indicadores antropométricos (puntaje Z peso/talla, talla/edad, peso/edad e índice de masa corporal para la edad).

Los participantes que cumplieron con los criterios de selección se asignaron aleatoriamente al grupo de intervención o al grupo control y se evaluó su estado de vitamina A empleando la técnica de dilución isotópica con retinol marcado con deuterio. Un total de 24 (89%) sujetos concluyeron los 3 meses del estudio, las tres bajas ocurrieron en el grupo de intervención y no fue posible dar seguimiento a estos menores. Lo anterior es una de las limitaciones del presente trabajo, así como la carencia de un formato para evaluar el apego de los preescolares en el grupo de intervención al tratamiento, ya que este únicamente se realizó de forma cualitativa al preguntar al responsable del menor si éste había o no consumido la ración semanal de leche fortificada con vitamina A.

Al finalizar el estudio, los cambios en la mediana de la reserva corporal total de vitamina A fueron 0.06 mmol vs. 0.01 mmol, para el grupo de intervención y grupo control respectivamente ($P=0.006$). Además, gracias al

diseño del estudio fue posible observar un incremento significativo en la mediana del retinol sérico para el grupo de intervención con respecto del grupo control (0.13 $\mu\text{mol/L}$ vs. -0.21 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente)($P=0.009$). Los cambios en la reserva hepática también fueron significativos, la mediana incrementó 0.09 μmol de vitamina A/g de hígado en el grupo de intervención vs. 0.01 $\mu\text{mol/g}$ en el grupo control ($P=0.002$). Lo anterior se traduce en una diferencia de 0.08 $\mu\text{mol/g}$ a favor del grupo de intervención.

La intervención con leche fortificada proporcionó un total de 17.6 mg de vitamina A y el incremento neto de vitamina A en hígado para el grupo de intervención fue de 12.4 mg, lo cual indica que el 70% de la vitamina A proporcionada durante el estudio se almacenó y se retuvo efectivamente en el hígado de los preescolares participantes.

La leche fortificada con vitamina A fue un vehículo bien aceptado por los preescolares participantes y aumentó significativamente la reserva corporal total de vitamina A, la reserva hepática y la concentración de retinol sérico, lo cual indica que puede ser un medio efectivo para reducir la prevalencia de deficiencia de vitamina A en niños Mexicanos.

REFERENCIAS

- Astiazaran-García H, López-Teros V, Valencia-Juillerat M, Vázquez-Ortiz F, Sotelo-Cruz N, Quihui-Cota L. *Giardia lamblia* infection and its implications for vitamin A liver stores in school children. *Ann Nutr Metab.* 2010; 57:228-33
- Bloem M, Kiess L, Moench-Pfanner R. Process indicators for monitoring and evaluating vitamin A programs. *J Nutr.* 2002; 132:2934S-9S
- González D. Impacto del programa de desayunos escolares modalidad caliente sobre el estado de nutrición de micronutrientes y composición corporal en niños de Sonora. Hermosillo, Sonora. Tesis del Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A. C. 2005.
- Olson J. Should RDA values be tailored to meet the needs of their users? *J Nutr.* 1987; 117:220-2
- Quihui-Cota L, Astiazaran-García H, Valencia M, Morales-Figueroa G, López-Mata M, Vázquez-Ortiz F. Impact of *Giardia intestinalis* on vitamin A status in schoolchildren from northwest Mexico. *Int J Vitam Nutr Res.* 2008; 78:51-56
- Rivera J, Shamah T, Villalpando S, González de Cossío T, Hernández B, Sepúlveda J. Encuesta nacional de nutrición estado nutricional de niños y mujeres en México 1999. Instituto Nacional de Salud Pública. 2001.
- Robles A, Astiazaran H, Dávalos N, Quihui L, Cabrera P, Valencia M. Efecto de la suplementación masiva de vitamina A en niños de 6 a 36 meses de edad. *Sal Pub Mex.* 1998; 40:309-15
- SSA. Secretaría de Salud. Lineamientos para la suplementación con hierro y vitamina A en recién nacidos, niños y adolescentes. Mexico. 2009.
- Tanumihardjo S, Permaesih D, Muherdiyantiningsih, Rustan E, Rusmil K, Fatah A, Wilbur S, Muhilal, Karyadi D, Olson J. Vitamin A status of Indonesian children infected with *Ascaris lumbricoides* after dosing with vitamin A supplements and albendazole. *J Nutr.* 1996; 126:451-7

- Tanumihardjo S. Assessing vitamin A status: past, present and future. *J Nutr.* 2004;134:290S-3S
- UNICEF. The state of the world's children special edition. Celebrating 20 years of the convention on the rights of the child. Statistical tables. 2009.
- Valencia M, Hoyos C, Ballesteros M, Ortega M, Palacios M, Atondo J. La dieta en Sonora: canasta de consumo de alimentos. *Estudios Sociales.* 1998; 8:12-39
- VATTF. Vitamin A Tracer Task Force. Appropriate uses of vitamin A tracer (stable isotope) methodology. ILSI. 2004
- Villalpando S, Shamah T, García A, Mundo V, Domínguez C, Mejía F. The prevalence of anemia decreased in Mexican preschool and school-age children from 1999 to 2006. *Sal Pub Mex.* 2009; 51:S507-14
- West K. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *J Nutr.* 2002;132:2857S-66.
- 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.

CAPÍTULO I

Vitamina A: desde su descubrimiento y propiedades químicas hasta los avances en las metodologías para su determinación.

INTRODUCCIÓN

En un principio, observaciones empíricas realizadas por egipcios y griegos plantearon la relación entre un padecimiento y la nutrición, ya que se reconocía que el consumo de hígado de animales era un buen remedio para la ceguera nocturna (Wolf, 2001). Posteriormente, se asoció la resequedad de la córnea y conjuntiva (xeroftalmia) y en casos severos ulceración de la córnea (queratomalacia) con un “nutrimento defectuoso” (Wolf, 2002). En 1893, fue Bitot quien notó la relación entre la ceguera nocturna y puntos espumosos en la córnea formados por el desprendimiento de células epiteliales queratinizadas (Wolf, 2002).

Uno de los trabajos más importantes relacionado con estas condiciones, se publicó por Masamichi Mori en Japón acerca de 1500 casos de la enfermedad conocida como “hikan”. En éste trabajo se reconoció que dicha enfermedad era idéntica a la ceguera nocturna y xeroftalmia que se observó en América, donde algunos casos progresaron a queratomalacia e incluso ceguera, como algunos de sus casos. Además, describió las dietas de los niños como carentes de grasa y más aún, observó que el aceite de bacalao fue el tratamiento más efectivo y que el aceite de oliva no mostró efecto alguno. A pesar del conocimiento existente del valor del hígado animal y del aceite de hígado de bacalao en el tratamiento de la ceguera nocturna, algunos libros de texto aún no lo recomendaban (Carpenter, 2003).

Sin embargo, a pesar de que la relación entre nutrición y enfermedad ocular era clínicamente evidente, fue a partir del descubrimiento de la vitamina A en 1912 por McCollum, que se reconoció que ésta tenía una participación activa. McCollum la denominó “factor liposoluble A” (Rider, 1970). Como dato adicional, cabe resaltar que después de su descubrimiento, los autores hacían referencia a la vitamina A como un factor promotor de crecimiento (Rosenheim y Drummond, 1925).

A pesar del descubrimiento de la vitamina A, pasó mucho tiempo para lograr su purificación. Uno de los primeros esfuerzos realizados para obtener un concentrado de vitamina A, fue el realizado por el grupo de Takahashi (citado en Drummond y Baker, 1929), quienes aseguraron haber logrado la purificación de la vitamina A, a partir de aceite de hígado de bacalao en una sustancia que denominaron “biosterina”. Sin embargo en estudios posteriores realizados por Drummond y Baker, 1929 se demostró que la “biosterina” era una mezcla compleja que además de vitamina A, posiblemente contenía otros alcoholes y cadenas hidrocarbonadas del tipo del escualeno.

A principios del siglo XX, el aislamiento de la vitamina A era una meta para diversos grupos de trabajo. En 1932, la revista Nature publicó los avances realizados por Karrer y colaboradores (1931) quienes argumentaron la purificación de la vitamina A partiendo de la fracción no-saponificable del aceite de pescado y lo describieron como un alcohol con fórmula $C_{20}H_{30}O$ ó $C_{22}H_{32}O$ y lo mismo fue descrito posteriormente por Drummond y colaboradores (1932). Los esfuerzos eran notables, pero el grado de purificación era sólo cercano al 90%. La purificación del retinol fue aceptada hasta 1937, cuando Holmes y Corbet realizaron una separación por congelación y obtuvieron la vitamina A cristalizada (Holmes y Corbet 1937).

En un principio, la determinación de vitamina A se realizó de forma cualitativa al asociar el desarrollo de color del aceite de hígado, con ácidos de Lewis. Sin embargo, una vez purificada la vitamina A, el desarrollo de las metodologías se basó en sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se describen brevemente a continuación.

PROPIEDADES DEL RETINOL

La vitamina A es un compuesto liposoluble y su compuesto principal es el retinol, el cual está conformado por 4 unidades isoprenoides ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$), un anillo ciclohexenilo tetrametilado, una cadena lateral tetraeno y un grupo funcional polar carbono-oxígeno (**Figura 1**)(Barua y Furr, 1998).

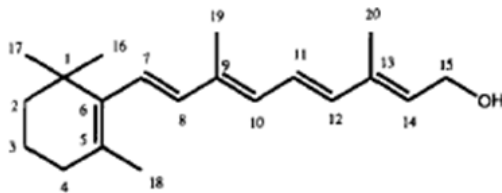


Figura 1. Estructura del retinol (Barua y Furr, 1998)

Como se observa en la estructura, el todo-trans-retinol posee cinco dobles enlaces conjugados, gracias a los cuales absorbe fuertemente el haz de luz emitido a una longitud de onda de 325 nm en la región ultravioleta (UV)-visible del espectro. Así mismo, el retinol exhibe fluorescencia amarillo-verdosa al exponerse a la radiación UV, a la vez que se destruye. Además, al tratar al retinol con ácidos de Lewis, incluyendo ácido sulfúrico o pentóxido de fósforo, éste pasa por fases de color morado o azul al mismo tiempo que se destruye (Blomhoff, 1994).

La manipulación de los retinoides en el laboratorio debe realizarse bajo ciertas condiciones ya que son compuestos que se isomerizan o degradan por calor excesivo y se oxidan en presencia de oxígeno, por lo que se sugiere trabajar bajo condiciones de poca luz (o luz naranja o roja) y almacenarlos a temperaturas menores a los -20°C . En el suero y en los tejidos, generalmente

los retinoides se encuentran protegidos por la unión con proteínas, por lo que es posible conservarlos de 15 meses hasta 8 años bajo condiciones adecuadas y evitando el ciclo congelación-descongelación. Una vez que se extrae el retinol de las muestras, éstas deberán analizarse de inmediato (Barua y Furr, 1998).

METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA A

Antes del aislamiento y purificación de la vitamina A, no se contaba con un estándar cuantificable por lo que las evaluaciones eran cualitativas y la presencia de vitamina A se medía en unidades de color. La prueba considerada como estándar de oro consistía en ensayos biológicos, es decir, se alimentaba al animal con el aceite de hígado a probar y medían su efectividad de acuerdo al crecimiento semanal de los animales de estudio (Carr y Price, 1926), ya que la vitamina A se consideraba la vitamina del crecimiento (Lathbury, 1931).

A partir de la obtención de la vitamina A cristalizada por Holmes y Corbet en 1937, las metodologías cualitativas pudieron contrastarse contra un estándar de concentración conocida y así convertirse en cuantitativas.

A continuación, se da una breve descripción de las diferentes metodologías que existen para la determinación de vitamina A con base en sus propiedades fisicoquímicas. Entre los métodos disponibles destacan los de espectrometría (colorimetría, fluorescencia e inactivación por rayos ultravioleta) y la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), la cual se acopla a un detector de absorbancia.

Colorimetría

En un inicio, se pensaba que la reacción colorimétrica del ácido sulfúrico con el aceite de hígado de bacalao era exclusiva, sin embargo, posteriormente

notaron que ésta reacción se presentaba con todas las grasas de hígado de todos los animales, lo cual permitió relacionar la sustancia cromogénica con la vitamina A. La rapidez e inestabilidad de la reacción impedían hacer una comparación cuantitativa de diversos aceites, por lo que únicamente servía como un método cualitativo. Posteriormente, se observó que el cloruro de arsénico (AsCl_3) formaba también una reacción azul marino brillante al entrar en contacto con el aceite más duradera que con el ácido sulfúrico lo cual permitiría realizar comparaciones entre los aceites, midiendo la absorción de la muestra a una longitud de onda de 550 a 560 nm (Rosenheim y Drummond, 1925). Con el fin de estandarizar una técnica para la determinación de vitamina A, Carr y Price emplearon Tricloruro de Antimonio (SbCl_3) en solución de cloroformo, el cual es un reactivo con características similares al AsCl_3 , pero proporciona un color estable por algunos minutos, suficiente para realizar la medición y presentar los resultados en unidades de color (Carr y Price, 1926). La reproducibilidad del ensayo por diversas personas dio resultados muy similares, por lo que en su momento, la metodología de Carr y Price fue el método de elección para la determinación de vitamina A.

El desarrollo y desvanecimiento del color azul durante la reacción, dependen del tiempo transcurrido desde la preparación del reactivo (Dann y Evelyn, 1938), así como de la intensidad de luz a la cual la muestra fue expuesta (Caldwell y Parrish, 1945). Además, la temperatura parecía afectar la intensidad del color (Caldwell y Hughes, 1946) e incluso diferentes lotes de SbCl_3 podían producir resultados diferentes (Koch y Kaplan, 1948). Koch y Kaplan (1948) sugirieron que la determinación del estándar y la muestra era simultánea para eliminar los factores mencionados anteriormente en la utilización de la reacción de Carr-Price.

Entre las principales desventajas del método de Carr-Price se incluyen: la necesidad de tomar las lecturas de la absorbancia de 5 a 10 segundos posteriores a la adición del reactivo, la naturaleza tóxica y reactiva del solvente y el efecto potencial de trazas de agua o alcohol sobre el desarrollo del color (Blake y Moran, 1976).

Fluorometría

La vitamina A presenta una fuerte fluorescencia a los 480 nm cuando se excita en el rango de 330-360 nm. Esta fluorescencia es poco utilizada para usos cuantitativos ya que las muestras pueden presentar interferencias por fitofluenos y otros materiales presentes en los alimentos y muestras biológicas. El avance de los métodos cromatográficos de columna en la remoción de compuestos de interferencia fluorescentes ha despertado el interés en el procedimiento fluorométrico (Blake y Moran, 1976). Cuando estos compuestos interferentes se remueven satisfactoriamente, la fluorometría puede ser un excelente método para la determinación de vitamina A.

Garry y colaboradores (1970) emplearon cromatografía en columna de ácido silícico para la separación de vitamina A en plasma y observaron que en la columna se separaban dos compuestos fluorescentes, el primero eluyó con hexano o éter de petróleo y el segundo (vitamina A), eluyó con isopropanol, fracción que al ser separada podía cuantificarse por fluorometría sin mayor tratamiento. Al comparar los resultados con los obtenidos por la reacción de Carr-Price, previamente el método de elección para la determinación de vitamina A, los resultados fueron similares con una $r = 0.871$.

Además de la fuerte fluorescencia que exhibía (Peterson y Rask, 1971; Futterman y Heller, 1972), cuando el retinol está unido a la proteína de unión al retinol (RBP por sus siglas en inglés), incrementa al doble su capacidad de fluorescencia al compararlo con el retinol aislado, por lo que Futterman y Heller (1972), describieron un método de detección por fluorescencia directa a partir de suero diluido, y al comparar su método con otros previamente reportados con separación cromatográfica del retinol en suero y posteriormente la cuantificación por fluorometría, la correlación fue de ($r=0.85$).

Además, Driskell y colaboradores (1986), compararon el método de fluorescencia directa descrito por Futterman y Heller (1972) con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y observaron que éste presentó una

buena correlación además de ser único en su tipo ya que la medición era directamente en suero. Lo anterior resultó en un método más sencillo y económico para determinar si existía deficiencia de vitamina A. Sin embargo de acuerdo a la literatura disponible esta técnica actualmente se emplea muy poco.

Inactivación por luz ultravioleta (UV)

Debido a la susceptibilidad de la vitamina A frente a la luz, Bessey y colaboradores (1946), sugirieron la aplicación de una metodología cuyo fundamento consistía en la destrucción de la vitamina A al irradiarla con luz ultravioleta y medir la diferencia de absorción antes y después de irradiar a 328 nm; lo cual trae como consecuencia la destrucción efectiva de la vitamina A en aceites y tejido.

La efectividad del método descrito, dependía de: a) la saponificación y extracción de la vitamina A del suero en una micro-escala empleando solventes de baja volatilidad; b) la medición de la absorción de luz de pequeños volúmenes a 328 y 460 nm; c) el asegurar la destrucción de la vitamina A, a esta longitud de onda sin afectar la absorción de otros componentes y d) el repetir la medición a 328 nm.

Al emplear el método propuesto por Bessey y colaboradores (1946), para la determinación de los derivados de vitamina A, Sherman (1967) observó que era necesario ampliar el tiempo de irradiación, ya que el ácido retinoico mostró una resistencia inusual a los rayos UV. Además, observaron que cuando la vitamina A se degrada al mismo tiempo aparece una nueva sustancia con las características del epóxido de retinol (absorbancia máxima 270-280 nm), lo cual sugiere que la descomposición se debe a una adición oxidativa a la estructura del anillo de la vitamina A.

Por otra parte, con el fin de probar la estabilidad de la vitamina A en suero bajo diferentes condiciones de temperatura y separación de suero, Mejía y Arroyave (1983) emplearon el método descrito por Bessey y colaboradores (1946) y observaron si existía alguna modificación en los resultados. Así,

demonstraron que la vitamina A era estable a 4°C o a temperatura ambiente (26 a 28°C) aun cuando el suero se separaba del coagulo 24 h después de la extracción, lo cual puede ser particularmente útil cuando las condiciones no son las óptimas al realizar el trabajo de campo.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Actualmente, la cromatografía líquida de alta resolución se ha convertido en el método de elección por su alta especificidad (Driskell et al., 1986). Esta metodología es aplicable a una gran variedad alimentos, plantas, fluidos biológicos, tejidos, hígado, etc.

El proceso cromatográfico acoplado a un detector UV a 330 nm, provee especificidad y permite la determinación de vitamina A libre y esterificada en el suero. El método es muy sensible y sólo se requieren 200 µL de suero para obtener un límite de detección de 50 µg/L de retinol y \pm 100 µg/L para los ésteres de retinilo (DeRuyter y Leenheer, 1978). La sensibilidad que se logra al emplear CLAR en fase reversa para la determinación de vitamina A puede variar dependiendo de las condiciones cromatográficas y la naturaleza de la muestra, así Roberts et al. (Roberts et al., 1978), lograron incrementar la sensibilidad de detección a 0.3 nmol de retinol por gramo de tejido.

Nellis y colaboradores (1983), mostraron que la cromatografía en fase reversa no-acuosa es una técnica poderosa para separar carotenoides y derivados de la vitamina A. Este concepto fue originalmente descrito por Parris (citado en Nellis et al., 1983) y desde entonces se ha empleado para la diferenciación de vitaminas liposolubles. Las ventajas de mejorar la solubilidad de muestras poco polares en eluyentes orgánicos aplican para el retinol y los ésteres de retinilo.

Recientemente, Kane y colaboradores (2008), desarrollaron una metodología para determinar esteres de retinilo, retinol y retinal en diversas muestras biológicas, con niveles de detección tan bajos como 0.7 pmol, 0.2 pmol y 0.2 pmol, respectivamente. Además, desarrollaron una metodología para

discriminar entre formas isoméricas de retinol e investigar precursores del ácido retinoico, con límites de detección entre 3.5–4.5 pmol.

A pesar del alto grado de sensibilidad y especificidad que se logra con la técnica de CLAR, los equipos y reactivos que se emplean para la separación y detección de los compuestos son muy costosos.

Hasta el momento, las metodologías descritas se basan en los equipos y las técnicas empleadas para la determinación de vitamina A con base en sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, existen metodologías donde además de las propiedades fisicoquímicas del retinol, se toma en consideración su función fisiológica en el organismo. Así, es posible evaluar cualitativamente el estatus de la reserva hepática y más aún cuantificar la reserva corporal total de vitamina A. Estas técnicas se describen brevemente a continuación.

Pruebas de Dosis Respuesta de Retinol (RDR y MRDR)

Las pruebas de dosis respuesta son técnicas que detectan los cambios que ocurren a nivel de la reserva de vitamina A en hígado. Su uso se recomienda cuando se desea evaluar una intervención, debido a que son más sensibles a los cambios en el estado de vitamina A que el retinol sérico, ya que éste último se encuentra controlado homeostáticamente (Green y Green, 1994). El fundamento de estas pruebas consiste en que la síntesis de *apo*-RBP en el hígado, no se controla por el estado de vitamina A y por lo tanto, cuando disminuye la concentración sérica de retinol, la *apo*-RBP se acumula. Al dosificar con una concentración conocida de vitamina A (relative dose response [RDR]) o con un análogo de esta (3,4-Didehidroretinol acetato [vitamina A₂]), éste último se une a la RBP y el complejo se libera al plasma, donde se puede detectar (Tanumihardjo y Olson, 1988; Tanumihardjo et al., 1990; Tanumihardjo y Olson, 1991).

Al usar la técnica de RDR, es necesario tomar una muestra de sangre en ayuno para determinar los niveles basales de vitamina A. Posteriormente, se

administra una dosis de palmitato de retinilo de forma que no sobrecargue el sistema con ésteres de retinilo y solo lo suficiente para asegurar la movilización de la RBP acumulada. Después de la dosificación, se proporciona un alimento rico en grasas pero bajo en vitamina A y después de 5 horas se toma una segunda muestra de sangre. Un valor de RDR > 20% se considera positivo y significa que el sujeto presenta una concentración hepática inadecuada de vitamina A, es decir deficiencia de vitamina A (Underwood, 1990).

Una modificación a este procedimiento es la prueba “modified relative dose response” (MRDR), donde se emplea un análogo de vitamina A (didehidroretinol) y requiere únicamente una punción venosa 5 horas post-dosis. En esta prueba, una relación didehidroretinol/retinol ≥ 0.06 indica una reserva hepática deficiente.

Isotopos estables de vitamina A

La técnica de isótopos estables para estimar la reserva corporal de vitamina A, se basa en el principio de dilución isotópica y ha sido empleada en niños, adultos o ambos en los Estados Unidos (Furr et al., 1989; Haskell et al., 1998), Bangladesh (Haskell et al., 1997; Haskell et al., 1998; Haskell et al., 1999), China (Tang et al., 1999; Tang et al., 2002), Filipinas (Ribaya-Mercado et al., 2000; Ribaya-Mercado et al., 2004), Guatemala (Ribaya-Mercado et al., 1999; Ribaya-Mercado et al., 2003) y Perú (Haskell et al., 2003). La técnica consiste en administrar una dosis oral conocida de vitamina A marcada con un isótopo estable y posteriormente se deja un período de equilibrio, durante el cual la vitamina A marcada se mezcla con el pool endógeno de vitamina A. Una vez equilibrada la vitamina A marcada, se toma una muestra de sangre para extraer el suero y finalmente, cuantificar la vitamina A marcada y el retinol sérico endógeno por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Haskell y Ribaya-Mercado, 2005).

En las técnicas discutidas, la cromatografía de gases había sido de poco uso en el análisis de carotenoides y retinoides por su inestabilidad térmica y su volatilidad limitada. Sin embargo, la cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas, es un método valioso para la determinación de relaciones isotópicas en la evaluación de dilución isotópica para el estatus de vitamina A. Esta metodología es extremadamente sensible y precisa para el análisis de relaciones isotópicas de elementos traza (Furr et al., 2004).

Gracias a las nuevas metodologías disponibles y al uso de isótopos estables como trazadores metabólicos, recientemente se logró un avance en el mecanismo de bio-conversión del β -caroteno al reconocer que en vez de 12 μg de retinol proporciona solo 6, haciendo posible que la evaluación del aporte dietario de retinol sea más precisa y evitar sobreestimación del consumo. Además, lo anterior ha permitido realizar adecuaciones en la ingestión diaria recomendada con base en la bio-conversión de los nutrimentos en el organismo (IOM-FNB, 2001).

CONCLUSIÓN

A través del tiempo y con los avances en la tecnología, se ha logrado un avance importante en la determinación de nutrimentos como la vitamina A, lo que a su vez ha permitido desarrollar técnicas que ofrezcan mayor sensibilidad y especificidad, así como también ha sido posible eliminar compuestos interferentes.

En un inicio, las determinaciones de vitamina A se realizaban de forma cualitativa por unidades de color, sin embargo a partir de la purificación de la vitamina A, las evaluaciones se hicieron más específicas y cuantitativas al contar con un estándar de concentración conocida para contrastar con los resultados de las muestras problema. Así, se buscaron nuevas metodologías

para el análisis de vitamina A, basadas en las propiedades fisicoquímicas de la misma, cada una con distinto grado de sensibilidad pero todas ellas válidas.

Actualmente, la elección de una técnica para la determinación de vitamina A dependerá de las instalaciones con las que cuente el laboratorio, las situaciones del trabajo de campo, las necesidades específicas del grupo de investigación y la caracterización que se desea realizar en el grupo de estudio. Es decir, para conocer el estado de vitamina A de una población es posible emplear únicamente la evaluación de retinol sérico. A su vez, si se requiere una evaluación más profunda del estado de vitamina A, es posible aplicar las pruebas de dosis respuesta para conocer cualitativamente los niveles de la reserva hepática de vitamina A en una población. Más aún, si la evaluación del estado de vitamina A se requiere para evaluar su utilización metabólica, es posible emplear marcadores (vitamina A marcada con isótopos estables) que permitan determinar su distribución corporal de la vitamina A, así como cuantificar la reserva hepática de retinol. Si bien todas las técnicas anteriores proporcionan información sobre el estado de vitamina A, éstas en particular se distinguen en el grado de precisión en el análisis y en la información que es posible obtener a partir de ellas.

Por todo lo anterior, es claro que los avances a futuro en la bioquímica nutricional estarán muy ligados al desarrollo de métodos analíticos asociados a las propiedades fisicoquímicas de los nutrimentos y su función metabólica

REFERENCIAS

- Barua A, Furr H. Properties of retinoids. *Molecular Biotechnology* 1998;10: 167-82.
- Bessey O, Lowry O, Brock M, Lopez J. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J Biol Chem* 1946;166: 177-88.
- Blake J, Moran J. An improved colorimetric procedure for the analysis of vitamin A. *Can J Chem* 1976;54: 1757-64.
- Blomhoff R. *Vitamin A in health and disease*. New York: Marcel Dekker. 1994.
- Caldwell M, Parrish D. The effect of light on the stability of the Carr-Price color in the determination of vitamin A. *J Biol Chem* 1945;158: 181-6.
- Caldwell M, Hughes J. Changes in the absorption spectra due to aging of the Carr-Price reaction mixture with vitamin A and the common carotenoid pigments. *J Biol Chem* 1946;166: 565-72.
- Carpenter K. A Short History of Nutritional Science: Part 3 (1912–1944). *J Nutr* 2003;133: 3023-32.
- Carr F, Price E. Colour reactions attributed to vitamin A. *Biochem J* 1926;20: 497-501.
- Dann W, Evelyn K. The determination of vitamin A with the photoelectric colorimeter. *Biochem J* 1938;32: 1008-17.
- DeRuyter M, Leenheer A. Simultaneous determination of retinol and retinyl esters in serum or plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1978;24: 1920-3.
- Driskell W, Hewett J, Bashor M. Evaluation of a direct fluorometric method for determination of serum retinol. *Clin Chem* 1986;32: 867-9.
- Drummond J, Baker L. Further studies of the chemical nature of vitamin A. *Biochem J* 1929;23: 274-91.

- IOM-FNB, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc: a report of the panel on micronutrients, subcommittees on upper reference levels of nutrients and of interpretation and uses of dietary reference intakes and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes. Washington, DC. 2001. National Academy Press. pp. 82-146.
- Furr H, Amedee-Manesme O, Clifford A, Bergen R, Jones D, Anderson D, Olson J. Vitamin A concentrations in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans. *Am J Clin Nutr* 1989;49: 713-6.
- Furr H, Green M, Haskell M, Mokhtar N, Nestel P, Newton S, Ribaya-Mercado J, Tang G, Tanumihardjo S, Wasanwisut E. Stable isotope dilution techniques for assessing vitamin A status and bioefficacy of provitamin A carotenoids in humans. *Public Health Nutr* 2004;8: 596-607.
- Futterman S, Heller J. The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin, fl-lactoglobulin, and the retinol-binding protein of human plasma. *J Biol Chem* 1972;247: 5168-72.
- Futterman S, Swanson D, Kalina R. A new, rapid fluorometric determination of retinol in serum. *Invest Ophthalmol* 1975;14: 125-30.
- Garry P, Pollack J, Owen G. Plasma vitamin A assay by fluorometry and use of a silicic acid column technique. *Clin Chem* 1970;16: 766-72.
- Green M, Green J. Dynamics and control of plasma retinol. In R. Blomhoff (Ed.), *Vitamin A in health and disease* (pp. 119-133): Marcel Dekker. 1994.
- Haskell M, Handelman G, Peerson J, Jones D, Atai Rabbi M, Awal M, Wahed M, Mahalanabis D, Brown K. Assessment of vitamin A status by the deuterated-retinol dilution technique and comparison with hepatic vitamin A concentration in Bangladeshi surgical patients. *Am J Clin Nutr* 1997;66: 67-74.

- Haskell M, Islam M, Handelman G, Peerson J, Jones D, Wahed M, Mahalanabis D, Brown K. Plasma kinetics of an oral dose of [2H4]retinyl acetate in human subjects with estimated low or high total body stores of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 1998;68: 90-5.
- Haskell M, Mazumder R, Peerson J, Jones A, Wahed M, Mahalanabis D, Brown K. Use of the deuteratedretinol-dilution technique to assess total-body vitamin A stores of adult volunteers consuming different amounts of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 1999;70: 874-80.
- Haskell M, Lembcke J, Salazar M, Green M, Peerson J, Brown K. Population-based plasma kinetics of an oral dose of [2H4]retinyl acetate among preschool-aged Peruvian children. *Am J Clin Nutr* 2003;77: 681-6.
- Haskell M, Ribaya-Mercado J. Handbook on vitamin A tracer dilution methods to assess status and evaluate intervention programs. Harvest Plus Technical Monograph 5. 2005.
- Holmes H, Corbet R. The isolation of crystalline vitamin A. *J Am Chem Soc*, 1937;59: 2042-7.
- Kane M, Folias A, Napoli J. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem* 2008;378: 71-9.
- Koch W, Kaplan D. A simultaneous Carr-Price reaction for the determination of vitamin A. *J Biol Chem* 1948;173: 363-9.
- Lathbury K. Vitamin A determination: relation between the biological, chemical and physical methods of test. *Biochem J* 1931;28: 2254-64.
- Mejia L, Arroyave G. Determination of vitamin A in blood. Some practical considerations on the time of collection of the specimens and the stability of the vitamin. *Am J Clin Nutr* 1983;37: 147-51.
- Nature. Isolation of vitamin A. *Nature*, 1932;129: 88.
- Nellis H, Roose J, Vandenbavière H, Leenheer A. Nonaqueous reversed-phase liquid chromatography and fluorimetry compared for determination of retinol in serum. *Clin Chem* 1983;29: 1431-4.

- Peterson P, Rask L. Studies on the fluorescence of the human vitamin A-transporting plasma protein complex and its individual components. *J Biol Chem* 1971;246: 7544-50.
- Ribaya-Mercado J, Mazariegos M, Tang G, Romero M, Mena I, Solomons N, Russell R. Assessment of total body stores of vitamin A in Guatemalan elderly by the deuteratedretinol- dilution method. *Am J Clin Nutr* 1999;69: 278-84.
- Ribaya-Mercado J, Solon F, Solon M, Cabal M, Perfecto C, Tang G, Solon J, Fjeld C, Russell R. Bioconversion of plant carotenoids to vitamin A in Filipino school-aged children varies inversely with vitamin A status. *Am J Clin Nutr* 2000;72: 455-65.
- Ribaya-Mercado J, Solon F, Dallal G, Solomons N, Fermin L, Mazariegos M, Dolnikowski G, Russell R. Quantitative assessment of total body stores of vitaminAin adults with the use of a 3-d deuteratedretinol-dilution procedure. *Am J Clin Nutr* 2003;77: 694-9.
- Ribaya-Mercado J, Solon F, Fermin L, Solon J, Dolnikowski G, Russell R. Dietary vitamin A intakes of Filipino elders with adequate or low liver vitamin A concentrations as assessed by the deuterated-retinol-dilution method: implications for dietary requirements. *Am J Clin Nutr* 2004;79: 633-41.
- Rider A. Elmer Verner McCollum (1879-1967). *J Nutr* 1970;100: 1-10.
- Roberts A, Nichols M, Frolik C, Newton D, Sporn M. Assay of retinoids in biological samples by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Cancer Res* 1978;38: 3327-32.
- Rosenheim O, Drummond J. A delicate colour reaction for the presence of vitamin A. *Biochem J* 1925;19: 753-6.
- Sherman B. The use of ultraviolet irradiation in the estimation of retinol (vitamin A alcohol) and its derivatives. *Clin Chem* 1967;13: 1039-49.
- Tang G, Gu X, Hu S, Xu Q, Quin J, Dolnikowski G, Fjeld C, Gao X, Russell R, Yin S. Green and yellow vegetables can maintain body stores of vitamin A in Chinese children. *Am J Clin Nutr* 1999;70: 1069-76.

- Tang G, Qin J, Hao L, Yin S, Russell R. Use of a short-term isotope dilution method for determining the vitamin A status of children. *Am J Clin Nutr* 2002;76: 413-8.
- Tanumihardjo S, Olson J. Modified relative dose response assay employing 3,4-didehidroretinol (vitamin A2) in rats. *J Nutr* 1988;118: 598-603.
- Tanumihardjo S, Furr H, Erdman J, Olson J. Use of the modified relative dose response (MRDR) assay in rats and its application to humans for the measurement of vitamin A status. *Eur J Clin Nutr* 1990;44: 219-24.
- Tanumihardjo S, Olson J. The reproducibility of the modified relative dose response (MRDR) assay in healthy individuals over time and its comparison with conjunctival impression cytology (CIC). *Eur J Clin Nutr* 1991;45: 407-11.
- Underwood B. Methods for assessment of vitamin A status. *J Nutr* 1990;120: 1453-9.
- Wolf G. The discovery of the visual function of vitamin A. *J Nutr* 2001;131: 1647-50.
- Wolf G. The experimental induction of vitamin A deficiency in humans. *J Nutr* 2002;132: 1805-11.

CAPÍTULO II

Artículo:

Patrones y componentes alimentarios y su asociación con indicadores antropométricos en preescolares de Hermosillo, Sonora.

Verónica López-Teros¹, Luis Quihui-Cota¹, María de los Ángeles Gutiérrez-Rivera², María Elena Duarte-Figueroa², Julián Esparza-Romero¹, Bertha I. Pacheco-Moreno¹, Orlando Tortoledo-Ortiz¹, Lucila Rascón-Durán², Humberto Astiazaran-García^{1*}.

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Nutrición. ²Postgrado en Ciencias de la Salud (PMCS), Universidad de Sonora. *Correspondencia: Humberto Astiazaran, e-mail hastiazaran@ciad.mx, Departamento de Nutrición y Metabolismo. Coordinación de Nutrición. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) Carretera a la Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, México. Apartado Postal 1735. CP 83000. Tel/Fax: 52 (662) 2 89 24 00.

Publicado en Revista BIOtecnia 2012;14(1):44-53.

RESUMEN

En México, las enfermedades infecciosas y deficiencias nutrimentales coexisten con problemas como el sobrepeso, la obesidad y las enfermedades crónico-degenerativas. Asimismo, la etapa preescolar es ideal para fomentar hábitos sanos de higiene y alimentación, donde el correcto desarrollo de los menores está en función de la calidad y cantidad nutrimental de los alimentos que reciben. El objetivo fue evaluar la ingestión de nutrimentos, los patrones alimentarios y su asociación con indicadores antropométricos en un grupo de preescolares del noroeste de México. Participaron 57 preescolares y se aplicaron tres recordatorios no consecutivos. Se calcularon los indicadores antropométricos, se observó la prevalencia de desnutrición y se evaluó la asociación entre la ingestión de energía y macronutrimentos con los mismos. El 63% de los preescolares presentó inadecuación de energía. Los macronutrimentos proporcionaron energía dentro del intervalo aceptable de distribución de macronutrimentos (AMDR). El consumo de energía y macronutrimentos se asoció significativamente con el Z T/E. El consumo de grasas resultó ser factor de protección contra la aparición de desmedro. El consumo de frutas y vegetales debe reforzarse para garantizar el aporte adecuado de micronutrimentos y fibra. Es necesario crear estrategias de educación nutrimental desde etapas tempranas de desarrollo a fin de promover buenos hábitos alimentarios en el futuro cercano.

Palabras clave: Dieta, hábitos alimentarios, malnutrición

ABSTRACT

In Mexico, infectious diseases and nutritional deficiencies coexist with overweight, obesity and chronic-degenerative diseases. At the same time, preschool age is an ideal stage to promote healthy hygiene and food habits, because the full development of the child is a function of the nutritional quality and quantity of their food. The objective was to assess food habits, nutrient intakes and its association with anthropometric indicators in preschool children of Northwest Mexico. Three food frequency questionnaires were applied to 57 preschool children. Anthropometric indicators were calculated and then we measured the prevalence of malnourishment. We evaluated the association between energy and macronutrient intake with the anthropometric indicators. Energy inadequacy was present in 63 % of the preschool children. Energy distribution from macronutrients was within the acceptable macronutrient distribution range (AMDR). Energy and macronutrient intake was positively and significantly associated with Z score H/A. Fat intake was a protective factor against stunting in our study population. Fruits and vegetables intakes must be reinforced to provide sufficient micronutrients and fiber. It is necessary to create nutritional education strategies starting in early life stages to promote good eating habits for the near future.

Key words: Diet, food habits, malnutrition

INTRODUCCIÓN

México, al igual que otros países latinoamericanos se encuentra en un proceso de transición donde coexisten los problemas de una Nación en vías de desarrollo (enfermedades infecciosas, desnutrición, anemia, entre otros) con aquellos característicos de una sociedad desarrollada (sobrepeso, obesidad, hipertensión, diabetes, etc.) (Ramírez et al., 2003; Albala et al., 1997). Una de las preocupaciones crecientes es que en la población existe ésta dualidad y los problemas de malnutrición subyacen bajo las condiciones antes mencionadas. Si bien, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (Olaiz et al., 2006) existe una disminución a nivel nacional en la prevalencia de baja talla para la edad en los preescolares con respecto a encuestas nutrimentales anteriores (10.1%), éste no es el caso para la región norte del país, donde al comparar los datos con los obtenidos en la Encuesta Nacional de Nutrición (ENN-1999) (Rivera et al., 2001) la prevalencia se mantiene en 7.1%.

En el norte de México no se ha observado una disminución en la prevalencia de baja talla pero si se registró un decremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad (de 7.4% a 5.0%)(Olaiz et al., 2006), surge por esto el interés por evaluar de forma integral la nutrición de los preescolares, los cuales por su etapa de desarrollo y condiciones fisiológicas son más propensos a presentar morbilidad y mortalidad durante la edad pediátrica donde, además se sientan las bases de la personalidad y de formación de hábitos que influyen en la calidad de vida a lo largo de la existencia (Aliño et al., 2007; WHO, 2009).

Una característica esencial para el correcto desarrollo de los preescolares, es la cantidad y calidad nutrimental de los alimentos que reciben, ya que la ingestión inadecuada de nutrimentos así como algún defecto en el proceso alimentario ocasionan la malnutrición (Rivera et al., 2001). Para la región norte del país, se ha observado que existe un consumo deficiente de energía (Mundo et al., 2009; Barquera et al., 2003), lo cual podría limitar el crecimiento de los menores, aunado al deficiente consumo de micronutrientes

tales como vitamina A y hierro, los cuales frecuentemente coexisten y se asocian con el incremento en morbilidad y mortalidad infantil (Grantham y Ani, 2001; Rivera y Sepúlveda, 2003; Pollit et al., 2000; James et al., 1997).

La etapa preescolar es momento ideal para la promoción de hábitos sanos de higiene y alimentación (Ojeda del Valle, 2001). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la ingestión de nutrimentos, los patrones alimentarios y la correlación de éstos con indicadores antropométricos en un grupo de preescolares del noroeste de México.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos

El presente estudio es parte de un estudio mayor sobre la evaluación de la reserva corporal total de vitamina A en menores en edad preescolar de sectores de nivel socioeconómico bajo que no reciben asistencia social alimentaria. El estudio se desarrolló en la ciudad de Hermosillo, Sonora y el protocolo del estudio se aprobó por el comité de Ética de nuestra institución. Para la participación de los menores, se obtuvo el consentimiento de la Coordinación de Salud y Seguridad Escolar de la Secretaría de Educación y Cultura, así como de la Asociación Estatal de Padres de Familia. Posteriormente, se estableció el contacto con dos planteles de educación preescolar de sectores urbano-marginados que no contaran con el programa de desayunos escolares y se sostuvo una reunión con los padres de familia, aquellos interesados en la evaluación de sus hijos, firmaron una carta de consentimiento informado. Los menores participantes se encontraban aparentemente sanos y en un rango de edad entre 3 y 6 años. Se recibieron 66 consentimientos firmados, sin embargo no se pudo dar seguimiento en nueve menores porque cambiaron su lugar de residencia o decidieron no continuar en

el estudio, quedando un total de 57 niños y niñas en quienes se cumplieron las encuestas.

Dieta

Para la estimación de la ingestión dietaria de nutrimentos, se aplicó el recordatorio de 24 horas a las madres en presencia de los menores de edad preescolar, empleando un formato establecido. Se aplicaron tres recordatorios seriados empleando material de apoyo calibrado para la estimación de la ingestión dietaria (Sanjur y Rodríguez, 1997). El entrevistador codificó y analizó la información empleando tablas de composición nutrimental (USDA, ESHA, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán) (Ortega et al., 1999). La ingestión de cada nutrimento se ajustó con base en las recomendaciones del National Research Council (NRC, 1986) para lo cual se consideró la variación intra e inter individuo.

Para establecer la prevalencia de inadecuación en el consumo de nutrimentos, se emplearon las Referencias de Ingestión Dietaria (DRI's por sus siglas en inglés), donde se sugiere emplear el Requerimiento Estimado Promedio (EAR por sus siglas en inglés) para estimar el porcentaje de adecuación, para algunos nutrimentos únicamente se cuenta con la Ingestión Adecuada (AI por sus siglas en inglés). En el caso del cálculo de adecuación para el consumo de energía, se emplea el Requerimiento Estimado de Energía (EER por sus siglas en inglés) (IOM 1998, 2000, 2001, 2005).

Para calcular el aporte calórico a partir de los macronutrimentos, se utilizó el intervalo aceptable de distribución de micronutrimentos (AMDR por sus siglas en inglés) (IOM, 2005).

Los patrones dietarios y los menús se obtuvieron con base en la frecuencia de consumo y la combinación usual de nutrimentos entre los niños y niñas participantes en el estudio (Sanjur et al., 1990).

Indicadores Antropométricos

Las mediciones se realizaron con base en la metodología descrita por Cameron (1978).

Para evaluar el estado nutricional se calcularon los puntajes Z de los indicadores talla para la edad (T/E), peso para la edad (P/E) e índice de masa corporal para la edad (IMC/E), se utilizó el programa Nutstat de la base de datos y estadístico Epi-Info (versión 3.2, 2004) y se empleó la referencia desarrollada por el CDC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta; 2000 CDC growth charts. NCHS). El puntaje Z , es una unidad de desviación estándar de la población de referencia antes mencionada, la cual entre los valores $\pm 1.0 z$ tiene una distribución normal y valores $\leq -2.0 z$ y $\geq 2.0 z$ representan un riesgo nutricional en los indicadores antropométricos P/E, T/E e IMC/E (WHO, 1997).

Análisis Estadístico

El diseño experimental del estudio fue transversal descriptivo. Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico STATA versión 8.0. Se realizó un análisis descriptivo de la información, para la comparación de las variables antropométricas por sexo se empleó la prueba de t para muestras independientes, para comparar el consumo de energía y macronutrientes entre las 3 encuestas dietarias aplicadas se empleó un análisis de varianza de una vía y para evaluar la correlación entre el consumo de energía y macronutrientes (variable independiente) con los indicadores antropométricos (variable dependiente), se utilizó la correlación de Pearson. El nivel de probabilidad de significancia se definió como $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

El 56 % (n=32) de los menores perteneció al sexo masculino y la edad promedio del grupo fue de 5.04 ± 0.8 años y no existió diferencia significativa al comparar por sexo ($p=0.695$).

Energía, Macro y Micronutrientos

En la

Tabla 1 se presenta el consumo promedio ajustado de energía y algunos nutrientes, así como las prevalencias de inadecuación de acuerdo a los DRI's cuando estos se encuentran disponibles. La distribución promedio de energía fue: 53 % carbohidratos, 35 % grasa y 13 % proteína. No existió diferencia estadísticamente significativa entre el consumo dietario de energía y macronutrientos al comparar los 3 recordatorios de 24 horas ($p > 0.05$). En general la variación intra-individuo fue mayor que la variación inter-individuo, en concordancia con lo reportado por el NRC.

De acuerdo a la información presentada en la

Tabla 1, el 63 % de los preescolares no logró su EER y al analizar la información de este grupo, se observó que consumieron en promedio el 86.5 % de su EER. En cuanto a otros nutrientes como el potasio y la vitamina E donde ninguno de los menores logró su ingestión diaria recomendada, se observó que consumieron aproximadamente el 34 y 76 % de su AI y EAR respectivamente. El consumo de fibra también presentó porcentajes elevados de inadecuación dentro de los participantes, aquellos que no alcanzaron su ingestión recomendada consumieron aproximadamente el 52 % de su EAR.

En el otro extremo, se observó que el consumo de carbohidratos y proteínas fue un 80 % y 200 % mayor que su EAR. Asimismo, los menores consumieron aproximadamente un 50 % más de su AI para sodio.

Patrones dietarios

La Tabla 2 muestra los menús característicos consumidos por los preescolares, los cuales presentaron variaciones, sin embargo únicamente se presentan aquellos alimentos con mayores frecuencias de consumo así como los gramos promedio de los mismos, el cálculo de las porciones se realizó a partir del Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes (Marván et al.). Consistentemente a lo largo del análisis de las encuestas dietarias, se observó que el 10.5 % (n=6) de los menores no consumía el desayuno. Los alimentos con mayor frecuencia de consumo fueron las tortillas (de harina de trigo ó maíz), leche entera, huevo frito, frijoles refritos, polvo para preparar bebida (zuco[®]) y refresco de cola. Los vegetales se emplearon con mayor frecuencia durante la comida y los más comunes en el menú fueron la lechuga, el tomate y en menor cantidad el aguacate. El consumo de fruta fue bajo, el plátano fue la fruta que consumieron los niños con mayor frecuencia y se incluía tanto en el desayuno como en las colaciones de media mañana o media tarde (1 porción en promedio), otras frutas consumidas con menor frecuencia fueron la manzana y el melón chino durante las colaciones.

La distribución promedio de la energía a partir de carbohidratos, grasa y proteína para las tres comidas principales se presenta en la Figura 2.

Indicadores antropométricos

Las características generales de la población se muestran en la

Tabla 3, donde el rango de edad se encontró entre 3.08 y 6.7 años. Los resultados muestran que la población se encuentra dentro de los parámetros adecuados de nutrición de acuerdo a su edad y estado de desarrollo. En la tabla también se observa que existió diferencia significativa en los puntajes Z P/E y Z IMC/E al comparar por sexo. Al clasificar los indicadores según los puntos de corte para definir un proceso de malnutrición, se observó que el 5.3 % (n=3) de los menores cursó con desmedro (baja talla para la edad) y un 3.5 % (n=2) con sobrepeso.

Asociación entre el consumo de energía y macronutrientos con indicadores antropométricos

Al realizar la correlación de Pearson, se observó que ésta fue positiva y significativa ($p < 0.05$) entre el puntaje Z talla para la edad y el consumo dietario de energía, carbohidratos, grasa y proteína, información que se desglosa en la Tabla 4. No se observó asociación significativa para el consumo de energía y macronutrientos con los indicadores antropométricos puntaje Z : peso para la edad, peso para la talla e índice de masa corporal para la edad ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

El consumo de energía en los preescolares evaluados fue menor que su EER promedio, lo cual puede tener serias implicaciones sobre el desarrollo adecuado de los menores. Los alimentos consumidos por los preescolares fueron energéticamente densos (tortillas de harina, frijoles refritos y papas fritas), aunado a un bajo consumo de frutas y vegetales (plátano, manzana, lechuga y tomate). El patrón anterior es característico de la región noroeste del

país, además a nivel nacional esta región presenta los menores consumos de frutas y verduras en el país (Valencia et al., 1998; Ramírez et al., 2009; González, 2008; Caire et al., 2007).

La distribución promedio del aporte energético se encontró dentro AMDR (IOM, 2005) y fue muy similar a la reportada para la población de la región norte del país (Mundo et al., 2009). Sin embargo, al observar la distribución de energía en las tres comidas principales, se advierte que los carbohidratos superan el AMDR y el aporte calórico a partir de grasas se encuentra por debajo del intervalo recomendado. Además, para las variables donde se observó una correlación estadísticamente significativa, como análisis secundario se realizó una regresión logística (no se muestran los datos), así se observó que el incremento en el consumo de grasas en esta población proporciona un 18 % de reducción en el riesgo de padecer desmedro ($p=0.02$).

El consumo promedio de proteína superior al EAR observado en los menores participantes, se debió a la elevada frecuencia de consumo de frijoles, tortilla, huevos, leche y en menor proporción a la carne de res, patrón que concuerda con lo publicado por Valencia y colaboradores (1998) donde además del consumo de cereales y leguminosas la población sonoreense presentó una ingestión importante de alimentos de origen animal. Cabe mencionar que en un estudio realizado a nivel nacional, el porcentaje de adecuación para proteína fue de aproximadamente 300%, igual a lo observado dentro de nuestra población (317%) (Mundo et al., 2009).

Ningún menor alcanzó a cubrir el AI para potasio, mientras que se observó que el consumo de sodio fue un 50 % superior al AI sugerido para este grupo poblacional, lo cual de permanecer como un hábito hacia la edad adulta puede representar un riesgo de desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como la hipertensión (Meneton et al., 2005).

Las vitaminas liposolubles como la A y E son muy importantes para el desarrollo y crecimiento de los preescolares, así como para mantener un adecuado sistema inmune (Stephensen, 2001; Beharka et al., 1997). Aunque la prevalencia de inadecuación para vitamina A fue baja, los resultados no son

concluyentes ya que es un nutrimento con una elevada variabilidad y únicamente se aplicaron 3 recordatorios de 24 horas, lo cual de acuerdo a lo publicado por Willet (1990), para vitamina A nos brinda un 40% de información acertada a partir de la media de consumo real de vitamina A el 95% de las veces. En el caso de la vitamina E, ninguno de los niños y niñas evaluados logró cubrir su EAR (el promedio de ingestión fue del 76 %), por lo que puede ser un riesgo potencial para la salud de los preescolares evaluados. Lo anterior es consistente con el hecho de que la dieta en el estado de Sonora presenta un bajo consumo de alimentos de frutas y vegetales, donde solo el 15% de la población que estudiaron Valencia y colaboradores (1998) consumió fruta y 50% o menos consumieron vegetales lo cual nos habla de una baja diversificación dietaria.

En la

Tabla 3 es importante resaltar que las desviaciones estándar de los puntajes Z son menores a 1, lo que se traduce como una población más homogénea y con menor dispersión que la población de referencia (WHO, 1997). De acuerdo a los puntos de corte para definir un problema de salud pública empleando indicadores antropométricos, nuestra muestra de estudio se encuentra con un riesgo bajo de desnutrición ya que únicamente el 5.3% de los menores cursó con desmedro, lo cual es reflejo de los efectos negativos acumulados debidos a períodos de alimentación inadecuada en cantidad o calidad y a los efectos deletéreos de las infecciones agudas repetidas (Olaiz et al., 2006; WHO, 1997).

La falta de asociación entre los puntajes Z peso para la edad e índice de masa corporal para la edad con el consumo dietario de energía y macronutrientes, pudo deberse a la baja prevalencia de casos de sobrepeso u obesidad, así como al tamaño de muestra del estudio. Cabe mencionar que la muestra se seleccionó a partir de únicamente dos planteles de preescolar y éstos no contaban con el beneficio del programa de desayunos escolares, mismo que tiene presencia en otros planteles ubicados en el mismo sector.

Al interpretar los resultados observados en este estudio, aun cuando reconocemos que el tamaño de la muestra es pequeño, nos proporciona una idea acertada sobre la situación alimentaria dentro de éste grupo de población. Además bajo las condiciones socioeconómicas de los menores, sería importante evaluar otros indicadores de salud como la presencia de anemia y de parásitos a fin de valorar si éstos representan un problema y si contribuyen a la malnutrición observada en los preescolares.

Es necesario que los menores cubran sus requerimientos de energía sobre todo a partir de las kilocalorías que se obtienen de las grasas, ya que al evaluar el consumo de éstas por comida se observó que no entraban dentro del intervalo de distribución aceptable establecido por el IOM (2005). Asimismo, si bien el desmedro no representó un problema de salud pública considerable dentro de los niños y niñas participantes, el marcador empleado para su evaluación (puntaje Z talla para la edad) correlacionó positiva y

significativamente con el consumo de energía, proteína, grasas y carbohidratos (Tabla 4) y aunque la aparición del desmedro fue previa a la presente evaluación dietaria, por su naturaleza crónica nos indica que las deficiencias nutrimentales han estado presentes a lo largo del desarrollo de estos menores (Olaiz et al., 2006; WHO, 1997). El consumo de grasas resultó estadísticamente como factor de protección contra la aparición de desmedro dentro de nuestra muestra y si la inadecuación en su consumo ha estado presente a lo largo de su desarrollo esto puede explicar en parte el desmedro observado. Sin embargo, al sugerir un incremento en el consumo de grasas, es necesario enfatizar que éste deberá encontrarse en el intervalo aceptable de consumo y el aporte deberá ser principalmente a partir de ácidos grasos insaturados además de fomentar el consumo de ácidos grasos omega 3 y 6 (IOM, 2005). Igualmente, el consumo de frutas y vegetales en la población debe reforzarse a fin de garantizar un aporte adecuado de micronutrientes y fibra en la dieta (Recursos de salud familiar, 2001).

Por lo anterior, se reconoce que existen lineamientos para una correcta nutrición, sin embargo estas especificaciones deberán ajustarse para cubrir los requerimientos particulares detectados en grupos de la población específicos (ej. los menores participantes en el presente proyecto, así como aquellos en condiciones similares). Así, la necesidad de crear estrategias de educación nutrimental desde etapas tempranas de desarrollo, así como para los adultos responsables de los menores resulta imperativa en los preescolares de Hermosillo, México. Lo anterior a fin de promover buenos hábitos alimentarios tomando en consideración la disponibilidad y el acceso a los alimentos, así como la cultura familiar.

AGRADECIMIENTOS

El presente manuscrito deriva de un proyecto financiado por la Agencia Internacional de Energía Atómica, contrato 15198. LTV y GMA recibieron una

beca de CONACyT. Se agradece el apoyo de la Q.B. María Elena Duarte Figueroa en las mediciones de campo, M.C. Alma Delia Contreras Paniagua y la Dra. Graciela Caire Juvera por su asesoría en el análisis de los datos.

REFERENCIAS

- Albala C, Vio F y Yañez M. 1997. Epidemiological transition in Latin America: A comparison of four countries. *Revista de Medicina Chilena* 125:719-727.
- Aliño M, Navarro R, López JR y Pérez I. 2007. La edad preescolar como momento singular del desarrollo humano. *Revista Cubana de Pediatría* 79(4)
- Barquera S, Rivera J, Safdie M, Flores M, Campos I y Campirano F. 2003. Energy and nutrient intake in preschool and school age Mexican children: National Nutrition Survey 1999. *Salud Pública de México* 45 Suppl 4:S540-S550.
- Beharka A, Redican S, Leka L y Meydani SN. 1997. Vitamin E status and immune function. *Methods in Enzymology* 282:247-263.
- Caire G, Ortega M, Casanueva E, Bolaños A y Calderón de la Barca AM. 2007. Food components and dietary patterns of two different groups of Mexican lactating women. *Journal of the American College of Nutrition* 26:156-162.
- Cameron. 1978. The methods of auxological anthropometry. In: Falkner, F. and Tanner, J. *Human Growth. Post natal growth*. Plenum Press, London.
- González L.E. 2008. 'Cambios en el patrón del consumo de alimentos y su relación con riesgos de enfermedades crónicas en la población Sonorense', tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sonora, México.
- Grantham S y Ani C. 2001. A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *Journal of Nutrition* 131:649S-668S.
- Institute of Medicine (IOM). 1998. Dietary reference intakes for: Thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. National Academy Press, Washington, DC.

- Institute of Medicine (IOM). 2000. Dietary reference intakes for: Vitamin C, Vitamin E, selenium and carotenoids. National Academy Press, Washington, DC.
- Institute of Medicine (IOM). 2001. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. National Academy Press, Washington, DC.
- Institute of Medicine (IOM). 2005. Dietary Reference Intakes for: Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Protein and Amino Acids (Macronutrients). National Academy Press, Washington, DC.
- James WP, Nelson M y Ralph A. 1997. Socioeconomic determinants of health. The contribution of nutrition to inequalities in health. *British Medical Journal* 314(7093):1545-1549.
- Marván L, Pérez AB y Palacios B. Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. Documento técnico. 2ª edición. Fomento de Nutrición y Salud, AC.
- Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE y Macgregor G.A. 2005. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiological Reviews* 85:679–715.
- Mundo V, Rodríguez S y Shamah T. 2009. Energy and nutrient intake in Mexican children 1 to 4 years old. Results from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México* 51 suppl 4:S530-S539.
- National Research Council (NRC). 1986. Nutrient adequacy: Assessment using food consumption surveys. National Academy Press, Washington, DC.
- Ojeda del Valle M. 2001. Infancia y Salud. Centro de Referencia Latinoamericano para la Educación Preescolar. [Publicación electrónica]. [Consultado 2002 Junio 7] Disponible en: <http://www.infomed.sld>
- Olaiz G, Rivera J, Shamah T, Rojas R, Villalpando S, Hernández M y Sepúlveda J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

- Ortega M, Quizán P y Morales G. 1999. Cálculo de ingestión dietaria y coeficientes de adecuación a partir de registro de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos. Estimación del consumo de alimentos. Hermosillo, Sonora: Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C.
- Pollit E, Saco C, Jahari A, Husaini M y Huang J. 2000. Effects of an energy and micronutrient supplement on mental development and behavior under natural conditions in undernourished children in Indonesia. *European Journal of Clinical Nutrition* 54:80-90.
- Ramírez I, Rivera J, Ponce X y Hernández M. 2009. Fruit and vegetable intake in the Mexican population: Results from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México* 51 suppl 4:S574-S585.
- Ramírez JA, García M, Cervantes R, Mata N, Zárate N, Mason T y Villarreal A. 2003. Transición alimentaria en México. *Anales de Pediatría* 58:568-573.
- Recursos de Salud Familiar: Niño en edad preescolar y la nutrición. 2001. Consultado Junio 7 de 2002. www.askAAMC.org.
- Rivera J y Sepúlveda J. 2003. Conclusiones de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999: traduciendo resultados en políticas públicas sobre nutrición. *Salud Pública de México* 45 suppl 4:1-12.
- Rivera J, Shamah T, Villalpando S y González de Cossío T, Hernández B, Sepúlveda J. 2001. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Sanjur D, Garcia A, Aguilar R, Furumoto R y Mort M. 1990. Dietary patterns and nutrient intakes of toddlers from low-income families in Denver, Colorado. *Journal of the American Dietetic Association* 90:823–829.
- Sanjur D y Rodríguez M. 1997. Evaluación de la ingesta dietaria: Aspectos selectos en la colección y el análisis de datos. División de ciencias nutricionales. Programa de Nutrición Comunitaria. Colegio de Ecología Humana. Universidad de Cornell, New York.

- Stephensen C. 2001. Vitamin A, infection and immune function. *Annual Review of Nutrition* 21:167-192.
- Valencia ME, Hoyos LC, Ballesteros MN, Ortega MI, Palacios MR y Atondo JL. 1998. La dieta en Sonora: canasta de consumo de alimentos. *Estudios Sociales VIII* (15):11–39.
- Willet W. 1990. Nature of variation in diet. In: *Nutritional epidemiology. Monographs in epidemiology and biostatistics vol. 15*. Oxford University Press. New York.
- World Health Organization (WHO). 1997. *Global database on child growth and malnutrition*. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization (WHO): *Global prevalence of vitamin a deficiency in populations at risk 1995–2005*. 2009. *Who global database on vitamin A deficiency*. Geneva, World Health Organization.

CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1. Consumos promedio de nutrimentos, así como porcentajes de inadecuación en los preescolares participantes.

	Media ± DE	Requerimiento	Prevalencia de inadecuación (n)
Energía (kcal)	1371.63 ± 242.79	1410.02 [†]	63% (36)
Proteína (g)	43.53 ± 11.60	13.75 ^{††}	-
Grasa (g)	52.79 ± 9.38	-	-
Carbohidratos (g)	180.16 ± 24.53	100 (EAR)	-
Fibra (g)	14.14 ± 7.63	25 (AI)	95% (54)
Calcio (mg)	592.47 ± 207.38	800 (AI)	89% (51)
Hierro (mg)	9.22 ± 1.77	4.1 (EAR)	-
Zinc (mg)	5.20 ± 1.30	4 (EAR)	23% (13)
Sodio (mg)	1798.07 ± 256.93	1200 (AI)	-
Potasio (mg)	1277.02 ± 465.33	3800 (AI)	100% (57)
Vitamina A (ER)	632.36 ± 298.06	275 (EAR)	7% (4)
Vitamina C (mg)	53.75 ± 24.42	22 (EAR)	4% (2)
Vitamina E (mg)	4.53 ± 0.61	6 (EAR)	100% (57)

[†]REE=Requerimiento estimado de energía, basado en cálculos recomendados por el FNB-IOM (2005) para niños y niñas (3-18 años) respectivamente. No se observó diferencia significativa al realizar las comparaciones entre la recomendación de energía por sexo ($P=0.295$).

^{††}El EAR para proteína se calculó para niños y niñas con base en cálculos recomendados por el FNB-IOM (2005).

Tabla 2. Menús típicos para los menores preescolares.

	Alimento	Porción ‡
Desayuno		
73.12 (g)	Huevos fritos	1.33
48.11 (g)	Tortillas maíz/harina	2.25
224.91 (mL)	Leche entera	0.94
Comida		
65.94 (g)	Tortilla maíz	2.2
69.17 (g)	Frijoles refritos	0.91
46.18 (g)	Papas (fritas o cocidas)	2.2
37.8 (g)	Tomate/lechuga	0.39
145.05 (mL)	Refresco de cola	1.63
Cena		
82.94 (g)	Frijoles refritos/frijoles refritos con queso	1.09
62.2 (g)	Tortillas de maíz/harina	2.94
218.5 (mL)	Leche entera	0.91
Variaciones a un menú típico: licuado de plátano con chocolate en polvo (240 g); Cereal (31.52 g); Sopa de pasta en caldo (129.59 g)		
Media mañana		Media tarde
Bebida Big citrus punch (300.43 g)		Caramelo (16.6 g)
Tortilla de harina (50.38 g)		Plátano (77.02 g)
Plátano (89.07 g)		Refresco de cola (177.48 mL)
Néctar de manzana (215.5 mL)		Frituras de maíz (38.18 g)

‡ Porciones calculadas a partir de las recomendaciones del Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes

Tabla 3. Características antropométricas de los preescolares participantes (n=57).

	Total preescolares (n=57)	Niñas (n=25)	Niños (n=32)	<i>p</i> [†]
	← <i>media ± desviación estándar</i> →			
Peso (kg)	18.09 ± 2.65	18.78 ± 3.103	17.55 ± 2.129	0.083
Talla (m)	1.07 ± 0.06	1.077 ± 0.069	1.071 ± 0.058	0.712
Z T/E	-0.42 ± 0.85	-0.258 ± 0.934	0.551 ± 0.773	0.162
Z P/E	-0.22 ± 0.93	0.192 ± 1.016	-0.541 ± 0.723	0.002*
Z IMC/E	0.04 ± 0.83	0.413 ± 0.827	-0.255 ± 0.710	0.002*

[†]Se estableció diferencia si $p < 0.05$

*Las comparaciones se realizaron por sexo.

Tabla 4. Correlación entre el consumo dietario de energía y macronutrientos con el puntaje Z talla para la edad.

	Correlación (r)	<i>p</i> [*]
Energía	0.3157	0.017
Proteína	0.2671	0.044
Grasa	0.3032	0.022
Carbohidratos	0.2894	0.029

*Se considera una correlación significativa cuando el valor de $p < 0.05$

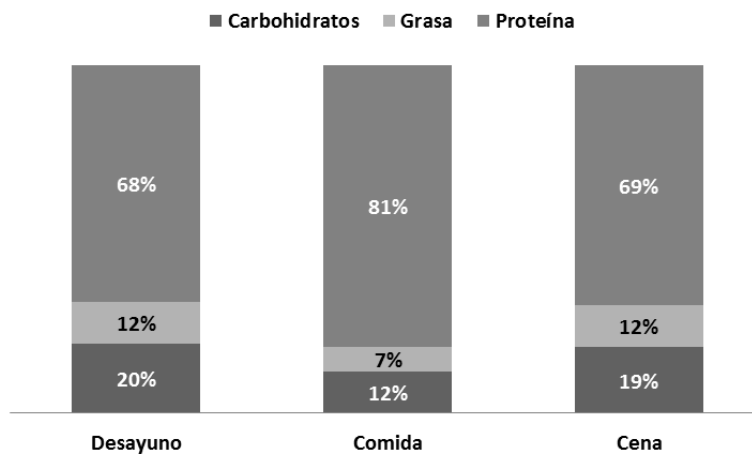


Figura 2. Distribución del consumo promedio de energía por comida.

CAPÍTULO III

Artículo:

Vitamin A-fortified milk increases total body vitamin A stores in Mexican preschoolers.

Veronica Lopez-Teros³, Luis Quihui-Cota³, Rosa O Méndez-Estrada³, Maria I Grijalva-Haro³, Julián Esparza-Romero³, Mauro E Valencia⁴, Michael H Green⁵, Guangwen Tang⁶, Bertha I Pacheco-Moreno³, Orlando Tortoledo-Ortiz³, Humberto Astiazaran-Garcia^{3*}

³ Department of Nutrition, Research Center for Food and Development, Hermosillo, Sonora, Mexico 83000. ⁴ Posgrado en Ciencias de la Salud (PCMS), Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico 83000. ⁵ Department of Nutritional Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802. ⁶ Carotenoids and Health Laboratory. Jean Mayer USDA-Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, MA 02111.

Enviado a la revista:

Journal of Nutrition

ABSTRACT

Vitamin A deficiency (VAD) continues to be a major nutritional problem in developing countries, including Central America. In Mexico, milk is a well accepted vehicle for the administration of micronutrients, including vitamin A (VA), to preschoolers. Thus, we conducted a randomized, controlled clinical trial to investigate the effectiveness of daily consumption of 250 mL of VA-fortified milk (which provided 196 retinol equivalents/d) for 12 weeks on VA stores in marginal VAD preschoolers who were not enrolled in a food assistance program. Twenty-seven marginal VAD children were randomly assigned based on screening measurements to either the intervention (n=14) or control group (n=13). Eighty nine percent (n=24) completed the study. Total body VA (TBVA) pool size was estimated using the deuterated retinol dilution technique (DRD) before and after the intervention. After 3 months, median changes in serum retinol concentration for the intervention and control group were 0.13 $\mu\text{mol/L}$ vs. -0.21 $\mu\text{mol/L}$, respectively ($P=0.009$), Median changes in TBVA stores were 0.06 mmol vs. 0.01 mmol, respectively ($P=0.006$). Estimated median changes in liver VA concentration were 0.09 $\mu\text{mol/g}$ vs. 0.01 $\mu\text{mol/g}$ ($P=0.002$), respectively. The vitamin A-fortified milk was well accepted among preschoolers and significantly increased total body VA stores, liver VA stores and serum retinol concentration indicating that it may be an effective means to ameliorate VAD in young Mexican children.

INTRODUCTION

Vitamin A deficiency (VAD) remains a public health problem in the developing world; it especially affects women of reproductive age and preschool-age children (WHO, 2009). In fact, it is estimated that over 127 million preschool-age children have VAD worldwide (West, 2002). VAD may result in anemia, reduced immune function, xerophthalmia, blindness and increased morbidity and mortality (WHO, 2009; ,D'Ambrosio et al., 2011).

In a 1995 publication, the World Health Organization identified severe subclinical VAD in Mexico (WHO, 1995), but it was until 2001 that a national nutrition survey (Rivera et al., 2001; Spanish acronym, ENN) reported moderate and severe VAD in 26% of 3-6 year-old children and in 2.2% of 3-4 year olds respectively. Vitamin A (VA) supplements have been administered in Mexico since 1993 to children from 6 months to 4 years (60 mg) during National Health Campaigns (NHC) and, although they provide immediate improvement in vitamin A status, their effect is limited with time (SSA, 2009; Robles et al., 1998). Food fortification on the other hand, tends to be slower but has a much wider and more sustained impact (WHO/FAO, 2006).

Indeed, the Mexican national school breakfast program, which provides foods fortified with iron, zinc and vitamin A has been shown to be effective in reducing the prevalence of iron and zinc deficiencies, but not VAD (evaluated based on serum retinol concentrations)(González, 2005). In addition to the school breakfast program, a Mexican national food aid program has distributed micronutrient-fortified milk since 2001 to those whose nutritional status may be compromised due to low socioeconomic status or limited access to food. Consumption of this fortified milk has been associated by multiple linear and logistic regression models, with a reduction in the prevalence of anemia in Mexican children (Villalpando et al., 2009) but its impact on the VA status of preschool-age children has not been determined. Vitamin A-fortified milk might be an ideal vehicle for improving the VA status of children, especially in areas of

Mexico such as the northwest, where animal food sources (beef, eggs and milk) are important parts of the diet (Valencia et al., 1998) and consumption of fruits and vegetables is lower than in other regions of the country.

Here we studied the impact of VA-fortified milk on total body vitamin A (TBVA) stores in vitamin A-deficient children in Northwestern Mexico. We used an isotope dilution method, the deuterated retinol isotope dilution (DRD) technique, to assess the change in VA status between the intervention and control groups in preschoolers after 3 months of daily consumption of VA-fortified milk. This analytical and mathematical methodology has been previously shown to be sensitive to detect changes in status due to dietary or pharmacological VA supplementation and it is thus useful for evaluating the effectiveness of intervention programs (Vitamin A tracer task force, 2004).

METHODS

Subjects and study design

Preschool children (3 to 6 years old) from low socioeconomic areas of Northwest Mexico were eligible to participate in this randomized, controlled clinical trial. Screening measurements included the evaluation of serum retinol (MacCrehan and Schönberger, 1987) and hemoglobin concentrations (Neufeld et al., 2002), serum C reactive protein (CRP; EIA-3954 CRP; DRG Diagnostics, NJ, USA), serum retinol binding protein (RBP; ELISA Kit K6110; Immunodiagnostik, Bensheim, Germany), weight and height (Cameron, 1978), dietary information (Sanjur and Rodríguez, 1997) and stool samples for parasites (Faust et al., 1939). Inclusion criteria were marginal vitamin A deficiency (moderate VAD serum retinol levels, 0.35-0.7 $\mu\text{mol/L}$ and mild VAD 0.7-1.05 $\mu\text{mol/L}$)(WHO, 2009; De Pee and Dary, 2002; Vieira et al., 2008) and absence of subclinical inflammation (Tietz, 1995). The presence of anemia

(WHO/CDC, 2008), malnutrition, signs and symptoms of xerophthalmia, and any clinical or dietary condition that could compromise VA metabolism were considered exclusion criteria. Subjects who were found to have severe VAD at screening were not eligible for enrollment; they were referred to a local health center where they received a VA supplement (60 mg).

Approval to conduct this study was obtained from the bioethics committee of the Research Center for Food and Development (Spanish acronym, CIAD), Hermosillo, Sonora, Mexico, and the School Health and Safety Department of the Sonoran Education Secretary. Informed consent was obtained from the children's parents. Based on screening data, enrolled children were assigned by simple randomization to either the intervention (n=11) or control group (n= 13). Sample analyses were performed by personnel blinded to group assignments. Baseline and post-intervention analyses were performed simultaneously to reduce inter-assay variability.

Vitamin A-fortified milk

Liconsa was the fortified milk used in this study, which is part of a Mexican food aid program that distributes micronutrient-fortified milk, to those most vulnerable. This milk was provided in a powdered form and in order to avoid incorrect dilution of the vehicle, we reconstituted the milk at the institute before giving it to subjects. Preschoolers in the intervention group received seven frozen pouches containing 250 mL (196 retinol equivalents [RE]/day) of the VA fortified milk each week for 12 weeks. Hermosillo is a city located in the desert and, throughout the summer (when this study took place), the temperature rises above 40°C. For that reason, frozen snacks are commonly consumed, especially by children. We did not provide a placebo drink to the control group; however, both groups received guidance about the importance of consuming their typical diet. Adherence to the protocol was checked qualitatively by asking the child's care provider if the child had consumed the milk daily.

Dietary assessment

Dietary information was collected at baseline, one and a half months and 3 months after the intervention started, from the children in the presence of their mothers using three non-consecutive, 24-hour recalls with a precoded format (Sanjur and Rodríguez, 1997); nutrient consumption of foods was calculated using food composition tables (Ortega et al., 1999). VA adequacy was assessed using the Estimated Average Requirement (EAR) which is set at 275 µg of retinol activity equivalents (RAE) per day for 4-8 year-old children (Food and Nutrition Board, 2001).

Deuterium-labeled vitamin A

Tetra-deuterated (D4) retinyl acetate (*all-trans*-retinyl-10,19,19,19- $^{2}\text{H}_4$ acetate) and octa-deuterated (D8) retinyl acetate (*all-trans*-retinyl-10,14,19,19,19,20,20,20- $^{2}\text{H}_8$ acetate) were synthesized by Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). The chemical purity of D4 was $\geq 98\%$ and that of D8, $\geq 92\%$. TBVA stores were determined using the DRD technique (see below) before and after the intervention period in both groups (**Figure 3**). After an overnight fast, subjects were given an oral dose of stable isotope-labeled VA in 200 µL of corn oil using a Gilson[®] Microman[®] positive displacement pipette (Villiers-Le-Bel, France). Children then consumed a serving of deep fried French fries to maximize absorption of the labeled vitamin A. The baseline dose of D4 retinyl acetate provided 5.08 mg of D4 vitamin A and the post-intervention dose contained 4.01 mg of D8 vitamin A.

Blood sampling and storage

Fasting 5-mL samples of venous blood were drawn using a syringe or Safety Lok™ Vacutainer® blood collection set and collected into no-additive Vacutainers (Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ) covered with aluminum foil to prevent light damage. Blood samples were placed on ice for transport to the Coordination of Nutrition at CIAD. Serum was obtained and stored at -70° C until analyzed at CIAD's facilities (screening) or shipped on dry ice to the USDA/Agricultural Research Service Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University (Boston, MA), where it was stored at -70°C until analysis of serum retinol, pro-vitamin A carotenoids and percentage enrichment.

Determination of serum retinol and pro-vitamin A carotenoids (α -carotene, all-trans- β -carotene and cryptoxanthin), serum retinol [labeled (D):unlabeled(H)]

Serum retinol and pro-vitamin A carotenoids were extracted as previously described (Yeum et al., 1996), using retinyl acetate and echinenone as internal standards. Extracts were analyzed by HPLC using a C30 YMC-Carotenoid S-3 column (3 μ m, 150 x 4.6 mm; Milford, MA) column and a Waters 2695 separations module, 2996 photodiode array detector and Empower 2 software (Yeum et al., 1996). HPLC purified standards were used to calculate the retinol, α -carotene, all-*trans*- β -carotene and cryptoxanthin concentrations, using an external calibration curve obtained from pure standards (from Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The inter-run variation was 6% for retinol and 11% for pro-vitamin A carotenoids. Total serum retinol (D and H) was determined.

The isotopic ratio of D to H in serum samples was determined by gas chromatography-electron chemical ionization mass spectrometry (GC-MS) analysis. Samples were extracted (Yeum et al., 1996) and the retinol fraction

was collected after HPLC separation on a C₁₈ column. Solvent was evaporated under N₂ and the residue was derivatized at 70°C for 30 min with 10 µL of N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) with 10% trimethylchlorosilane (TMCS; both from Pierce, Rockford, IL USA)(Tang et al., 1998). One µL was injected into the GC-MS system which consisted of an Agilent 6890 gas chromatograph with a 5973 Network Mass Selective Detector (Santa Clara, CA) and a Zebron ZB-1MS capillary column (Phenomenex Inc, Torrance, CA). Total enrichment of labeled retinol was determined by integrating the peaks under the reconstructed mass chromatograms of the negative ions at m/z from 268-270 for H, m/z 271-273 for D4 retinol and m/z 274-278 for D8 retinol. Thus the calculation of percentage enrichment was $[D/(H+D)] \times 100$ (Tang et al., 1998).

Estimation of TBVA and liver VA stores

Data from blood samples collected 14 days after administration of each labeled dose were used for the estimation of TBVA stores according to the Olson equation (Furr et al., 1989) using a half-life of 32 days for liver vitamin A stores as has been estimated for preschoolers (Haskell et al., 2003). We also estimated liver VA concentrations based on the assumptions that liver weight in children is approximately 3% of body weight and that about 90% of total body vitamin A is stored in the liver in populations with adequate VA status (Olson, 1987).

Statistical analysis

Sample size was based on results by Ribaya-Mercado and collaborators (2004) for the assessment of the change in total body vitamin A stores in response to an intervention with VA fortified sugar in 21 Nicaraguan

schoolchildren. Because our trial was shorter (3 vs. 12 months), an estimation of the change in TBVA stores 3 months after the intervention was made. Assuming a two tailed analysis with α set at 0.05 and an estimated standard deviation of 0.365 mmol, 16 participants (8 per group) would be needed to provide 80% power to detect a difference of 0.54 mmol in TBVA stores between groups. We increased the number of participants to 27 (n=13 in control and n=14 in the intervention group, respectively), assuming a potential dropout rate over 60%, similar in both groups. All outcome variables were analyzed in participants who completed the study (control group, n=13; intervention group, n=11)(**Figure 4**).

Data analysis was performed using the NCSS statistical software (NCSS 2007; Kaysville, UT). Descriptive statistics were generated for the general characteristics of the study population. The Mann-Whitney U test was used to compare median TBVA stores, serum retinol, pro-vitamin A carotenoids and estimated liver retinol stores between the intervention and control groups; significance was achieved when $P < 0.05$. As secondary analyses, we performed a Wilcoxon signed rank test to compare baseline and final numerical assessments within each group, correlations were performed using Spearman rank test and McNemar's test was used to evaluate the change in VAD prevalence before and after the intervention.

RESULTS

Participants

Twenty-five preschoolers with serum retinol concentrations $\geq 1.05 \mu\text{mol/L}$, 6 with positive subclinical inflammation, 1 possibly infected with hepatitis C virus and 1 with chickenpox were excluded before randomization. Participants' characteristics were randomly distributed between groups, even after 3 subjects

dropped out of the intervention group before the final assessment (**Table 5**). Similar to predictions in the CDC reference growth charts for boys and girls aged 4-6 years (CDC, 2000), we observed a significant weight gain (1.15 kg) and an increase in height (3.4 cm) 6 months after screening. No significant differences were found for other anthropometric indices in the pre- vs. post-intervention measurements. Anemia and subclinical inflammation were not detected based on hemoglobin and serum CRP results, respectively. Based on analysis of fecal samples for parasites, 81.5% (n=22) of the children were not infected, 11.1% (n=3) tested positively for non pathogenic *Entamoeba coli* and 7.4% (n=2) for the pathogenic *Giardia intestinalis* (one infected child in each group). Children who were found to have giardiasis received treatment from a pediatrician after the study.

Study outcomes

Serum retinol, TBVA stores and estimated liver stores increased in response to the daily consumption of vitamin A fortified milk for 3 months in the intervention vs. the control group (**Table 6**). Median difference in vitamin A status after the intervention (defined as the change for the intervention group minus change for the control group), was 0.35 $\mu\text{mol/L}$ ($P=0.01$) for serum retinol; 0.05 mmol ($P=0.006$) for TBVA stores and 0.08 $\mu\text{mol/g}$ of liver vitamin A concentration ($P=0.002$).

Based on serum retinol levels, 15% (n=2) of children in the control group had mild VAD at baseline and this increased to 46% (n=6) at the final assessment. In addition, one subject's VA status fell to moderate VAD ($<0.7 \mu\text{mol/L}$) ($P=0.103$). In the intervention group, two subjects (18%) showed mild VAD at both baseline and the final assessment and although final serum retinol concentrations tended to be higher in both children after the intervention, the change was not significant ($P=0.25$). Serum retinol concentration decreased significantly for preschoolers in the control group ($P=0.016$). Median serum RBP

concentrations during the screening (data not shown) were 0.833 and 0.786 $\mu\text{mol/L}$ in the control and intervention groups, respectively ($P=0.79$), and there was a positive correlation found between serum retinol and RBP in this population ($r=0.45$; $P=0.03$).

The mean percentage enrichment of vitamin A in serum ($\pm\text{SD}$) was measured at baseline after an oral dose of 5.08 mg of [$^2\text{H}_4$]-retinyl acetate was administered and it was $35 \pm 7\%$ and $2.3 \pm 0.8\%$ 24 hrs and 14 days post-dose respectively. In the final evaluation the mean isotopic ratio of labeled to unlabeled vitamin A in serum was $1.4 \pm 0.6\%$ 14 days after an oral dose of 4.01mg of [$^2\text{H}_8$]-retinyl acetate.

TBVA stores increased by an average of 45% (0.06 mmol; $P=0.021$) in children who consumed VA-fortified milk for 3 months (Table 6). When we excluded one outlier whose TBVA stores increased more than 100%, the mean increase was reduced to 34% (0.056 mmol; $P=0.037$). All preschoolers in the intervention group except one had a significant increase in TBVA stores over the 3-month intervention (that child showed a decrease of -0.112 mmol). In the control group, mean TBVA stores also tended to increase during the 3-month study (5%; 0.006 mmol) but the change was not significant.

In comparison to estimated baseline liver vitamin A concentrations, values decreased 2% (-0.014 $\mu\text{mol/g}$) ($P=0.51$) in the control group and increased 37% (0.087 $\mu\text{mol/g}$) ($P=0.026$) [or 27% (0.081 $\mu\text{mol/g}$) when the outlier is excluded ($P=0.047$)] in the intervention group over the course of the study (Table 6). Liver VA concentrations increased in all children from the intervention group except one; this child had a reduction in TBVA stores as well as in VA liver concentration (-0.191 $\mu\text{mol/g}$). During the course of the study, VA-fortified milk provided a total of 17.64 mg of VA to preschoolers in the intervention group. This group had a 12.4 mg VA increase in liver stores, once corrected for the small change in liver VA stores from the control group ($P>0.05$). Therefore, 70% of the extra VA that preschoolers in the intervention group received during the study was absorbed and retained.

After 3 months, median changes in the pro-vitamin A carotenoids concentration was $-0.01 \mu\text{mol/L}$ vs. $-0.04 \mu\text{mol/L}$ for β -carotene; $0.0 \mu\text{mol/L}$ vs. $-0.01 \mu\text{mol/L}$ for α -carotene and -0.02 vs. $-0.05 \mu\text{mol/L}$ for cryptoxanthin of the intervention vs. the control group respectively and difference was not significant (**Table 7**). When comparing final and baseline concentrations, only cryptoxanthin in the control group was significantly decreased in the final evaluation ($P=0.025$), perhaps due to a change in the availability and accessibility of oranges and tangerines.

No significant differences were found in dietary intake of macronutrients, vitamin A, iron and zinc between the control and intervention groups, excluding the additional fortified milk intake (**Table 8**). Participant preschoolers' median VA intake was 530 RE/d. Vitamin A mean adequacy percentage ($217 \pm 120\%$; range, 19% - 644%) was high, but when individual vitamin A intakes were analyzed, three subjects (12%) did not attain the EAR (Food and Nutrition Board, 2001). The main dietary sources of vitamin A were mangoes, carrots (cooked and raw), milk, eggs and fortified cereals. More than half of the daily vitamin A intake (53%) came from fortified foods such as cereals, milk and non-dairy fortified beverages. Total body vitamin A stores had a positive and significant correlation with dietary vitamin A intake in participant preschoolers ($r = 0.49$; $P=0.018$).

DISCUSSION

We found a significant improvement (45% increase) in TBVA stores in preschoolers who received 250 mL/d of VA fortified milk (providing 196 RE/d; 49% of their daily recommended intake) for 3 months compared to the control group. Our interviews revealed no consumption of VA supplements during the study so that we feel confident in attributing this change to the consumption of VA fortified milk. This level of fortification is slightly higher than that for milk in

industrialized countries (150 RE/d) (Allen and Haskell, 2002) but much lower than the 492 RE/d provided through VA-fortified sugar to Nicaraguan schoolchildren (Ribaya-Mercado et al., 2004). In that study, fortified sugar consumption for 1 year was associated with a 112% increase in TBVA stores. The difference between our 45% increase over 3 months and the Nicaraguan results may be related to VA stability. Specifically, it has been estimated that, after 9 months of shipment and storage, only 40-70% of the added vitamin A remains in the sugar (Dary and Mora, 2002), perhaps due to loss by air and light exposure. In contrast, VA in dried milk has been shown to be highly stable (68-100%) (Thomas et al., 1965). Based on our calculation of liver vitamin A concentration (Table 3), all participants were above the established cutoff for deficiency (0.07 μmol retinol/g of liver) (Olson, 1987), both at baseline and the final assessment. Furthermore, it was estimated that 70% of the VA provided through fortified milk was effectively absorbed and stored after 3 months.

Although efforts have been made to improve VA status in Mexican children, more attention must be given to this public health problem (UNICEF, 2009; WHO, 1996). UNICEF (2009) reported that 50-79% of children receive two vitamin A doses per year in Mexico and two national programs provide micronutrients to selected beneficiaries (the school breakfast and provision of fortified Liconsa milk). Unfortunately the school breakfast program has not been found to significantly reduce prevalence of VAD (González, 2005), although benefits may have been masked by the use of serum retinol concentrations to detect changes in VA status and the study design. Fortified milk is an excellent vehicle to provide needed micronutrients to children in Northwestern Mexico because milk is a well-accepted part of their typical diet.

In this study, preschoolers had a median vitamin A intake of 530 RE per day (Table 2). This value is higher than that published by the ENN for children 3-6 y in northern Mexico (276-331 RE) (Rivera et al., 2001) but similar to that observed by Lopez-Teros (2005) in the same region (661 RE). In our subjects, over half (53%) of the vitamin A in the diet was provided by fortified foods (including fortified milk), similar to what has been observed for poor urban

Guatemalan toddlers (55%) (Krause et al., 1998). Carotenoids were another important source of vitamin A in this study but, because the available database used RE instead of retinol activity equivalents (RAE), our values provide an overestimate of vitamin A intake from carotenoids (by using conversion factor of 6-to-1 by weight for plant provitamin A β -carotene to retinol) (Food and Nutrition Board, 2001), although we were able to observe that 18% of the VA dietary intake came from fruits and vegetables.

Coproparasitological results showed that 2 children (one in each group) were infected with *Giardia intestinalis*. This parasite has been associated with lower VA status in Mexican school children from the same area as our study subjects (Astiazaran et al., 2010; Quihui et al., 2008). In the infected child in the control group, serum retinol concentration was lower at the final than at baseline assessment and there was no change in TBVA stores. TBVA stores of the infected child in the intervention group increased during the study period, suggesting that VA status can be improved using fortified milk, even in children infected with *G. intestinalis*.

In summary, daily consumption of 250 mL of VA fortified milk over a 3-month period was associated with significant increases in total body vitamin A stores, liver VA concentration and serum retinol concentration in preschool children. We suggest that vitamin A-fortified milk is an effective and well-accepted vehicle for improving VA status in young children.

ACKNOWLEDGMENTS

LQ, HAG, ROME and **MIGH** designed research. **VLT, BIPM** conducted research. **OTO** and **GT** provided essential materials. VLT and JER designed the clinical trial. **VLT, MHG, MEV** and **JER** analyzed data. **VLT, LQ** and **HAG** wrote paper. **LQ** and **HAG** had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript. This study was supported by International Atomic Energy Agency (IAEA) research contract 15198. LTV received a fellowship from

CONACyT. We thank Harold Furr for advice, Lucila Rascón Durán, Ana Cristina Gallegos Aguilar, María de los Ángeles Gutiérrez Rivera, María Elena Duarte Figueroa and José René Valenzuela Miranda for technical assistance and Joanne B. Green for editorial assistance.

LITERATURE CITED

- Allen LH, Haskell M. Estimating the potential for vitamin A toxicity in women and young children. *J Nutr.* 2002; 132:2907S-19S.
- Astiazaran-García H, Lopez-Teros V, Valencia M, Vázquez-Ortiz F, Sotelo-Cruz N, Quihui-Cota L. *Giardia lamblia* infection and its implications for vitamin A liver stores in school children. *Ann Nutr Metab.* 2010; 57:228-33.
- Cameron: The methods of auxological anthropometry; in Falkner F, Tanner J (eds): *Human growth: postnatal growth.* London, Plenum Press. 1978.
- Centers for Disease Control and Prevention/National Center for Health Statistics. CDC clinical growth charts.2000. [Accessed 1st December, 2011]
- D'Ambrosio D, Clugston R, Blaner W. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients.* 2011; 3:63-103.
- Dary O, Mora JO. Food fortification to reduce vitamin A deficiency: International Vitamin A Consultative Group recommendations. *J Nutr.* 2002; 132:2927S-33S.
- De Pee S, Dary O. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J Nutr.* 2002; 132:2895S-01S.
- Faust E, D'Antoni J, Odom V, Miller J, Peres C, Sawitz W, Thomen L, Tobie J, Walker J. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med.* 1939; 18:169-83.
- Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc.* Washington, D.C. National Academy Press. 2001.
- Furr HC, Amedee-Manesme O, Clifford AJ, Bergen III H, Jones AD, Anderson DP, Olson JA. Vitamin A concentration in liver determined by isotope

- dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans *Am J Clin Nutr.* 1989; 49:713-6.
- González D. Effect of cooked school breakfast intake on micronutrients nutritional status and body composition in Sonoran children. Hermosillo, Sonora: Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A. C. Text in Spanish (Impacto del programa de desayunos escolares modalidad caliente sobre el estado de nutrición de micronutrientes y composición corporal en niños de sonora). 2005.
- Haskell M, Lembcke J, Salazar M, Green MH, Peerson J, Brown K. Population-based plasma kinetics of an oral dose of [2H4]-Retinyl acetate among preschool-aged, Peruvian children. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:681-6.
- Krause V, Delisle H, Solomons N. Fortified foods contribute one half of recommended vitamin A intake in poor urban Guatemalan toddlers. *J Nutr.* 1998; 128:860-4.
- Lopez-Teros V. Vitamin A liver stores evaluation in school age children infected with *Giardia lamblia*. Hermosillo, Sonora: Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A. C. Text in Spanish (Evaluación de la reserva hepática de vitamina A en niños de edad escolar infectados con *Giardia lamblia*). 2005.
- MacCrehan W, Schönberger E. Determination of retinol, α -tocopherol, and β -carotene in serum by liquid chromatography with absorbance and electrochemical detection. *Clin Chem.* 1987; 33:1585-92.
- Neufeld L, García A, Sánchez D, Newton O, Ramírez MD, Rivera J. Hemoglobin measured by Hemocue and a reference method in venous and capillary blood: A validation study. *Sal Pub Mex.* 2002; 44:219-27.
- Olson J. Should RDA values be tailored to meet the needs of their users? *J Nutr.* 1987; 117:220-2.
- Ortega M, Quizán P, Morales G. Dietary intake calculation and adequacy percentages from 24 hour recall and food frequency questionnaire. Food intake estimation. Hermosillo, Sonora: Centro de investigación en alimentación y desarrollo, a. C. Text in Spanish (Cálculo de ingestión

- dietaria y coeficientes de adecuación a partir de registro de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos. Estimación del consumo de alimentos). 1999.
- Quihui-Cota L, Astiazaran-García H, Valencia M, Morales-Figueroa G, López-Mata M, Vázquez-Ortiz F. Impact of *Giardia intestinalis* on vitamin A status in schoolchildren from northwest Mexico. *Int J Vitam Nutr Res*. 2008; 78:51-56.
- Ribaya-Mercado J, Solomons N, Medrano Y, Bulux J, Dolnikowski G, Russell R, Wallace C. Use of the deuterated-retinol-dilution technique to monitor the vitamin A status of Nicaraguan school children 1 y after initiation of the Nicaraguan national program of sugar fortification with vitamin A. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80:1291-8.
- Rivera J, Shamah T, Villalpando S, González de Cossio T, Hernández B, Sepúlveda J. Encuesta nacional de nutrición estado nutricional de niños y mujeres en México 1999. Instituto Nacional de Salud Pública. 2001.
- Robles A, Astiazaran H, Dávalos N, Quihui L, Cabrera P, Valencia M. Efecto de la suplementación masiva de vitamina A en niños de 6 a 36 meses de edad. *Sal Pub Mex*. 1998; 40:309-15.
- Sanjurjo D, Rodríguez M. Dietary intake evaluation: selected aspects on collection and data analysis. Nutritional Sciences Division. Community Nutrition Program. College of Human Ecology. Cornell University. 1997. Text in Spanish. (Evaluación de la ingesta dietaria: Aspectos selectos en la colección y el análisis de datos).
- SSA. Secretaría de Salud (Health Ministry). Guidelines for the supplementation with iron and vitamin A in new borns, children and adolescents. Mexico. 2009. Text in Spanish (Lineamientos para la suplementación con hierro y vitamina A en recién nacidos, niños y adolescentes).
- Tang G, Qin J, Dolnikowski GG. Deuterium enrichment of retinol in humans determined by gas chromatography electron capture negative chemical ionization mass spectrometry. *J Nutr Biochem*. 1998; 9:408-14.

- Thomas EL, Coulter ST, Kudale JM. Influence of vitamin A and D fortification on the flavor of instant nonfat dry milk. *J Dairy Sci.* 1965; 48:1561-5.
- Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests.* W.B. Saunders Company. 3rd edition. Philadelphia, PA. 1995.
- UNICEF. The state of the world's children special edition. Celebrating 20 years of the convention on the rights of the child. Statistical tables. 2009.
- Valencia M, Hoyos C, Ballesteros M, Ortega M, Palacios M, Atondo J. Diet in Sonora: staple food intake (text in Spanish). *La dieta en Sonora: canasta de consumo de alimentos. Estudios Sociales.* 1998; 8:12-39.
- Vieira M, Paik J, Blaner W, Soares A, Mota R, Guerrant R, Lima A. Carotenoids, retinol, and intestinal barrier function in children from Northeastern Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008; 47:652-9.
- Villalpando S, Shamah T, García A, Mundo V, Domínguez C, Mejía F. The prevalence of anemia decreased in Mexican preschool and school-age children from 1999 to 2006. *Sal Pub Mex.* 2009; 51:S507-14.
- Vitamin A Tracer Task Force. Appropriate uses of vitamin A tracer (stable isotope) methodology. ILSI.
- West K. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *J Nutr.* 2002; 132:2857S-66.
- WHO/Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva. 2008.
- WHO/FAO. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva. 2006.
- WHO/United Nations Children's Fund. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva. 1996.
- WHO: Global prevalence of vitamin A deficiency. MDIS working paper No. 2. Geneva, World Health Organization. 1995
- 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.

Yeum KJ, Booth S, Sadowski J, Liu C, Tang G, Krinski, N, Russell R. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr.* 1996; 64:594:602.

Table 5. Screening anthropometric and biochemical characteristics of participant preschoolers randomly allocated to control or intervention groups

Measurement	Control group (n=13)	Intervention Group (n=11)	<i>P</i> ^a
	median (25th; 75th percentiles)		
Age (y)	5.4 (4.2; 5.9)	5.5 (4.2; 5.9)	0.977
Weight (kg)	17.7 (16.3; 20.6)	18.7 (15.9; 20.1)	0.794
Height (cm)	108.7 (102.7; 112.7)	107.6 (103.2; 112.1)	0.839
Z score HA	-0.23 (-0.63; 0.45)	-0.45 (-0.9; 0.35)	0.622
Z score WA	-0.33 (-0.83; 0.39)	-0.54 (-0.85; 0.17)	0.749
Z score BMI/A	-0.25 (-0.72; 0.26)	-0.18 (-0.27; 0.17)	0.385
Vitamin A (µmol/L)	0.80 (0.72; 0.89)	0.82 (0.66; 0.91)	0.884
Hemoglobin (g/L)	127 (125; 132)	126 (122; 134)	0.486
CRP (mg/L)	0.664 (0.04; 3.02)	0.603 (0.04; 1.59)	0.839

^a Based on Mann-Whitney U test
CRP normal range: 0.068 – 8.2 mg/L

Table 6. Changes in vitamin A-related variables in Mexican preschoolers who did or did not consume vitamin A-fortified milk daily for 3-mo¹.

	Baseline	3 mo	Change 3 mo
Serum retinol (µmol/L)			
Intervention	1.19 (1.11; 1.50)	1.38 (1.14; 1.48)	0.14 (-0.07; 0.24)
Control	1.29 (1.15; 1.50)	1.09 (0.97; 1.26) [*]	-0.21 (-0.40; -0.05)
Difference in changes ²			0.35 ^{**}
Total vitamin A body stores (mmol)			
Intervention	0.18 (0.14; 0.22)	0.28 (0.17; 0.35) [*]	0.06 (0.04; 0.12)
Control	0.16 (0.13; 0.22)	0.17 (0.12; 0.21)	0.01 (-0.02; 0.04)
Difference in changes ²			0.05 ^{**}
Vitamin A liver stores (µmol/g)			
Intervention	0.34 (0.23; 0.40)	0.47 (0.30; 0.52) [*]	0.09 (0.05; 0.20)
Control	0.25 (0.20; 0.41)	0.28 (0.19; 0.34)	0.01 (-0.05; 0.03)
Difference in changes ²			0.08 ^{**}

¹Values are median (25th and 75th percentiles), n=11 (Intervention) or n=13 (Control). ^{*}Different vs corresponding baseline value, *P*<0.05 (Wilcoxon signed rank test). ^{**}Different vs Control group, *P*<0.05 (Mann-Whitney U test)

²Median difference of Intervention minus Control

Table 7. Serum pro-vitamin A carotenoids concentrations in Mexican preschoolers who did or did not consume vitamin A-fortified milk daily for 3 mo¹.

Carotenoid	Baseline	Final	Change 3 months
β-Carotene μmol/L			
Intervention	0.29 (0.18; 0.54)	0.25 (0.23; 0.5)	-0.01 (-0.06; 0.1)
Control	0.39 (0.26; 0.48)	0.32 (0.28; 0.51)	-0.04 (-0.16; 0.12)
Difference in changes ²			0.03
α-Carotenene μmol/L			
Intervention	0.07 (0.03; 0.1)	0.05 (0.04; 0.07)	0 (-0.03; 0.02)
Control	0.06 (0.04; 0.09)	0.06 (0.04; 0.10)	-0.01 (-0.03; 0.01)
Difference in changes ²			0.01
Cryptoxanthin μmol/L			
Intervention	0.18 (0.13; 0.37)	0.15 (0.11; 0.18)	-0.02 (-0.22; 0.01)
Control	0.22 (0.13; 0.28)	0.16 (0.11; 0.21)*	-0.05 (-0.13; 0.003)
Difference in changes ²			0.03

¹Values are median (25th and 75th percentiles), n=11 (Intervention) or n=13 (Control). *Different vs corresponding baseline value, *P*<0.05 (Wilcoxon signed rank test).

²Median difference of Intervention minus Control

Table 8. Calculated daily nutrient intakes for subjects who completed the study¹

Characteristic	Control group	Intervention Group	<i>P</i> ^a
n	13	11	
median (25 th ; 75 th percentiles)			
Energy (kcal)	1412.1 (1281.6; 1574.8)	1239.7 (1121.5; 1557.6)	0.284
Protein (g)	47.9 (39.9; 54.6)	41.9 (30.0; 49.9)	0.139
Fat (g)	53.2 (50.2; 59.9)	49.5 (43.1; 63.8)	0.339
Carbohydrates (g)	179.9 (161.8; 201.3)	166.5 (150.1; 195.3)	0.401
Vitamin A (RE ^b)	582.5 (416.8; 842.2)	526.1 (381.8; 692.6)	0.794
Iron (mg)	9.4 (7.6; 9.7)	8.7 (7.2; 10.2)	0.582
Zinc (mg)	5.8 (4.2; 6.2)	4.9 (3.9; 5.5)	0.213

* Based on 3 non-consecutive 24 hour dietary recalls

^a Based on Mann-Whitney U test

^b RE: Retinol equivalents

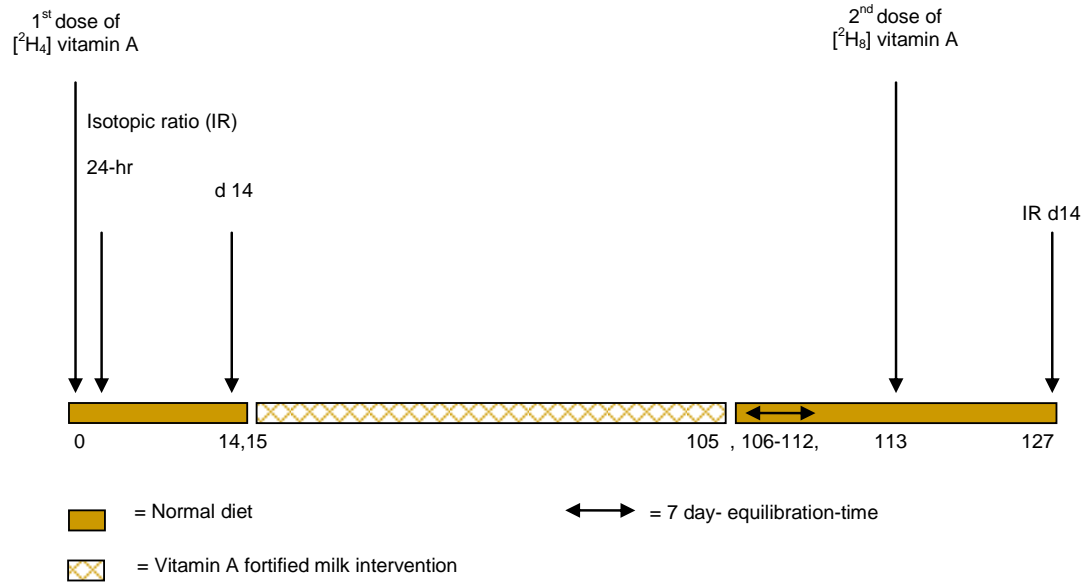


Figure 3. Study protocol for the determination of total body vitamin A stores in Mexican preschool age children.

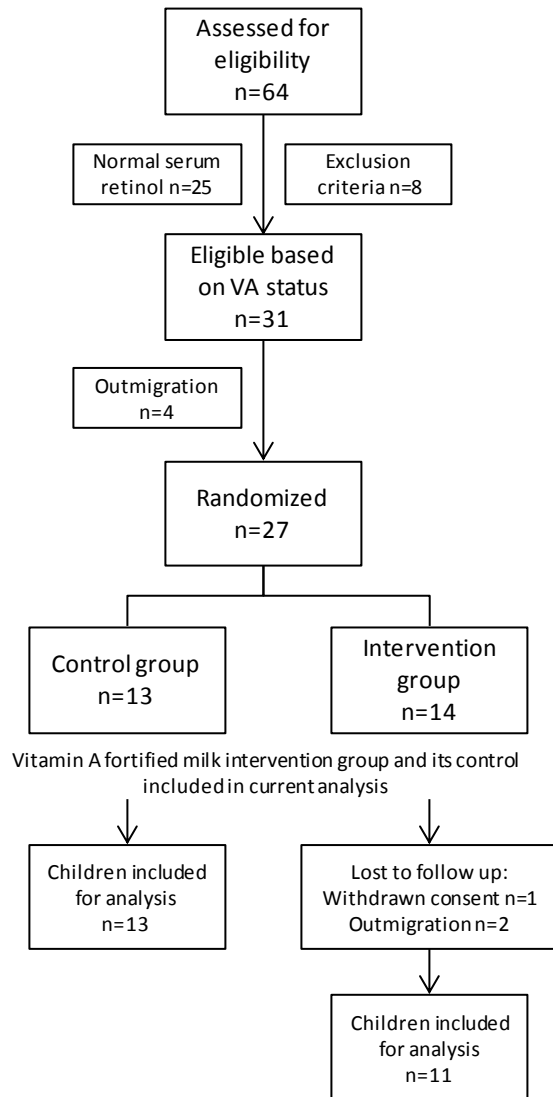


Figure 4. Schematic flow of the participants in the study.

APÉNDICE METODOLÓGICO

Preparación de las dosis marcadas de vitamina A

Como trazador se emplearon dos compuestos deuteriados de vitamina A, acetato de retinilo tetradeuteriado (D4) (*all-trans*-retinyl-10,19,19,19- $^{2}\text{H}_4$ acetate) y acetato de retinilo octadeuteriado (D8) (*all-trans*-retinyl-10,14,19,19,19,20,20,20- $^{2}\text{H}_8$ acetate), los cuales se sintetizaron por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Para calcular la pureza de la vitamina A marcada, es necesario tomar en consideración la pureza química y la pureza isotópica, las cuales se multiplican y el resultado es la pureza total del compuesto. Así, la pureza de D4 fue $\geq 98\%$ y de 92% para D8. La presentación de los compuestos es en polvo, por lo que para administrarlo a los sujetos de estudio, es necesario preparar dosis de vitamina A diluida en aceite vegetal. A continuación se brinda una breve descripción del procedimiento para la preparación de la dosis de acetato de retinilo deuteriado en aceite de maíz, el cual por ser sensible a la luz debe trabajarse siempre bajo condiciones de poca luz o luz roja (Barua y Furr, 1998).

Se disolvieron 250 mg de acetato de retinilo tetradeuteriado en 5 mL de etanol grado HPLC. Se tomó una alícuota para medir la absorbancia en un rango entre 0.5 y 1.0 para posteriormente calcular la concentración de la solución empleando el coeficiente de extinción molar del retinol en etanol ($52,770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el peso molecular de 290 para el acetato de retinilo tetradeuteriado y 294 para el octadeuteriado. Por cada miligramo de acetato de retinilo, se adicionaron $2\mu\text{g}$ de α -tocoferol y se transfirió la solución a un vial

limpio. El etanol se evaporó bajo una corriente suave de N_2 . Una vez seco, se añadió el aceite para obtener la concentración deseada (aprox. 5 mg D4/200 μ L de aceite) y se sometió a agitación vigorosa durante 10 min. Una vez preparada la solución de la vitamina A en aceite, se preparó una dilución en hexano para obtener una lectura de absorbancia entre 0.5-1.0 y posteriormente se calculó la concentración de la dilución empleando el coeficiente de extinción molar del retinol en hexano ($51,770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Finalmente el vial con la solución de vitamina A en aceite, se colocó bajo una suave corriente de nitrógeno y se almacenó a -70°C (Haskell y Ribaya-Mercado, 2005).

En el presente estudio, se proporcionó una dosis de 5.08 mg de acetato de retinilo D4 para las determinaciones basales de la reserva corporal total de vitamina A y de 4.01 mg de acetato de retinilo D8 para la evaluación post-intervención. Las dosis se administraron en 200 μ L de aceite de maíz, empleando una pipeta Gilson[®] Microman[®] de desplazamiento positivo (Villiers-Le-Bel, France). Cuando los sujetos recibieron las dosis de vitamina A marcada, se proporcionó un aperitivo alto en grasa y con bajo contenido de vitamina A, a fin de asegurar la absorción del trazador (Haskell y Ribaya-Mercado, 2005).

Determinación de retinol y carotenoides (α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina) por HPLC

A continuación se describe la metodología para la extracción y determinación de retinol y carotenoides en suero utilizando HPLC. Se tomaron 200 μ L de suero y se colocaron en un tubo de ensayo de 16 x 100 mm. Se adicionaron 100 μ L de estándar interno [mezcla de acetato de retinilo (OD \sim 0.2) y equinona (OD \sim 0.1)] y 500 μ L de solución salina al 0.85%. Se añadieron 3 mL de CHCl_3 :Metanol (2:1) y se agitó por 30 seg. Se centrifugó a 10 min; 4°C ; 3000 rpm, se recolectó la capa inferior de CHCl_3 y se colocó en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm. Se adicionaron 3 mL de hexano (grado HPLC) a la

capa acuosa restante y se agitó por 30 seg. La mezcla se centrifugó 10 min; 4°C; 3000 rpm, se recolectó la capa superior y se mezcló con el extracto de CHCl₃. La mezcla se evaporó bajo N₂, en un baño de agua (40°C) (N-EVAP, Organomation Associates Inc, South Berlin, MA) y el residuo se resuspendió en 100 µL de etanol (grado HPLC), se agitó durante 30 seg y posteriormente se sonicó durante 30 seg. El extracto se transfirió a un vial para automuestreador empleando una pipeta Pasteur de cristal y se inyectaron 20 µL del extracto en el sistema HPLC. Se empleó una columna C30 YMC-Carotenoid S-3 (3 µm, 150 x 4.6 mm, Milford, MA). El sistema HPLC fue un módulo de separación Waters 2695, un detector de arreglo de diodos Waters 2996 y el software Waters Empower 2. Se monitoreó la absorbancia a 340 nm para el retinol y 450 nm para los carotenoides, respectivamente (Yeum et al., 1996). Las concentraciones de retinol, α -caroteno, all-*trans*- β -caroteno and β -criptoxantina se calcularon empleando una curva de calibración externa de estándares puros (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Como control de calidad se empleó un pool de suero de obtenido en estudios previos con humanos y se corrió en cada set de muestras para controlar por variaciones diarias (coeficiente de variación <6%). La eficiencia de extracción, basada en el porcentaje medio de recuperación de los estándares internos, fue de 93% para el acetato de retinilo y 92% para la equinona. Se determinó la concentración total de retinol [marcado (D) y sin marcar (H)]. Debido a que se en el proceso de extracción se concentró la muestra (200 µL de suero inicial; 100 µL al reconstituir), el resultado se dividió en 2.

Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de ionización electrónica química para la determinación del radio isotópico (D:H)

Para determinar la relación isotópica de vitamina A marcada y sin marcar, las muestras de suero (300 μL) se extrajeron como se describió previamente (Yeum et al., 1996) y una alícuota del extracto (75 μL) se inyectó en el sistema HPLC equipado con una columna C_{18} . La fracción de retinol se recolectó empleando un colector de fracciones Gilson-FC 203 (Middleton, WI) y posteriormente se evaporó a sequedad bajo N_2 en un baño de agua (40°C). El residuo se derivatizó a 70°C por 30 min con 10 μL de N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) con 10% trimetilclorosilano (TMCS; both from Pierce, Rockford, IL USA), reacción que forma retinil trimetilsilil éter (Tang et al., 1998). La mezcla de la reacción se dejó enfriar y 1 μL se inyectó en el sistema GC-MS conformado por un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado en red a un detector selectivo de masas 5973 (Santa Clara, CA) y empleando una columna capilar Zebron ZB-1MS (Phenomenex Inc, Torrance, CA). La temperatura del horno y del inyector en la columna se programaron para incrementar en un rango de 15°C/min desde 50°C hasta 285°C. La interfaz GC/MS se estableció a 285°C. El pico de *trans*-retinol producido por este método, eluyó a aproximadamente 13 min (como gas acarreador se empleó helio y el metano como el gas de reacción). Se realizaron los escaneos en un radio de masa a carga (m/z) entre 260 y 280. La linealidad en la respuesta del sistema y el límite de detección del sistema se han analizado previamente (Tang et al., 1998).

La determinación del enriquecimiento total del retinol marcado se logró al integrar picos bajo los cromatogramas de masas reconstruidos a partir de los iones negativos a m/z entre 268-270 para el retinol sin marcar (H), m/z 271-273 para el retino D4 y m/z 274-278 para el retinol D8. Así, el cálculo para el porcentaje de enriquecimiento fue $[D/(H+D)] \times 100$.

Estimación de la reserva corporal de vitamina A (RCVA) empleando la técnica de dilución isotópica

La técnica de dilución isotópica se empleó en la medición basal de la reserva corporal total de vitamina A y al finalizar la intervención (**Figura 5**). Brevemente, los sujetos se presentaron en ayuno en el plantel escolar una hora previa a su horario de clases. Se proporcionó la dosis de vitamina A deuteriada, disuelta en 200 μ L de aceite de maíz y ésta se acompañó de un aperitivo alto en grasas y con bajo contenido de vitamina A (papas a la francesa) para promover la absorción de la dosis administrada. Para evaluar la efectividad de la absorción de la dosis, se recolectó una muestra de sangre 24 horas después de la administración de la vitamina A D4. Las muestras de sangre recolectadas 14 días después de la dosis (D4 o D8), se empleó para el cálculo de la reserva corporal total de vitamina A de acuerdo a la ecuación de Olson (Furr et al., 1989):

$$\text{RCVA (mmol de retinol)} = F \times \text{dosis} \times S \times a \times [(1/D:H)-1] \quad (1)$$

donde **F** expresa la eficiencia de almacenamiento de una dosis oral y se considera que tiene un valor de 0.5 (Bausch y Rietz, 1977), **dosis** es la cantidad (mmol) de vitamina A administrada oralmente, **S**, se estableció en un valor de 0.65, factor que corrige por desigualdades entre las concentraciones plasmáticas y hepáticas y se fundamenta en estudios realizados en ratas (Hicks et al., 1984). El factor **a** ajusta por el catabolismo de la dosis marcada durante el período de equilibrio, su valor se basa en el tiempo de vida media del recambio de vitamina A y se ha estimado que es de 32 días para niños de edad preescolar (Haskell et al., 2003). Finalmente, **D:H** es la relación isotópica del

retinol marcado y sin marcar en el suero y -1 corrige por la contribución de la dosis a la reserva hepática total de vitamina A.

Estimación de la reserva hepática de vitamina A

En los niños de edad preescolar, la reserva hepática puede estimarse al asumir que el peso del hígado es aproximadamente el 3% del peso corporal (Olson, 1987). Más aún, en una población con un estado nutricional adecuado, cerca del 90% del total de la vitamina A se almacena en el hígado. Sin embargo, en poblaciones con deficiencia de vitamina A, es posible que hasta el 50% del total de la vitamina A se almacena en diferentes tejidos (Olson, 1987). A pesar de que el presente estudio se desarrolló en un país en desarrollo, donde ocurren múltiples deficiencias nutricionales (Rivera et al., 2001), ninguno de los menores participantes cursó con niveles de vitamina A hepática menores al punto de corte establecido para deficiencia ($0.07 \mu\text{mol/g}$ hígado). Por lo anterior y para efecto de los cálculos, en nuestra población se asumió que el 90% de la RCVA se encontraba almacenada en el hígado (Olson, 1987).

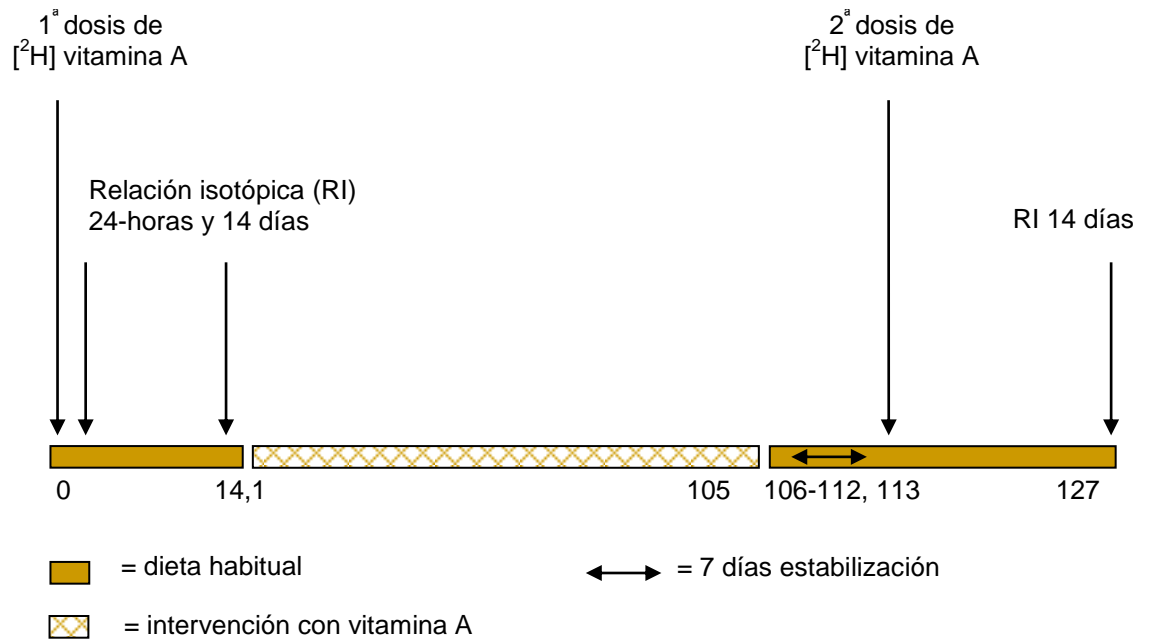


Figura 5. Protocolo completo para evaluar la reserva corporal de vitamina A en preescolares (Haskell y Ribaya-Mercado, 2005).

REFERENCIAS

- Barua A, Furr H. Properties of retinoids. *Molecular Biotechnology* 1998;10:167-82.
- Bausch J, Rietz P. Method for the assessment of vitamin A liver stores. *Acta Vitaminol Enzymol.* 1977;31:99-112
- Furr HC, Amedee-Manesme O, Clifford AJ, Bergen III H, Jones AD, Anderson DP, Olson JA. Vitamin A concentration in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans *Am J Clin Nutr.* 1989;49:713-6.
- Haskell M, Lembcke J, Salazar M, Green MH, Peerson J, Brown K. Population-based plasma kinetics of an oral dose of [2H4]-Retinyl acetate among preschool-aged, Peruvian children. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:681-6
- Haskell M, Ribaya-Mercado J, and the Vitamin A Tracer Task Force. Handbook on vitamin A tracer dilution methods to assess status and evaluate intervention programs. Harvest Plus Technical Monograph 5, 2005.
- Hicks VA, Gunning DB, Olson JA. Metabolism, plasma transport and biliary excretion of radioactive vitamin A and its metabolites as a function of liver reserves of vitamin A in the rat. *J Nutr.* 1984;114:1327-33
- Olson J. Should RDA values be tailored to meet the needs of their users? *J Nutr.* 1987;117:220-2
- Rivera J., Shamah, T., Villalpando, S., González de Cossio, T., Hernández B., Sepúlveda J. Encuesta nacional de nutrición estado nutricional de niños y mujeres en México 1999. Instituto Nacional de Salud Pública. 2001.
- Tang G, Qin J, Dolnikowski GG. Deuterium enrichment of retinol in humans determined by gas chromatography electron capture negative chemical ionization mass spectrometry. *J Nutr Biochem.* 1998;9:408-14
- Yeum, KJ, Booth S, Sadowski J, Liu C, Tang G, Krinski, N, Russell R. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:594:602