

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



TESIS DOCTORAL

Relación entre el estado del hierro y el remodelado óseo y efectos metabólicos del consumo de un alimento fortificado con hierro y vitamina D en mujeres con predisposición a anemia

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Toxqui Abascal

Directoras

M^a Pilar Vaquero
Ana M^a Pérez Granados

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



TESIS DOCTORAL

Relación entre el estado del hierro y el remodelado óseo y efectos metabólicos del consumo de un alimento fortificado con hierro y vitamina D en mujeres con predisposición a anemia

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Toxqui Abascal

Directoras

M^a Pilar Vaquero
Ana M^a Pérez Granados

Madrid, 2013



**Universidad Complutense de
Madrid**

Facultad de Farmacia

**Departamento de Nutrición y
Bromatología I**

**Consejo Superior de
Investigaciones Científicas**

**Instituto de Ciencia y
Tecnología de Alimentos y
Nutrición (ICTAN)**

**Departamento de
Metabolismo y Nutrición**

**Relación entre el estado del hierro y el remodelado óseo
y efectos metabólicos del consumo de un alimento
fortificado con hierro y vitamina D en mujeres con
predisposición a anemia**

TESIS DOCTORAL

LAURA TOXQUI ABASCAL

MADRID, Noviembre 2013

Tesis Doctoral presentada por

Laura Toxqui Abascal

Aspirante al grado de DOCTOR por la Universidad Complutense de Madrid

Directoras de la Tesis Doctoral,

Dra. M^a Pilar Vaquero

Departamento de Metabolismo y
Nutrición

Instituto de Ciencia y Tecnología de
Alimentos y Nutrición

Dra. Ana M^a Pérez Granados

Departamento de Metabolismo y
Nutrición

Instituto de Ciencia y Tecnología de
Alimentos y Nutrición

V^o B^o DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO

Fdo. Dra. Ana María López Sobaler

Este trabajo de investigación ha sido realizado con la ayuda de becas predoctorales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España), JAE-PRE, cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

También ha sido financiada por un proyecto del Plan Nacional: “Interacción entre los factores nutricionales y genéticos en la etiología de la ferropenia. Respuesta a un alimento funcional” NUTRICIÓN-GENÉTICA-HIERRO, (AGL 2009-11437).

Quisiera dedicar unas líneas a todas aquellas personas que de una u otra forma han estado conmigo, para agradecerles su esfuerzo, apoyo y colaboración.

Primero que nada, quiero agradecer a mis directoras de Tesis, Pilar y Ana. Pilar, gracias por estar siempre ahí y por todo tu apoyo. Gracias por ser mi guía, por compartir conmigo tu sabiduría, tu amor por la ciencia y tu entusiasmo por la vida. He tenido momentos muy difíciles y siempre has conseguido animarme con una palabra, con un abrazo o simplemente con una sonrisa. Sólo puedo decirte una cosa: ¡Gracias!

Anita, amore... ¡qué te puedo decir que no lo sepas ya! Has sido una parte fundamental en mi vida desde el momento en que te conocí. En este tiempo, hemos tenido de todo. Nunca olvidaré todas esas charlas, tus consejos, las bromas, y hasta aquellos momentos de “tragedias mundiales” y de “odio campesino” contra los kits. Tienes un gran corazón y me siento muy feliz de tenerte más que como directora, como amiga.

Quiero agradecer también a mi Roots. Pichona, ¿qué habría hecho sin tí? Gracias por tus consejos, por tus detalles y por aguantarme. Estoy segura de que llegarás a ser una gran investigadora, sigue luchando por tus sueños. También quiero agradecer a Ione, Jorgito Parra, Sara Lorigados y Leticia, gracias por esos madrugones y por hacer el día a día del estudio más llevadero. Su apoyo y colaboración han sido imprescindibles para la realización de esta Tesis.

A mis queridísimas fraguells Tamara, Belén y Fátima... Cuántas risas, anécdotas y cuántos mojitos han pasado desde que nos conocimos (y los que faltan), espero que nuestra amistad dure muchos años más. A mis compis del ICTAN, Tati, Rober, Ana Veses, Sonia, Alina, Bea, Espe, Esther, Aurora y Jorge Mujico. Muchas gracias por su compañerismo y su buena actitud, siempre con una sonrisa.

A Javi Romeo... tú ya lo sabes... Gracias...

Quiero agradecer también a Carmen González-Vizcayno por el apoyo con las analíticas, por ser siempre amable y paciente. A Concha de la Piedra y Laura Barrios, muchas gracias por la asesoría, he aprendido mucho de ustedes. También gracias a Santi y Stefanie por sus consejos a la distancia y por los buenos momentos que pasamos cada vez que nos vemos.

Muchas gracias también a mis voluntarias, sin las cuales no habría sido posible la realización de esta Tesis.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que han formado parte importante en mi vida. A mis jefes y compañeros de la Universitat de Barcelona, Montse, Xabier, José Antonio, Marià, Mar Grasa, Mar Romero, Ruth, Eva, Cris, Mercè y Laura, gracias

por haber sembrado en mí el gusto por la investigación y por haberme impulsado para tomar este camino. Carmen, gracias por tus enseñanzas en el laboratorio, pero sobre todo, gracias por haberme acogido y hecho sentir como en casa. Siempre te llevo en mi corazón.

A mis amigos mexicanos, Enrique, Soflora, Loreley, Ady, Tats, Claus y Anaís. Ni el tiempo ni la distancia nos separará. ¡Los quiero!

También quiero agradecer a mis hermanas españolas, Lucía y Belén por todos los “momentos sofá”, hemos formado una bonita familia en Villa Meléndez ☺. A Nacho, Jaime, Claris, Yojana, Jesús y Manu Scholter por su amistad incondicional.

Ale y Lina, chicas, ustedes han hecho de España un hogar para mí. Hemos compartido tantas cosas, que hay un lazo muy fuerte que nos une. No sé donde estaremos dentro de algunos años, pero estoy segura de que al final, siempre encontraremos un momento para reunirnos con una buena cena, con un vinito y con muchas risas (por lo menos una vez al año, siguiendo la tradición). Lina, ahora me toca a mí agradecerte por ser mi compañera de “truño”. Definitivamente ha sido mucho más divertido contigo.

A la familia González González, Carmen, Justo y Robertito, gracias por acogerme como una hija/hermana más. Gemmita, ¡qué te puedo decir!! Mi compañera de risas, juergas, compras, gimnasio, llantos, amores, desamores.... Al final, sé que encontrarás tu camino y serás muy feliz.

A mis hermanos, Claudia y Alejandro y a Juan Carlos, gracias por creer en mí y no dejarme caer. La vida ha sido más fácil teniéndolos a mi lado. A mis princesas, Vale y Pau, gracias por alegrarme cada día con esa sonrisa, nunca dejen de soñar.

Finalmente quiero agradecer a mis padres. Mami, gracias por tu infinito amor. Gracias por enseñarme que aunque la vida nos golpee duro, se puede salir adelante y volver a sonreír. Papi...¡¡¡Lo logramos!!!. Sé que donde estés, estarás sonriendo, pues en cada pensamiento y en cada momento de mi vida estás ahí. Eres el claro ejemplo de que con trabajo y constancia se puede llegar a donde se quiere. Tu mismo me decías que yo era tu clon ¿no? así que puedes sentirte orgulloso, porque finalmente lo hemos conseguido. A los dos, ¡los amo!.

Espero no haber olvidado a nadie. A todos ustedes,

¡¡GRACIAS!!

A mis padres, Patricia y Victor

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1.2.3. Otras funciones | 29 |
| 1.2.3.1. En el cerebro | 29 |
| 1.2.3.2. En el estado oxidativo | 30 |
| 1.2.3.3. En el metabolismo óseo | 31 |
| 1.3. Distribución del hierro en el organismo | 31 |
| 1.4. Metabolismo del hierro | 33 |
| 1.4.1. Absorción | 33 |
| 1.4.1.1. Absorción de hierro no hemo | 35 |
| 1.4.1.2. Absorción de hierro hemo | 38 |
| 1.4.2. Almacenamiento de hierro y transporte intracelular | 39 |
| 1.4.3. Transferencia de hierro a la circulación | 40 |
| 1.4.4. Reciclado de hierro | 40 |
| 1.4.5. Regulación de la homeostasis del hierro | 41 |
| 1.4.5.1. Hpcidina | 42 |
| 1.5. Biodisponibilidad | 46 |
| 1.5.1. Concepto de biodisponibilidad | 46 |
| 1.5.1.1. Factores dietéticos | 46 |
| 1.5.1.1.1. Estimulantes | 46 |
| 1.5.1.1.2. Inhibidores | 47 |
| 1.5.1.2 Factores del individuo | 49 |
| 1.5.1.2.1. Factores fisiológicos | 49 |
| 1.5.1.2.1. Factores genéticos | 50 |
| 1.6. Ingestas recomendadas de hierro | 51 |
| 1.7. Estrategias para la prevención de la anemia por deficiencia de hierro | 55 |
| 1.7.1. Modificación de la dieta | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 1.7.2. Suplementación | 57 |
| 1.7.3. Fortificación de los alimentos | 57 |
| 2. VITAMINA D | 62 |
| 2.1. Deficiencia de vitamina D | 62 |
| 2.1.1. Aspectos históricos | 62 |
| 2.1.2. Prevalencia de deficiencia de vitamina D y grupos de riesgo..... | 63 |
| 2.1.3. Consecuencias para la salud | 66 |
| 2.2. Nomenclatura de vitamina D..... | 67 |
| 2.3. Evaluación del estado de la vitamina D | 69 |
| 2.4. Metabolismo de la vitamina D..... | 70 |
| 2.4.1. Fuentes y absorción | 70 |
| 2.4.1.1. Síntesis cutánea | 70 |
| 2.4.1.2. Ingesta dietética y absorción | 72 |
| 2.4.2. Transporte..... | 73 |
| 2.4.3. Hidroxilación hepática | 74 |
| 2.4.4. Activación..... | 75 |
| 2.4.5. Excreción | 77 |
| 2.4.6. Regulación del metabolismo de la vitamina D..... | 78 |
| 2.4.6.1. Regulación por calcio, fósforo y hormona paratiroidea..... | 79 |
| 2.4.6.2. Regulación por otros factores..... | 79 |
| 2.5. Almacenamiento y toxicidad | 81 |
| 2.6. Funciones de la vitamina D | 81 |
| 2.6.1. Funciones en el metabolismo óseo | 81 |
| 2.6.1.1 Remodelado óseo | 81 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6.1.1.1. Regulación del remodelado óseo..... | 83 |
| 2.6.1.1.2. Valoración de la masa ósea y del remodelado óseo..... | 86 |
| 2.6.2. Funciones beneficiosas adicionales de la vitamina D..... | 88 |
| 2.6.2.1. Funciones en el sistema inmunológico..... | 88 |
| 2.6.2.2. Metabolismo de la glucosa..... | 89 |
| 2.6.2.3. Sistema cardiovascular | 90 |
| 2.6.2.4. Eritropoyesis | 90 |
| 2.6.2.5. Cáncer | 91 |
| 2.7. Ingestas recomendadas de vitamina D..... | 91 |
| 2.8. Estrategias para la prevención de la deficiencia de vitamina D | 93 |
| 2.8.1 Exposición al sol | 93 |
| 2.8.2 Suplementación | 94 |
| 2.8.3 Fortificación de alimentos..... | 95 |
| RESUMEN DE LOS ESTUDIOS Y DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA..... | 98 |
| 1. Estudios realizados..... | 101 |
| 2. Metodología empleada | 103 |
| 2.1. Bebidas fortificadas | 103 |
| 2.2. Sujetos..... | 104 |
| 2.3. Diseño e intervención nutricional..... | 105 |
| 2.4. Parámetros controlados | 106 |
| 2.4.1. Medidas antropométrica determinación de presión arterial, cuestionario de salud general y actividad física | 106 |
| 2.4.2. Cuestionarios ginecológicos..... | 107 |
| 2.4.3. Valoración de la dieta | 107 |
| 2.4.4. Determinaciones analíticas | 108 |

| | |
|---|-----|
| 2.4.4.1. Marcadores hematológicos y bioquímicos del estado de hierro | 108 |
| 2.4.4.2. Marcador del estado de la vitamina D (25-hidroxivitamina D) | 109 |
| 2.4.4.3. Marcadores del metabolismo óseo | 109 |
| 2.4.4.4 Parámetros del metabolismo lipídico y glucosa | 110 |
| 2.5. Estadística | 110 |
| PUBLICACIONES | 112 |
| 1. Bajas reservas de hierro como factor de una incrementada resorción ósea y efectos del consumo de una lácteo fortificado con hierro y vitamina d en el remodelado óseo en mujeres jóvenes españolas..... | 114 |
| 2. Efectos del consumo de una leche desnatada fortificada con hierro o hierro y vitamina D en el metabolismo del hierro: estudio aleatorizado, controlado, doble ciego en mujeres con deficiencia de hierro | 124 |
| 3. Cambios en la presión arterial y en los lípidos séricos en mujeres jóvenes por el consumo de una leche desnatada fortificada con vitamina D: estudio controlado aleatorizado..... | 136 |
| 4. Un cuestionario sencillo y práctico para la estimación de las pérdidas menstruales: relación con los parámetros hematológicos y ginecológicos de mujeres jóvenes | 149 |
| RESULTADOS NO PUBLICADOS | 167 |
| 1. Identificación de los principales factores dietéticos implicados en la biodisponibilidad del hierro y su asociación con los almacenes férricos en mujeres jóvenes | 169 |
| DISCUSIÓN GENERAL | 179 |
| CONCLUSIONES | 189 |
| BIBLIOGRAFÍA | 193 |

ABREVIATURAS

| | | | |
|----------------|--|--------------|--|
| 1,25OHD | 1,25-hidroxivitamina D, calcitriol | EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> / Agencia Europea de Seguridad Alimentaria |
| 24OHD | 24-hidroxivitamina D, ácido calcitroico | FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> / Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| 25OHD | 25-hidroxivitamina D, calcidiol | FGF23 | Factor de crecimiento de fibroblastos 23 |
| 7DHC | 7-dehidrocolesterol | FPN | Ferroportina |
| AI | <i>Adequate Intake</i> / Ingesta adecuada | HCM | Hemoglobina corpuscular media |
| Bb | Bilirrubina | HCP-1 | Heme carrier protein / proteína transportadora de hierro hemo |
| BMP | Proteína morfogenética ósea | HJV | Hemojuvelina |
| BMU | <i>Basic multicellular unit</i> / unidad multicelular básica | HO | Hemo-oxigenasa |
| Bv | Biliverdina | IGFs | <i>Insulin-like growth factors</i> / Factores de crecimiento de la insulina |
| CDC | <i>Center for Disease Control and Prevention</i> | IL-1 | Interleucina-1 |
| CO | Monóxido de carbono | IoM | <i>Institute of Medicine</i> / Instituto de Medicina |
| CTX | Telopéptido carboxilo terminal de colágeno tipo 1 | IR | Ingesta Recomendada |
| DBP | <i>Vitamin D binding protein</i> / proteína transportadora de vitamina D | IREs | <i>Iron-responsive elements</i> / elementos sensibles al hierro |
| Dcytb | <i>Duodenal cytochrome b</i> / citocromo duodenal b | IRPs | <i>Iron-regulatory proteins</i> / proteínas reguladoras de hierro |
| DEXA | Absorciometría dual de rayos X | M-CSF | Factor estimulante de colonia de macrófagos |
| DMT1 | <i>Divalent metal transporter</i> / Transportador de metales divalentes | NO | Óxido nítrico |
| EAR | <i>Estimated Average Requirement</i> / Requerimiento Medio Estimado | | |

| | | | |
|----------------|--|------------------|---|
| NTX | Telopéptido aminoterminal del colágeno tipo 1 | VDRE's | <i>Vitamin D response elements</i> / elementos de respuesta de vitamina D |
| OPG | Osteoprotegerina | | |
| P1NP1 | Péptido aminoterminal del colágeno tipo 1 | WHO / OMS | World Health Organization / Organización Mundial de la Salud |
| PTH | Parathormona | ZnPP | Zinc protoporfirina |
| QCT | Tomografía computarizada cuantitativa | | |
| RANK | Factor nuclear kappa B | | |
| RANKL | Receptor activador del RANK | | |
| RDA | <i>Recommended Dietary Allowances</i> / Ingestas dietéticas recomendadas | | |
| sTfR | Receptor soluble de la transferrina | | |
| Tf | Transferrina | | |
| TfR | Receptor de la transferrina | | |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante-β | | |
| TIBC | <i>Total iron binding capacity</i> / capacidad total de unión a hierro | | |
| TMPRSS6 | Matriptasa-2 | | |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral-α | | |
| UL | <i>Tolerable upper intake levels</i> / Ingestas máximas tolerables | | |
| UV | Rayos ultravioleta | | |
| VCM | Volumen corpuscular medio | | |
| VDR | <i>Vitamin D receptor</i> / receptor de la vitamina D | | |

RESUMEN - SUMMARY

El hierro y la vitamina D son dos micronutrientes esenciales para la vida. Por un lado, el hierro participa en múltiples procesos metabólicos, ya que se encuentra formando parte de enzimas y otros complejos moleculares; y por el otro, la vitamina D incrementa la absorción de calcio y fósforo, manteniendo también su equilibrio en el organismo y desempeñando un papel crucial en la salud ósea.

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de la relación entre el estado del hierro y el metabolismo óseo y en la valoración del consumo de un alimento fortificado con hierro y vitamina D, respecto al mismo fortificado sólo con hierro, sobre el metabolismo del hierro, el metabolismo óseo y otros biomarcadores, en mujeres jóvenes. Para ello se realizaron estudios de asociaciones entre los marcadores del estado de hierro y los del remodelado óseo, la 25-hidroxivitamina D (25OHD, principal marcador del estado de la vitamina D en sangre) y la parathormona, en 165 mujeres sanas caracterizadas por sus almacenes de hierro. También se valoró la ingesta de alimentos, energía y nutrientes de estas mujeres, y se estimaron sus pérdidas menstruales, relacionando todo ello con su estado de hierro. Además, se realizó un ensayo aleatorizado, controlado, doble ciego en las que presentaban riesgo de anemia (ferritina sérica <30 ng/mL), distribuidas en dos grupos paralelos, y se valoraron los efectos del consumo durante 16 semanas, como parte de la dieta habitual, de una bebida láctea fortificada con hierro o con hierro y vitamina D, sobre el metabolismo del hierro, el metabolismo óseo, el perfil lipídico, la glucosa y la presión arterial.

Los resultados obtenidos indican que la deficiencia de hierro está relacionada con un aumento del remodelado óseo en estas mujeres, encontrándose asociaciones negativas entre la ferritina sérica y el marcador de resorción ósea (NTx); y entre la transferrina, principal transportador de hierro que aumenta en situación de deficiencia, y el marcador de formación ósea (P1NP). Además, las mujeres con riesgo de anemia, presentaron valores de NTx casi tres veces más elevados respecto a las mujeres sin riesgo. Por otro lado, todas las voluntarias, independientemente de su estado de hierro, mostraron una ingesta de energía, macronutrientes y micronutrientes similar. Sin embargo, el consumo de carne roja fue más alto en las mujeres con mejor estado de hierro, y constituyó el factor dietético más importante

relacionado con la ferritina sérica. En relación a la estimación de las pérdidas menstruales, se diseñó un cuestionario, a partir del cual se calculó un score (MBL-score). Se demostró la alta reproducibilidad del MBL-score y que dicho score fue superior en aquellas mujeres que presentaban mayores pérdidas menstruales e inferiores almacenes corporales de hierro.

Tras la intervención nutricional, se obtuvo que el consumo de las bebidas lácteas fortificadas con hierro no mejoró el estado de hierro de las voluntarias, a pesar de haberse elegido la forma microencapsulada de hierro para la fortificación del alimento. Sin embargo, la fortificación con vitamina D condicionó una leve mejora en algunos parámetros hematológicos (eritrocitos, hematocrito y hemoglobina en la semana 8).

Respecto al metabolismo óseo, se encontró que las voluntarias, reclutadas de acuerdo a su estado de hierro, presentaron una alta prevalencia de deficiencia o insuficiencia de vitamina D, siendo en el 76% de ellas los niveles de 25OHD inferiores a 75 nmol/L (<30 ng/mL). El consumo de la bebida láctea fortificada con vitamina D fue capaz de aumentar las concentraciones de 25OHD hasta niveles cercanos a la concentración óptima, y se constató que el remodelado óseo se redujo significativamente. En cuanto a los resultados obtenidos en relación a los lípidos séricos y la presión arterial, se obtuvo que el estado de la vitamina D se relacionó inversamente con el colesterol total y el LDL-colesterol, y que la intervención con la vitamina D, frente a su placebo, ocasionó una disminución de la presión arterial sistólica y diastólica en estas mujeres.

Iron and vitamin D are essential micronutrients for life. On one hand, iron is involved in multiple metabolic processes, as it is part of enzymes and other molecular complexes; and on the other, vitamin D increases calcium and phosphate absorption, maintains body mineral balance, and therefore, plays an important role on bone health.

This Thesis focuses in the study of the relationship between iron status and bone metabolism, and assesses the effects of the consumption of an iron and vitamin D-fortified food product, compared to the same fortified only with iron, on iron and bone metabolism and other biomarkers in young women. Moreover, association studies were carried out between iron status markers and bone remodeling markers, serum 25-hydroxyvitamin D (25OHD, main marker of vitamin D status) and parathormone, in 165 healthy women with different iron stores. The habitual food, energy and nutrient intakes of these women and their menstrual blood losses were also assessed and all the above was related to their iron status. In addition, a randomized, controlled, double-blind, parallel-groups trial was carried out during 16 weeks, in those women who presented risk of iron deficiency anemia (serum ferritin < 30 ng/mL), to evaluate the consumption, as part of their usual diet, of an iron-fortified or an iron and vitamin D-fortified skimmed milk on iron and bone metabolism, lipid profile, glucose and blood pressure.

The obtained results indicate that iron deficiency is associated with increased bone remodeling in these women; there were negative associations between serum ferritin and the bone resorption marker (NTx); and between transferrin, principal iron transporter to tissues, and the bone formation marker (P1NP). Moreover, women with iron deficiency anemia risk showed NTx values almost three times higher compared to women without risk. Regarding the diet, volunteers presented similar energy, macro- and micronutrient intakes regardless their iron status. However, the consumption of red meat was higher in women with higher iron stores and was the most important dietary factor related to serum ferritin in this group of women. Regarding the estimation of iron blood loss, a questionnaire was developed and a score was calculated (MBL-score), which was highly reliable. The MBL-score was higher in women with higher blood loss and lower iron stores.

After the nutritional intervention, it was observed that the consumption of the fortified dairy products did not improve the iron status of the women, despite having chosen for the fortification the microencapsulated iron form. Nevertheless, vitamin D fortification slightly enhances some hematological parameters (erythrocytes, hematocrit and hemoglobin at week 8).

Regarding bone metabolism, it was found that the volunteers, recruited according to their iron status, showed a high prevalence of vitamin D deficiency or insufficiency, 76% of them had values of 25OHD below 75 nmol/L (<30 ng/mL). The consumption of the vitamin D-fortified dairy product was capable to increase serum 25OHD to nearly reach an optimal level, and significantly reduced bone remodeling. The results concerning serum lipids and blood pressure reveal that vitamin D status was negatively associated with total cholesterol and LDL-cholesterol, and that due to the intervention with vitamin D, compared to its placebo, a decrease of the systolic and diastolic blood pressure was observed in these women.

INTERÉS Y OBJETIVOS

La anemia es la situación en la que existe una disminución de la concentración de glóbulos rojos y de la concentración de hemoglobina, con un deterioro de la capacidad para el transporte de oxígeno. Entre las diferentes causas que pueden producirla, se encuentran las deficiencias nutricionales, siendo la más frecuente la deficiencia de hierro, que ocasiona anemia ferropénica. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un total de 1500 a 1740 millones de personas en el mundo padecen anemia por deficiencia de este mineral, lo que supone el 24.8% de la población.

Una deficiencia leve o moderada de hierro, incluso sin haberse desarrollado anemia, tiene consecuencias adversas para la salud, tales como disminución de la función cognitiva, disminución del rendimiento físico e intelectual y alteraciones en el sistema inmunitario, entre otros. Además, la anemia ferropénica es multifactorial y ocurre cuando la ingesta de hierro es insuficiente y/o de escasa biodisponibilidad o cuando las pérdidas del mineral exceden a su aporte. Entre los factores más importantes destacan los nutricionales, patológicos, fisiológicos y genéticos, siendo las mujeres en edad fértil, uno principales grupos de riesgo debido a las pérdidas de hierro que causa la menstruación.

La prevención de la anemia ferropénica es una de las prioridades de la OMS desde hace más de una década. Dentro de las estrategias para corregir la deficiencia de hierro se incluyen: modificación o diversificación de la dieta para aumentar la biodisponibilidad del hierro; suplementación con hierro, sin modificar la dieta habitual; y fortificación de alimentos, siendo esta última la medida de prevención más práctica, sostenible y rentable a largo plazo. Así, la fortificación podría ser una estrategia útil para aumentar la ingesta de hierro en poblaciones con mayores requerimientos de este mineral, siendo además la intervención más segura según manifiesta la OMS.

Sin embargo, la fortificación de los alimentos con hierro, no es siempre fácil de lograr y continúa siendo un reto para la industria. En este sentido, mediante la microencapsulación de compuestos de hierro en liposomas se consigue que el metal tenga un tamaño pequeño de partícula y quede envuelto por una cobertura fosfolipídica. Esto tiene el objetivo de reducir las interacciones del hierro con otros componentes de los alimentos que pueden inhibir su absorción, y aumentar su

biodisponibilidad. Por ello, es de gran interés probar la eficacia de esta forma de hierro microencapsulada incluida en alimentos que sean accesibles y que se puedan integrar en la dieta habitual de la población de riesgo.

Otra deficiencia de gran prevalencia a nivel mundial, considerada también como un problema de salud pública, es la deficiencia de vitamina D. Los principales factores de riesgo para desarrollarla, están asociados con una baja ingesta dietética e insuficiente exposición solar.

Sin vitamina D, únicamente el 10-15 % del calcio dietético y aproximadamente el 60 % del fósforo son absorbidos, por lo que, como es bien sabido, la principal consecuencia de la deficiencia de esta vitamina es el desarrollo de enfermedades relacionadas con el metabolismo óseo. Además, se ha visto que la forma activa de la vitamina D, directa o indirectamente, influye en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y angiogénesis, lo que le confiere un papel importante en la homeostasis de diversos sistemas y en la prevención de ciertas enfermedades. Recientemente se ha propuesto una relación entre las deficiencias de hierro y de vitamina D. Sin embargo, se necesitan más estudios para profundizar en las acciones de los metabolitos de la vitamina D y su interacción en el metabolismo del hierro. Además, se carece de estudios sobre la posible sinergia de la fortificación con hierro y vitamina D en humanos.

Dentro de las estrategias para prevenir la deficiencia de vitamina D, se encuentran la exposición a los rayos ultravioleta y la ingesta dietética. Sin embargo, esto no es siempre posible de lograr, pues en lo que se refiere a la exposición a los rayos UV, depende del lugar donde se encuentre el sujeto (latitud) y la estación del año (invierno); y en cuanto a la ingesta dietética, son pocos los alimentos que naturalmente contienen vitamina D y la ingesta suele ser insuficiente en la mayoría de la población. Por ello, la fortificación de los alimentos parece ser una estrategia útil para prevenir la deficiencia de vitamina D y potenciar sus efectos beneficiosos. La eficacia de la fortificación de alimentos con vitamina D ha sido ampliamente estudiada, demostrándose que incrementa las concentraciones de 25-hidroxivitamina D de una manera dosis-dependiente. En la actualidad un gran número de alimentos son

fortificados con vitamina D, sin embargo, aún es necesario profundizar y realizar más estudios controlados aleatorizados que muestren datos más sólidos sobre el efecto de alimentos fortificados con esta vitamina en las concentraciones séricas de 25-hidroxivitamina D, la prevención de la deficiencia y los beneficios adicionales sobre la salud.

Teniendo en cuenta todas estas premisas, para el desarrollo de la Tesis Doctoral se plantearon los siguientes **OBJETIVOS:**

- 1.** Conocer si existe relación entre el metabolismo del hierro y el metabolismo óseo en mujeres jóvenes, valorado a través del estudio de asociación entre los parámetros hematológicos y bioquímicos del estado del hierro y los marcadores de remodelado óseo, parathormona y 25-hidroxivitamina D.
- 2.** Determinar, mediante un ensayo aleatorizado doble ciego controlado con placebo, la influencia del consumo de una bebida láctea fortificada con hierro y vitamina D o solo con hierro, sobre el remodelado óseo en mujeres con predisposición a anemia ferropénica.
- 3.** Valorar si la inclusión en la dieta habitual de una bebida láctea fortificada con hierro y vitamina D, respecto a la misma fortificada con hierro, mejora el estado del hierro en mujeres deficiencia de hierro.
- 4.** Conocer si la ingesta como parte de la dieta habitual, de la bebida fortificada con vitamina D frente a su placebo sin la vitamina, modifica los lípidos séricos, la presión arterial y la glucosa; y si existe relación entre el estado de la vitamina D y el perfil lipídico, en mujeres jóvenes.
- 5.** Desarrollar un método práctico para estimar las pérdidas menstruales mediante un *score* procedente de un cuestionario, y validarlo mediante parámetros hematológicos y bioquímicos en mujeres en edad fértil.
- 6.** Conocer si existe relación entre la dieta habitual, valorada por un cuestionario de frecuencia de consumo, y el estado de los almacenes de hierro en mujeres jóvenes

INTRODUCCIÓN

1. HIERRO

1.1. Deficiencia de hierro y anemia ferropénica

La anemia es una situación en la que existe una disminución de la concentración de glóbulos rojos o de la concentración de hemoglobina, con un deterioro de la capacidad para el transporte de oxígeno (McLean et al., 2009). Entre las diferentes causas que pueden producir anemia, se encuentran las deficiencias nutricionales, siendo la más frecuente la deficiencia de hierro que ocasiona anemia ferropénica. Se estima que el 50% de todas las anemias diagnosticadas son debidas a un déficit de este mineral, lo que implica una causa importante de morbilidad y mortalidad (Vaquero et al., 2012).

1.1.1. Prevalencia de anemia y grupos de riesgo

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un total de 1500 a 1740 millones de personas en el mundo padecen anemia por deficiencia de este mineral, lo que supone el 24,8% de la población (WHO, 2008).

La deficiencia de hierro es multifactorial, ya que pueden influir en su desarrollo factores fisiológicos, nutricionales, patológicos y genéticos, y ocurre cuando la ingesta de hierro es insuficiente y de mala calidad o las pérdidas de hierro exceden a su aporte (Pasricha et al., 2010). Determinados grupos de población tienen un mayor riesgo de desarrollar deficiencia de hierro y en los casos más graves, anemia ferropénica (Vaquero et al., 2012).

Los bebés prematuros o de bajo peso al nacer, niños en etapa preescolar y adolescentes, son considerados grupos de riesgo debido a la expansión eritrocitaria que es necesaria durante el crecimiento (Pasricha et al., 2010). La prevalencia de anemia en niños de 5 a 14 años es de 5.9% y 48.1% en países desarrollados y en vías de desarrollo, respectivamente (WHO, 2001).

Las mujeres embarazadas son otro grupo de riesgo de padecer anemia. Son pocas las mujeres que inician su embarazo con reservas de hierro suficientes ya que debido a las menstruaciones o embarazos previos, las pueden haber agotado. Por este motivo, y en combinación con el aumento de las demandas debido a los requerimientos del feto en desarrollo, se convierten en un grupo vulnerable. Cabe señalar que se necesitan 2 años de un consumo adecuado de hierro dietético para reemplazar el hierro perdido durante un embarazo además de ser necesario un almacén previo de hierro de al menos 500 mg para evitar su deficiencia en la gestación, el cual, está presente sólo en el 20% de las mujeres (Strong, 2010). Así, el 75% de las anemias diagnosticadas durante el embarazo son causadas por deficiencia de hierro, lo que se estima afecta al 50% de las mujeres embarazadas a nivel mundial, siendo el 18% y el 56% de las gestantes que viven en países industrializados y en vías de desarrollo, respectivamente. Las tasas de deficiencia de hierro durante el embarazo van incrementando con cada trimestre, comenzando con un 9% en el primero, un 14% en el segundo, y un 37% en el tercer trimestre (Strong, 2010).

En la población adulta, excluidas las mujeres embarazadas, la anemia es causada principalmente por las pérdidas sanguíneas. Cada mililitro de sangre perdido, asumiendo una hemoglobina de 15 mg, ocasiona una pérdida de 0,5 mg de hierro corporal. Por ello, las mujeres en edad fértil constituyen uno de los principales grupos de riesgo de padecer anemia ferropénica, debido a las pérdidas menstruales. En este grupo de población, la concentración de ferritina sérica, marcador de los almacenes de hierro en el cuerpo, permanece constantemente baja desde la adolescencia hasta la menopausia en muchas de ellas. A partir de ese momento, se observa un aumento gradual de ferritina. Con una esperanza de vida de 77 años, una media de edad de menarquia de 13 años y de menopausia de 50, las mujeres tienen pérdidas menstruales durante aproximadamente 37 años de su vida (Milman et al., 1992; Milman et al., 1998). La pérdida media de hierro debido a la menstruación en mujeres europeas es de aproximadamente 0,45 mg al día, con pérdidas de 0,85, 1,35 y 1,75 mg al día en los percentiles 75, 90 y 95 respectivamente (Hallberg et al., 1966). La

prevalencia de anemia ferropénica en mujeres menstruantes es de 22,7% y 52% en países desarrollados y en vías de desarrollo, respectivamente (WHO, 2001).

Por otra parte, las pérdidas sanguíneas gastrointestinales son la principal causa de anemia en mujeres postmenopáusicas y en hombres. Generalmente son pérdidas ocultas crónicas cuyo diagnóstico se realiza cuando se han descartado otras causas de ferropenia y la anemia ya es manifiesta (úlceras gástricas, hemorroides, etc.) (Pasricha et al., 2010).

Otras patologías asociadas a la deficiencia de hierro son aquellas que causan malabsorción del mineral, tales como desórdenes de la mucosa gastrointestinal (enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colon irritable), o alteración de la secreción del ácido gástrico, incluyendo el uso fármacos inhibidores de la bomba de protones (antiácidos), y procedimientos quirúrgicos como el bypass gástrico o intestinal (Goddard et al., 2000).

Otro grupo de riesgo son los atletas de alto rendimiento, en los que se ha descrito la anemia del deportista. Se ha descrito que las pérdidas de hierro en este grupo de población pueden ser consecuencia de una serie de sucesos originados durante la práctica del ejercicio, tales como hematuria, sudoración y sangrado gastrointestinal. El posible mecanismo que podría originar la deficiencia de hierro en los atletas se explicaría a través de una respuesta inflamatoria de fase aguda provocada por el ejercicio. Se ha demostrado que niveles elevados de citoquinas, aumentan la producción hepática de hepcidina, hormona reguladora de la absorción intestinal de hierro, con la consecuente disminución de la absorción de hierro (Peeling et al., 2008).

Los vegetarianos o las personas que siguen dietas con bajo contenido calórico, son también un grupo de población con riesgo de padecer anemia ferropénica debido a que su ingesta de hierro en cuanto a calidad o cantidad puede verse comprometida (Alexander et al., 1994).

1.1.2. Consecuencias de la deficiencia de hierro para la salud

La deficiencia de hierro leve o moderada, incluso sin anemia, tiene consecuencias adversas para la salud (WHO, 2001) tales como:

- Retraso en el crecimiento, lo que tiene repercusiones importantes en el caso del desarrollo intrauterino y en niños en etapa preescolar.
- Disminución del desarrollo psicomotor, función cognitiva y rendimiento intelectual.
- Disminución del rendimiento físico. Un 10-20% de reducción del volumen de oxígeno supone hasta un 10% de descenso del rendimiento.
- Alteraciones en el sistema inmunitario.
- En el embarazo, incremento del riesgo de parto pretérmino, bajo peso del recién nacido y aumento de la mortalidad perinatal de la madre y del hijo.

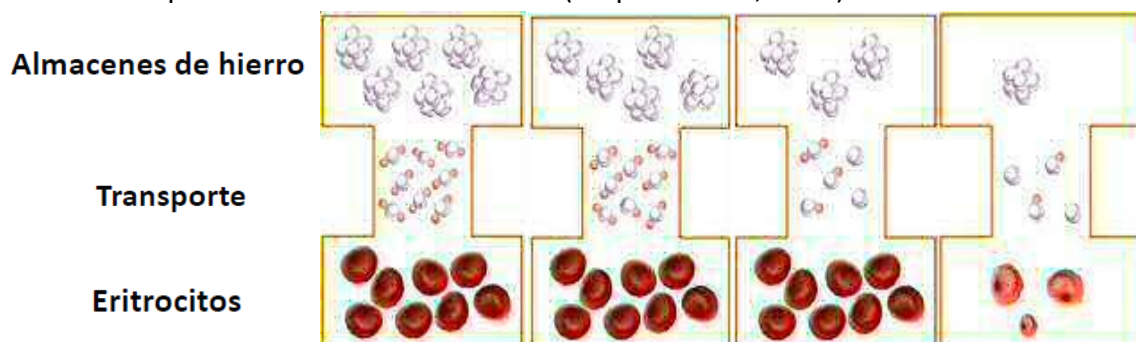
Además, asociados con la anemia ferropénica se han descrito disfunción gastrointestinal y patrones alterados endocrinológicos y metabólicos, incluyendo la producción de neurotransmisores y hormonas tiroideas, lo que conlleva alteraciones neurológicas, musculares, óseas y de termorregulación. Los mecanismos implicados se relacionan con el papel del hierro en numerosos sistemas enzimáticos y en la replicación y reparación del ADN (Elledge et al., 1992; WHO, 2001).

1.1.3. Definición y etapas

La deficiencia de hierro ocurre en etapas de progresiva intensidad (Tabla 1). Primero se agotan los almacenes de hierro, situación que se caracteriza por una disminución de la ferritina sérica. En esta fase, los tejidos que necesitan hierro aún son capaces de realizar sus funciones fisiológicas normales. Si el aporte insuficiente continúa, se produce una situación de deficiencia de hierro, donde se ve comprometida la eritropoyesis. En este estado, el hierro es insuficiente para mantener las funciones fisiológicas normales de tejidos tales como la sangre, el cerebro y los músculos. Puede existir deficiencia de hierro en ausencia de anemia cuando no ha durado el tiempo suficiente o no ha sido lo suficientemente grave como para provocar que la concentración de hemoglobina caiga por debajo del umbral específico del sexo y grupo

de edad del que se trate. En ese momento, el receptor de la transferrina aumenta en proporción al grado de deficiencia y posteriormente se observa un aumento de la transferrina y disminución de su saturación. Finalmente, si el balance negativo continúa, se llega a una situación de anemia ferropénica, donde la disminución de hemoglobina determina que los glóbulos rojos no sean capaces de aportar suficiente oxígeno a los tejidos periféricos.

Tabla 1. Etapas de la deficiencia de hierro (Vaquero et al., 2012)



| | NORMAL | DEPÓSITOS FÉRRICOS DISMINUÍDOS | DEFICIENCIA DE HIERRO | ANEMIA FERROPÉNICA |
|---|--------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Hemoglobina (g/dL) | N | N | N | ↓ |
| Hematocrito (%) | N | N | N | ↓ |
| VCM (fL) | N | N | N | ↓ |
| HCM (pg) | N | N | N | ↓ |
| Índice de distribución de hematíes (%) | N | N | N | ↑ |
| ZnPP (μmol/mol hemo) | N | N | ↑ | ↑ |
| Ferritina (ng/mL) | N | ↓ | ↓↓ | ↓↓ |
| Hierro sérico (μg/dL) | N | N | ↓ | ↓ |
| Transferrina (mg/L) | N | N | ↑ | ↑ |
| Saturación de la transferrina (%) | N | N | ↓ | ↓ |
| sTfR (mg/L) | N | N | ↑ | ↑ |

N: normal; ↑: aumentado; ↓: disminuido; ↓↓: muy disminuido; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; ZnPP: Zinc protoporfirina eritrocitaria; sTfR: receptor soluble de la transferrina.

En términos clínicos, la anemia se define como la situación en la que existe una masa eritrocitaria insuficiente, mientras que en términos de salud pública, se refiere a la situación en la que la concentración de hemoglobina se encuentra por debajo de los puntos de corte establecidos por la OMS. Estos valores se establecen en el percentil 5 de la concentración de hemoglobina de la población sana del mismo sexo y grupo de edad. Además, la anemia también se puede clasificar de acuerdo a su grado de severidad (Tabla 2) (WHO 2007).

Tabla 2. Diagnóstico de la severidad de la anemia en función de la concentración de hemoglobina (WHO, 2011a).

| Población | Sin anemia ferropénica* | Anemia ferropénica* | | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------|------------|--------|
| | | Leve** | Moderada | Severa |
| Niños, 6 meses - 5 años | ≥11.0 | 10.0 - 10.9 | 7.0 - 9.9 | < 7.0 |
| Niños, 5-11 años | ≥11.5 | 11.0 - 11.4 | 8.0 - 10.9 | < 8.0 |
| Niños, 12-14 años | ≥12.0 | 11.0 - 11.9 | 8.0 - 10.9 | < 8.0 |
| Mujeres no embarazadas, ≥15 años | ≥12.0 | 11.0 - 11.9 | 8.0 - 10.9 | < 8.0 |
| Mujeres embarazadas | ≥11.0 | 10.0 - 10.9 | 7.0 - 9.9 | < 7.0 |
| Hombres, ≥ 15 años | ≥13.0 | 11.0 - 12.9 | 8.0 - 10.9 | < 8.0 |

* Hemoglobina expresada en g/dL

**Leve: la deficiencia de hierro ha progresado para cuando se detecta anemia.

Clínicamente la anemia ferropénica se caracteriza por ser microcítica e hipocrómica, es decir los glóbulos rojos son de menor volumen y presentan un menor contenido de hemoglobina (WHO, 2007; Olivares et al., 2010; Strong, 2010).

Los pacientes con deficiencia de hierro a menudo son asintomáticos. La Tabla 3 muestra los signos y síntomas de la deficiencia de hierro y de anemia ferropénica (Zimmermann y Hurrell, 2007; Strong, 2010).

Tabla 3. Signos y síntomas de deficiencia de hierro y anemia ferropénica

| | Síntomas | Signos |
|-----------------------|---|---|
| Deficiencia de hierro | Irritabilidad Baja concentración intelectual Cansancio y fatiga Disminución en la tolerancia al ejercicio | Ninguno |
| Anemia ferropénica | Cansancio y fatiga Disminución de la tolerancia al ejercicio Dificultad para respirar en el ejercicio Palpitaciones Dolor de cabeza Disfagia Pica | Palidez Glositis (inflamación de la lengua). Estomatitis angular (lesión en la comisura labial) Coiloniquia (deformación y fragilidad de las uñas) |

La pica es un trastorno de la conducta alimentaria del que se conoce muy poco, pero que se ha relacionado con la falta de hierro. Se define como el consumo constante e inadecuado de sustancias no nutritivas durante un período de al menos un mes. Aunque la causa es desconocida, se dice que puede deberse a la carencia de hierro y zinc. Se ha descrito pica y déficit de hierro en niños, mujeres embarazadas y personas con sangrados digestivos, entre otros. La suplementación con hierro resuelve la pica incluso antes de verse corregida la anemia (Viguria Padilla y Mijan de la Torre, 2006).

1.1.4. Marcadores de diagnóstico

Es importante distinguir la anemia por deficiencia de hierro de otras causas de anemia debido a que su tratamiento es simple, efectivo y seguro (Pasricha et al., 2010).

En enero del 2004 la OMS y el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), llegaron a un consenso internacional acerca de los biomarcadores del estado de hierro que fueran prácticos en su medición y cuya alteración pudiera indicar una posible deficiencia de hierro. Los cinco parámetros que eligieron como imprescindibles para determinar el estado de hierro de un individuo fueron: hemoglobina, volumen corpuscular medio, ferritina sérica, zinc protoporfirina y el receptor soluble de transferrina (WHO, 2007). Sin embargo, existe un gran número de indicadores cuya alteración puede indicar una posible deficiencia de hierro.

1.1.4.1. Índices de los glóbulos rojos

En la investigación y en la clínica, se emplean distintos índices de los glóbulos rojos para el estudio del estado de hierro. Sin embargo, ninguno es capaz de diagnosticar deficiencia de hierro por sí solo. Puede haber confusión cuando el individuo tiene α - o β - talasemia, enfermedades genéticas caracterizadas por la producción desequilibrada de las cadenas de globina, generando una disminución en la síntesis de hemoglobina, o bien en individuos que además de padecer deficiencia de hierro, tienen deficiencia de vitaminas B12 y folato, o anemia sideroblástica (Thomas et al., 2013).

1.1.4.1.1. Hemoglobina

La hemoglobina refleja la cantidad del principal transportador de oxígeno en la sangre y se expresa por 100 mL de sangre total (g/dL). Es considerado el principal parámetro para detectar anemia (Beutler y Waalen, 2006), aunque por sí solo tiene poca especificidad y sensibilidad. La especificidad es baja porque aquellos individuos que tienen sus niveles de hemoglobina basal por encima del rango de normalidad, necesitan perder del 20 al 30 % de hierro, antes de que su hemoglobina disminuya hasta los puntos de corte específicos para anemia (Tabla 2). La baja sensibilidad del parámetro se debe a que existen otras causas de anemia que no son causadas por la deficiencia de hierro (Cook, 2005; Zimmermann, 2008).

Las concentraciones de hemoglobina circulante pueden verse modificadas por factores como la etnia (Beutler y Waalen, 2006), la altitud del lugar donde se viva y el tabaquismo (*Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 1998). Diversos estudios afirman que las personas de raza negra tienen concentraciones de hemoglobina significativamente menores (CDC, 1989; Johnson-Spear y Yip, 1994). En altitudes superiores a 3000 pies (914,4 metros), disminuye la presión de oxígeno, la saturación de oxígeno de la sangre y aumenta la producción de glóbulos rojos (CDC, 1998). Finalmente, para el colectivo de fumadores, los puntos de corte de hemoglobina se deberían elevar, ya que la hemoglobina es capaz de ligar monóxido de carbono (CO) del mismo modo que el oxígeno, lo que hace que el CO sea un potente inhibidor competitivo de la unión de oxígeno. Esto se debe a que el tamaño de las

moléculas, su apolaridad y su posibilidad de formar enlaces de coordinación con el hierro del grupo hemo son semejantes. Así, al fumar un cigarrillo, la hemoglobina se une con el monóxido de carbono producido, formando un compuesto llamado carboxyhemoglobina, el cual no tiene capacidad de transportar oxígeno (Vera, 2010).

1.1.4.1.2. Hematocrito y número de hematíes

El hematocrito es el porcentaje de glóbulos rojos intactos en una muestra de sangre total, y el número de hematíes es el número de glóbulos rojos contenido en un volumen específico de sangre, expresado normalmente como millones de glóbulos rojos por microlitro de sangre total (Ruiz-Arguelles, 2009). Estos dos parámetros disminuyen en situaciones de deficiencia de hierro y anemia, aunque su determinación no aporta ninguna información extra sobre la anemia ferropénica que no haya sido obtenida con la hemoglobina (WHO, 2008). Clínicamente se acepta que un 3% de disminución del hematocrito, equivale a perder 1 “unidad” de sangre (en términos de transfusión) o 1 g/dL de hemoglobina. Sin embargo, esta proporción no es exacta teniendo en cuenta que una unidad de sangre puede estar en un rango de 250 a 350 mL (Elzik et al., 2006).

1.1.4.1.3. Volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media

Tanto el volumen corpuscular medio (VCM) como la hemoglobina corpuscular media (HCM) dan información de las características morfológicas de los eritrocitos. Son indicadores fiables de la anemia por deficiencia de hierro, salvo en aquellos casos donde coexisten células pequeñas y grandes, como es el caso de la combinación de deficiencias de hierro y de folato o vitamina B₁₂ (Bothwell y Charlton, 1981; Vaquero et al., 2012; Remacha et al., 2013).

Si los glóbulos rojos son más pequeños de lo normal, existe anemia por deficiencia de hierro (microcítica) y si son más grandes, es un indicador de anemia por deficiencia de vitamina B₁₂ o folato (macrocítica) (WHO, 2007).

La hemoglobina corpuscular media (HCM) disminuye cuando las reservas de hierro están comprometidas y la deficiencia de hierro ya se ha producido. Sin embargo, no recupera sus valores normales hasta algún tiempo después de que la deficiencia se haya resuelto (WHO, 2001).

El diagnóstico de la anemia con niveles bajos de VCM (< 85 fl) y HCM (< 72 pg), implica que la síntesis de hemoglobina ha sido inhibida por una reducción del suministro de hierro al eritrocito. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en situaciones como la talasemia menor o la anemia por inflamación, la disminución de hemoglobina se presenta con cambios morfológicos de los eritrocitos similares a los de la anemia ferropénica (Bothwell y Charlton, 1981).

1.1.4.1.4. Índice de distribución de hematíes

El índice de distribución de hematíes es un porcentaje que indica la dispersión o variabilidad del tamaño de los glóbulos rojos y se calcula como el cociente entre la desviación estándar del VCM y su media aritmética multiplicada por 100, es decir, es el cálculo de un coeficiente de variación. Un valor elevado indica que el tamaño de los eritrocitos varía mucho, generalmente por la presencia de glóbulos normales y pequeños, lo que puede ser útil para detectar tanto estados tempranos de deficiencia de hierro, cuando el tamaño de los eritrocitos empieza a disminuir, como el comienzo de su recuperación, cuando el tamaño de los glóbulos rojos comienza a aumentar (Romero Artaza et al., 1999; Dugdale, 2006).

1.1.4.1.5. Zinc protoporfirina eritrocitaria

Cuando existe escasez de hierro en las últimas etapas de la formación de la hemoglobina, en lugar de insertarse una molécula de hierro a la protoporfirina, se inserta una molécula de zinc. El parámetro de zinc protoporfirina, por tanto, es una medida de la severidad de la deficiencia de hierro (WHO, 2007).

Este parámetro puede ser útil en situaciones como deficiencia funcional de hierro, donde las reservas de hierro son adecuadas pero no pueden ser movilizadas para realizar funciones como la eritropoyesis, debido a que la hepcidina, principal regulador

del metabolismo del hierro, como se expondrá más adelante, se encuentra elevada (Hansen y Hansen, 1986; Besarab et al., 2000). Sin embargo, la determinación no es de rutina en los laboratorios hematológicos, en parte porque tampoco es específica de deficiencia de hierro, ya que también se eleva en situaciones de anemias hemolíticas, por inflamación, así como por intoxicación por plomo (Lamola et al., 1975; Grandjean y Lintrup, 1978).

1.1.4.2. Ferritina sérica

La ferritina sérica es una medida de la cantidad de hierro almacenado en el cuerpo, siempre y cuando no exista una infección concurrente (WHO, 2007). Una concentración de ferritina por debajo de 15 ng/mL, es diagnóstico de deficiencia de hierro, mientras que valores 15 - 30 µg/L sugieren que las reservas de hierro están disminuidas (Guyatt et al., 1992). Cada microgramo por litro de ferritina sérica, corresponde a 7-7.5 mg de reserva de hierro corporal (Milman y Kirchhoff, 1992).

La principal limitación de la ferritina es que puede encontrarse falsamente elevada cuando la anemia por deficiencia de hierro se desarrolla en individuos con infección, inflamación crónica, enfermedad hepática y tumores malignos (Cook, 1999; Pasricha et al., 2010). Para identificar condiciones de inflamación, puede ser útil la utilización de marcadores como la proteína C reactiva (Pasricha et al., 2010).

1.1.4.3. Hierro sérico

El hierro sérico indica el hierro que está unido a la transferrina en la sangre circulante, medido en µg/dL o µmol/L. En el contexto de la homeostasis del hierro, el hierro sérico forma parte del pool de hierro del organismo por un corto periodo de tiempo, unos 40-50 minutos. Este corto período se debe a que la concentración de hierro cambia en función de la captación o liberación de los tejidos. La variabilidad individual día a día es del 20-30 %, mientras que para otros marcadores como ferritina o transferrina es únicamente del 14 y 3 %, respectivamente (Borel et al., 1991). La hora del día, los patrones de sueño (si se duerme de día o de noche) y la cena del día anterior al análisis, parece que ejercen influencia en las concentraciones de hierro sérico (Ridefelt

et al., 2010) por lo que no se recomienda para el diagnóstico de deficiencia de hierro o anemia ferropenia (WHO, 2007).

1.1.4.4. Transferrina y saturación de la transferrina

La transferrina es la proteína transportadora de hierro. Su concentración sérica (mg/dL), y particularmente la medida de su saturación (%), indican el suministro de hierro a los tejidos. La transferrina se ve aumentada durante la deficiencia de hierro, sin embargo, dicha elevación puede responder a otros factores como al uso de anticonceptivos orales (Callard et al., 1966; Milman et al., 1998; Greig et al., 2010). Por esto, es importante determinar su saturación, que indica la proporción de transferrina unida a hierro (WHO, 2007). Aunque analizar la saturación de la transferrina es relativamente fácil y de bajo coste, su determinación se ve limitada por la variabilidad diurna del hierro sérico y por los desórdenes clínicos que pueden afectar a la transferrina. La saturación de la transferrina (%) se puede obtener a partir de alguna de las siguientes fórmulas matemáticas:

a) Hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$) / transferrina (mg/dL) \times 70.9

b) Hierro sérico ($\mu\text{mol/L}$) / transferrina (mg/dl) \times 398

c) Hierro sérico ($\mu\text{mol/L}$) / TIBC \times 100

Donde, TIBC (Total Iron Binding Capacity) es la capacidad total del hierro para unirse a proteínas plasmáticas. Dado que un mol de transferrina (masa molecular de 79570 Da) tiene la capacidad de unir 2 átomos de hierro (masa atómica 56 Da), se han propuesto las siguientes fórmulas matemáticas para calcular la transferrina sérica a partir de la TIBC y viceversa.

$$\text{Transferrina sérica (g/L)} = 0.007 \times \text{TIBC } (\mu\text{g/L})$$

$$\text{TIBC } (\mu\text{g/dL}) = \text{transferrina sérica (mg/dL)} \times 1.41$$

$$\text{TIBC } (\mu\text{mol/L}) = \text{transferrina (g/L)} \times 25.1$$

Las limitaciones de estas determinaciones se deben a que cierta cantidad de hierro está unida a otras proteínas (como la albúmina), por lo que la relación entre las concentraciones de transferrina y TIBC no es completamente lineal. La TIBC calculada es un poco más elevada que la cantidad real de transferrina unida a hierro (Kasvosve y Delanghe, 2002). Por ejemplo, en ancianos se ha visto que la TIBC está correlacionada con la albúmina (Awad et al., 1982).

1.1.4.5. Receptor soluble de la transferrina

El receptor soluble de la transferrina que circula en el plasma, es un fragmento del receptor que se encuentra en la membrana de diversas células como los eritroblastos y los reticulocitos y refleja la tasa de eritropoyesis y las demandas de hierro. Su concentración se ve incrementada en la deficiencia de hierro y es un marcador de la intensidad de la deficiencia cuando las reservas han sido agotadas (WHO, 2007). Debido a que su síntesis está regulada paralelamente con la deficiencia de hierro tisular, el receptor soluble de transferrina es normal en individuos con anemia por enfermedades crónicas, no es sensible a la inflamación y aumenta cuando los individuos desarrollan anemia ferropénica y otros tipos de anemia en las que la actividad hematopoyética está disminuida (Cook, 1999).

1.2. Funciones del hierro

El hierro es un metal esencial para el ser humano. Participa en múltiples procesos metabólicos, ya que se encuentra formando parte de enzimas y de otros complejos moleculares. El hierro juega un papel importante en procesos celulares tales como síntesis de ADN, ARN y en la regulación de la expresión génica y síntesis de proteínas; transporte de electrones y respiración celular; proliferación celular y diferenciación. El metabolismo del hierro se lleva a cabo en diferentes tejidos especializados, tales como sangre, hígado, cerebro, intestino, placenta, testículos y músculo esquelético (Toxqui et al., 2010). Niveles elevados de hierro se encuentran en hígado, cerebro, glóbulos rojos y macrófagos.

1.2.1. Transporte de oxígeno

1.2.1.1. Hemoglobina

La sangre necesita un transportador de oxígeno ya que, debido a su apolaridad, éste gas no es suficientemente soluble en el plasma sanguíneo para poder satisfacer las necesidades corporales por sí solo. La cantidad de oxígeno que se puede transportar disuelto en sangre representa sólo el 2% del requerido. Así, la hemoglobina es la proteína encargada de transportar el 98% de oxígeno restante (Peñuela, 2005).

La hemoglobina es una proteína globular de masa molecular 60000 g/mol, que puede transportar 4 moléculas de O₂. Contiene 4 cadenas polipeptídicas con un grupo prostético hemo cada una. El hemo es una molécula de protoporfirina IX con un átomo de Fe²⁺ en el centro al que puede unirse a una molécula de O₂ (Vera, 2010). La hemoglobina total de un individuo contiene alrededor de 2 g de hierro. Este hierro puede ser reutilizado, de modo que los eritrocitos son fagocitados por los macrófagos, pudiendo ser liberados para la posterior incorporación a nuevos eritrocitos y otras funciones fisiológicas. Aproximadamente un 1% de los eritrocitos se reemplazan cada día (Ganz, 2008). Es por esto que la función metabólica esencial del hierro es el transporte de oxígeno.

1.2.1.2. Mioglobina

La segunda proteína con mayor contenido de hierro hemo es la mioglobina. Dicha molécula se encuentra en el citoplasma de las células musculares. Está relacionada estructural y evolutivamente con la hemoglobina, con la diferencia de que la mioglobina posee una única cadena polipeptídica y solo tiene un grupo hemo por molécula. La mioglobina tiene la capacidad de captar el oxígeno con mayor afinidad que la hemoglobina. De esta forma, el oxígeno liberado por la hemoglobina, se une a la mioglobina y se almacena hasta su utilización. La concentración de mioglobina en el músculo se reduce drásticamente en la deficiencia de hierro en los tejidos, lo que limita la velocidad de difusión de oxígeno de los eritrocitos a las mitocondrias (Vera, 2010).

1.2.1.2. Citocromos

Otras proteínas que contienen hierro hemo son los citocromos mitocondriales. Los citocromos a, b y c juegan un papel importante en el transporte de electrones de la mitocondria, mientras que otros como catalasa, citocromo oxidasa y citocromo P450 desempeñan papeles catalíticos (Anderson y Vulpe, 2010). En el caso de los citocromos P450, se han identificado hasta el momento 57 tipos diferentes en el ser humano. Algunos de ellos, tienen una gran relevancia biológica pues son enzimas que actúan sobre substratos endógenos, controlando en muchos casos sus concentraciones. Tal es el caso de las hormonas esteroideas, el colesterol, los eicosanoides y la vitamina D (Pikuleva y Waterman, 2013).

1.2.3. Otras funciones

1.2.3.1 En el cerebro

El hierro es el mineral más abundante en el cerebro, vital para un gran número de procesos celulares, entre los que se pueden mencionar síntesis de neurotransmisores, funciones mitocondriales y mielinización de neuronas.

El hierro afecta la síntesis y señalización de los neurotransmisores dopamina, noradrenalina, adrenalina y 5-hydroxytryptamina, implicada en la emoción, la atención, la recompensa y el movimiento, entre otras. Estos neurotransmisores son sintetizados por enzimas dependientes de hierro, entre las que se incluye fenilalanina hidroxilasa, tirosin hidroxilasa y triptófano hidroxilasa. Sin embargo, aun cuando hay deficiencia de hierro en el cerebro, rara vez se ve reducida la expresión o actividad de estas enzimas, por lo que la conservación del hierro en las mismas incluso en situación de déficit del mineral, refleja su importancia a nivel cerebral (Anderson y Vulpe, 2010).

El cerebro tiene una alta demanda de energía, alrededor del 20% del oxígeno basal consumido, por lo que requiere grandes cantidades de hierro para generar ATP a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Varias enzimas mitocondriales utilizan hierro como cofactor, tales como ferredoxin mitocondrial, citocromos y aconitasa (Hare et al., 2013)

La mielina se considera la “materia blanca” del cerebro, que aísla los axones y conserva su señalización. Así, se ha observado que en condiciones basales, las oligodendritas presentan grandes cantidades de hierro en comparación con otras células cerebrales (Hare et al., 2013).

Asociado a deficiencia de hierro en el cerebro, se pueden encontrar los siguientes desórdenes neurológicos: retraso en el desarrollo, déficit de atención, síndrome de piernas inquietas y neurodegeneración (Hare et al., 2013). Por el contrario, una acumulación de hierro en el cerebro se puede asociar a patologías como Alzheimer (Antharam et al., 2012), Parkinson (Lei et al., 2012), o enfermedad de Huntington (por acumulación de ferritina) (Simmons et al., 2007) entre otras.

Otros aspectos menos estudiados relacionan la falta de hierro con alteraciones hepáticas como colelitiasis (Fiel y Schiano, 2009). Muy posiblemente en estas alteraciones está implicada la 7 α -hidroxilasa de colesterol, enzima dependiente de hierro y ligada al sistema de los citocromos, que interviene en la transformación de colesterol a ácido cólico (Pikuleva, 2006).

1.2.3.2. En el estado oxidativo

Se han estudiado las relaciones existentes entre el hierro y el riesgo cardiovascular, tanto en la deficiencia como en la sobrecarga. En este sentido, un exceso de hierro con actividad redox agrava el estrés oxidativo y acelera la degeneración tisular. El hierro podría estar involucrado en la patología aterosclerótica mediante la promoción de la modificación oxidativa de LDL, aumentando así su potencial aterogénico. Por otro lado, existe gran controversia sobre la susceptibilidad de células a la peroxidación lipídica en la anemia por deficiencia de hierro. Hay teorías que afirman que en la anemia ferropénica no sólo se afecta la producción de hemoglobina, sino también la producción de otras proteínas que contienen Fe²⁺, tales como citocromos, mioglobina, catalasas y peroxidasas. Se ha indicado que el debilitamiento del sistema de defensa antioxidante, reduce la inmunidad celular y la actividad mieloperoxidasa en pacientes con anemia por deficiencia de hierro. Sin embargo, este tema es aún motivo de controversia, y hay autores que sostienen que la anemia por deficiencia de hierro es

un factor que no modifica la peroxidación lipídica en ratas. Esto se explicaría por la existencia de una capacidad compensatoria suficiente para mantener elevadas las defensas antioxidantes (Diaz-Castro et al., 2008; Toxqui et al., 2010)

1.2.3.3. En el metabolismo óseo

Otras funciones del hierro tienen que ver con su papel en el metabolismo óseo. Se sabe que el hierro es un cofactor de las lisil y prolil hidroxilasas implicadas en la síntesis de colágeno por lo que es fundamental para el mantenimiento y la maduración de la matriz orgánica del hueso (Tuderman et al., 1977). Además, la ruta renal que convierte la 25-hidroxivitamina D (25OHD) en su forma activa 1,25-hidroxivitamina D (1,25OHD), es un sistema que implica una flavoproteína, una proteína que contiene hierro y azufre, y un citocromo P-450, lo que comprometería la absorción del calcio (DeLuca, 1976; Holick, 2007b). Así, estudios en ratas han demostrado que la anemia por deficiencia de hierro severa tiene un impacto significativo sobre el hueso, afectando su mineralización (Katsumata et al., 2006; Katsumata et al., 2009; Diaz-Castro et al., 2012). Un estudio en mujeres postmenopáusicas encontró una asociación positiva entre la ingesta dietética de hierro y la densidad mineral ósea (Harris et al., 2003), por ello, parece que la relación hierro-hueso es relevante en el caso de deficiencias subclínicas en el que no existe anemia.

1.3. Distribución del hierro en el organismo

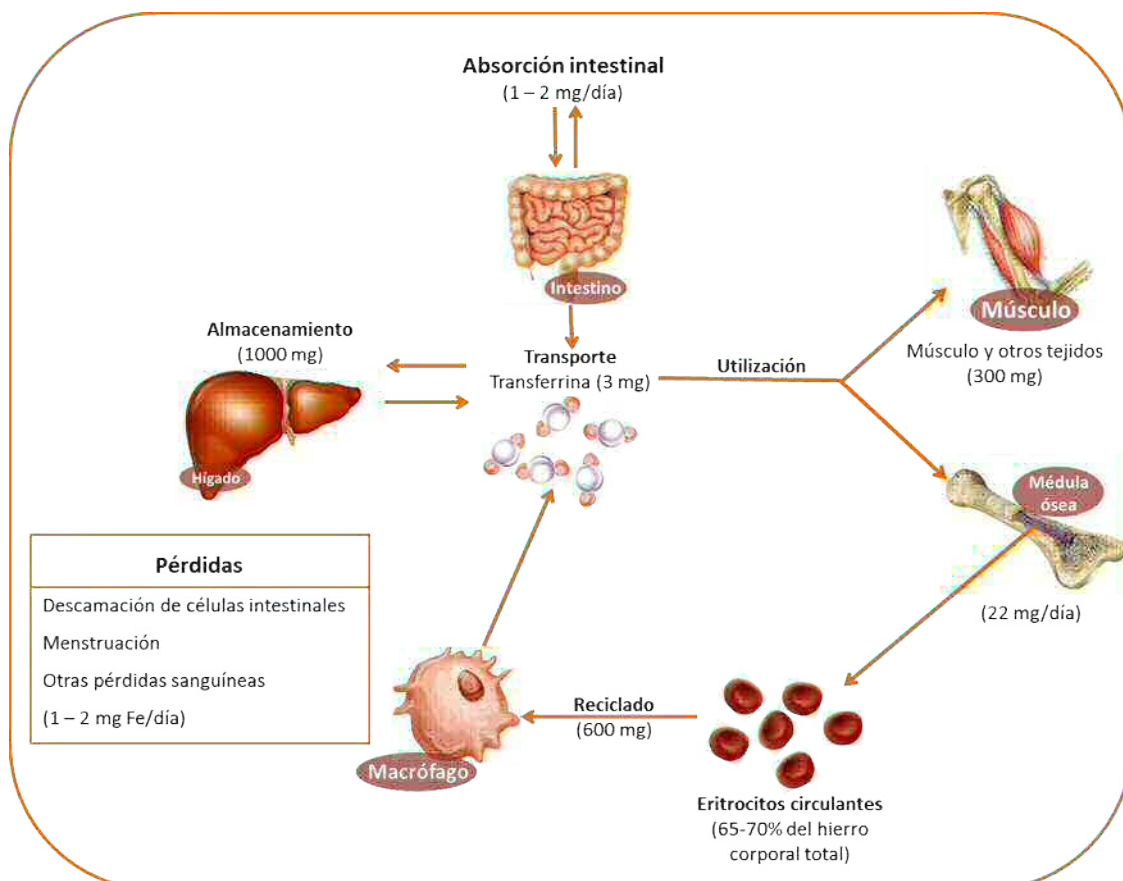
Un adulto promedio sano contiene un total de 3-4 g de hierro corporal, de los cuales aproximadamente el 60-70% está presente en forma de hemoglobina en los eritrocitos circulantes y el 10% en forma de mioglobina, citocromos y enzimas que contienen hierro (aproximadamente 4-5 mg de hierro). El 20-30 % restante, se almacena como ferritina y hemosiderina en los hepatocitos y en el retículo endotelial de los macrófagos (Lieu, Heiskala et al. 2001).

La forma de distribución del hierro en el organismo se describe a continuación (Figura 1). En condiciones normales, aproximadamente 1-2 mg de hierro dietético al día es absorbido por los enterocitos en el duodeno, el cual es liberado a la circulación y se

une a la proteína transportadora transferrina (cada molécula de transferrina puede transportar hasta 2 moléculas de hierro). Aproximadamente 3 mg de hierro circulan unidos a la transferrina y, aunque esto representa solo una pequeña porción del hierro corporal total, este compartimiento de hierro es vital para el mantenimiento de la homeostasis del hierro. El hierro unido a transferrina es captado por las células a través del receptor de la transferrina (srTfR1). La mayor parte del hierro circulante es destinado a la médula ósea para la generación de eritrocitos y producción de hemoglobina (aproximadamente 22mg de hierro/día). De hecho, aproximadamente un 65-70% del total de hierro corporal forma parte de los glóbulos rojos circulantes (Anderson et al., 2007).

Los eritrocitos senescentes o dañados se retiran de la circulación por los macrófagos del retículo endotelial, donde el hierro de la hemoglobina es liberado y almacenado en forma de ferritina, o bien se vuelve a poner en la circulación unido a transferrina, lo que se denomina reciclado de hierro (Nemeth y Ganz, 2006; Anderson et al., 2007).

Figura 1. Distribución del hierro en el organismo de un adulto sano



El resto del hierro (300 mg) va a otros tejidos, por ejemplo al músculo (ya que forma parte de la mioglobina), o es almacenado en forma de ferritina, principalmente en el hígado (1000 mg), desde donde puede ser movilizado en caso de necesidad. Los hombres y las mujeres no menstruantes pierden alrededor de 1 mg de hierro al día. En el caso de las mujeres menstruantes, se calcula que la pérdida extra oscila aproximadamente entre 0,85 y 1,75 mg de hierro por día, lo que corresponde a los percentiles 75 y 95 (Hallberg et al., 1966; Pasricha et al., 2010).

1.4. Metabolismo del hierro

El hierro es uno de los metales traza del organismo cuya concentración intra- y extracelular se encuentra perfectamente balanceada y regulada (Ganz, 2008). El organismo dispone de mecanismos para impedir que el hierro quede libre en forma iónica sin unirse a proteínas.

1.4.1. Absorción

Bajo condiciones fisiológicas normales, el hierro entra en el cuerpo humano en cantidades significativas mediante la absorción en el intestino (Fuqua et al., 2012). La regulación de la absorción intestinal es esencial para mantener los niveles de hierro del cuerpo en un rango fisiológicamente normal (Anderson et al., 2009).

La mayor parte del hierro ingerido se absorbe en el duodeno y yeyuno proximal, a través de las células del epitelio intestinal o enterocitos (Takeuchi et al., 2005; Blachier et al., 2007). Estas células se caracterizan por tener una parte apical en contacto con el lumen intestinal y los demás componentes de la dieta, y otra parte basolateral en contacto con la circulación sanguínea. Los enterocitos se forman a partir de la división de las células madre en las criptas intestinales, y migran hacia la superficie de las vellosidades del intestino. El recambio completo del epitelio intestinal se realiza cada 3-4 días (Collins y Anderson, 2012; Fuqua et al., 2012).

En la dieta, el hierro se encuentra presente en dos formas: hierro hemo y hierro no hemo. Por hierro no hemo generalmente se entiende a las formas de hierro

inorgánico. La forma oxidada, el hierro férrico o Fe^{3+} , tiene baja solubilidad y es poco biodisponible, mientras que la forma ferrosa, Fe^{2+} , es más soluble y más biodisponible (Sharp, 2010). La ferritina es otra forma de hierro no hemo en una proteína (por lo tanto orgánico), que se encuentra tanto en tejidos animales como vegetales. Aún no está muy claro el papel que puede desempeñar en la nutrición, sin embargo, al ser la mayor proteína de almacenaje de este metal, podría ser una fuente de hierro importante (Theil, 2001; Lonnerdal et al., 2006; Sharp y Srai, 2007).

El hierro hemo es el que se encuentra unido al anillo tetrapirrónico de la protoporfirina, grupo prostético integrante de las hemoproteínas mioglobina y hemoglobina. A pH bajo, las enzimas proteolíticas del estómago y del intestino separan el hemo de las hemoproteínas. En sí mismo el grupo hemo es poco soluble, pero forma complejos solubles con otros componentes de la dieta en el lumen intestinal, y posteriormente es liberado y expuesto a la mucosa intestinal para su absorción intacta en el enterocito (Han, 2011; Fuqua et al., 2012).

La absorción del hierro hemo es más eficaz que la del no hemo, sin existir competencia entre ellos, además la absorción del hierro hemo no se ve afectada por otros componentes de la dieta (Hurrell y Egli, 2010; Fuqua et al., 2012).

El hierro hemo se encuentra exclusivamente en alimentos de origen animal y, aún en éstos, su porcentaje no suele ser superior al 40% del hierro total, siendo el resto hierro no hemo. Por su parte, el hierro no hemo se encuentra en la dieta en un porcentaje mucho más elevado, pero interacciona con numerosos componentes de los alimentos que afectan su absorción.

Se estima que en las dietas habituales, que contienen aproximadamente un 10% de hierro hemo y un 90% de no hemo, la biodisponibilidad de hierro varía entre el 5 y el 15% según el tipo de dieta (Vaquero et al., 2012)

1.4.1.1. Absorción de hierro no hemo

La mayor parte del hierro no hemo entra en el tracto gastrointestinal en forma de Fe^{3+} o hierro férrico, el cual tiene que reducirse a su forma ferrosa Fe^{2+} antes de que pueda ser absorbido por el enterocito (Figura 2). Esta reacción necesita el medio ácido del estómago y al menos uno de los siguientes factores: una ferreductasa que se encuentra en la membrana del borde de cepillo, el citocromo b duodenal (Dcytb) o algún agente reductor de la dieta, como el ácido ascórbico (Han, 2011).

El Dcytb es un miembro de la familia del citocromo b561, que activa una ferrirreductasa dependiente de hierro en lugares específicos, tales como las células cromafines de la glándula suprarrenal y eritrocitos. Asimismo, existen evidencias de que dicho citocromo puede actuar por sí solo reduciendo el hierro férrico mediante la utilización de ascorbato (Latunde-Dada et al., 2008). La expresión del Dcytb es inducida por la deficiencia de hierro, la hipoxia y las anemias crónicas, situaciones en las que la absorción de hierro debe estar altamente favorecida (Oakhill et al., 2008). Además, se ha observado que la adición de anticuerpos de Dcytb, bloquea la actividad de la reductasa férrica de la membrana del borde de cepillo, lo que demuestra que desempeña un papel importante en la absorción del hierro (Han, 2011).

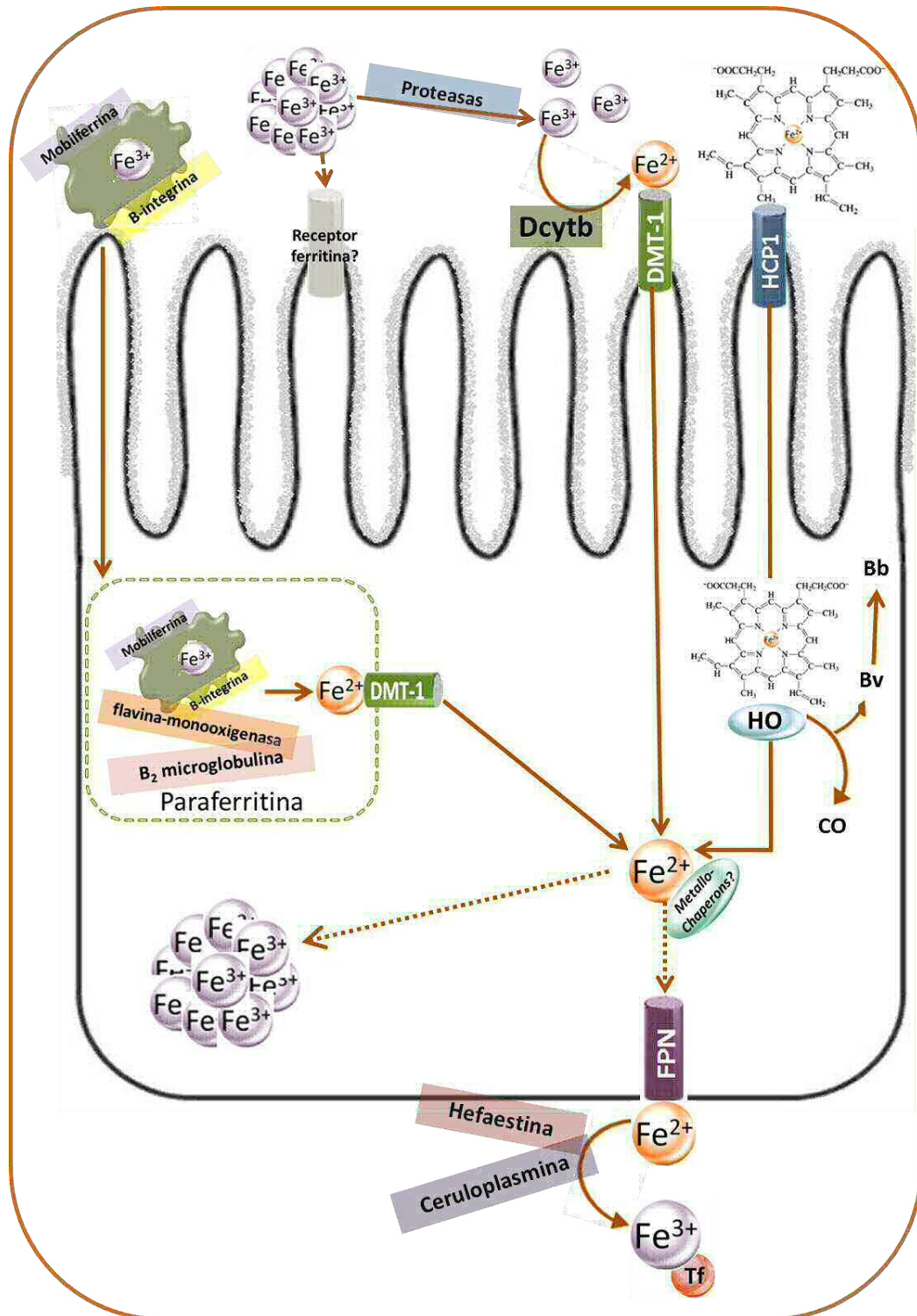
Una vez reducido, el hierro ferroso es transportado al interior del eritrocito a través del transportador de metales divalentes 1 (DMT1). El DMT1 es un transportador de protones que requiere pH bajo para ser eficaz (Han, 2011) y su principal función es mediar la captación de hierro en el intestino. Se encuentra en la membrana del borde de cepillo de las vellosidades maduras, donde su expresión es regulada por el estado de hierro corporal. En modelos animales, se ha visto que mutaciones en el DMT1 causan anemia microcítica severa (Mackenzie et al., 2007). Se ha observado en ensayos con células, que el DMT1 puede transportar otros metales como cadmio, cobalto, manganeso y zinc, sin embargo estas observaciones requieren interpretaciones cuidadosas y aún no se ha llegado a resultados concluyentes, teniendo claro únicamente el papel del DMT1 en el transporte del hierro (Mackenzie y

Garrick, 2005). En este sentido, estudios recientes llevados a cabo en células Caco-2, demostraron que el calcio podría modificar la expresión y la funcionalidad del DMT1 y de la ferroportina, lo que afectaría a la absorción de hierro en la membrana apical y la inhibición de la transferencia de hierro en la circulación (Shawki y Mackenzie, 2010; Thompson et al., 2010)

Se ha descrito otro mecanismo de absorción en el cual, el hierro férrico es liberado del alimento en el ambiente ácido del estómago y quelado por mucinas en la superficie del borde de cepillo, manteniendo el hierro en su forma férrica. El Fe^{3+} atravesaría la membrana apical del enterocito al interactuar con la $\beta 3$ -integrina y la mobilferrina. Una vez en el citosol, este complejo se combinaría con una reductasa, la flavina monooxigenasa, y la $\beta 2$ -microglobulina para formar un gran conglomerado conocido como paraferitina, el cual reduce el hierro absorbido de la forma férrica a la forma ferrosa. Parece ser que el complejo de paraferitina contiene DMT1, que permite la entrada del hierro Fe^{2+} a los orgánulos intracelulares. El hierro en forma ferrosa podría almacenarse como ferritina (Conrad y Umbreit, 1993; Conrad y Umbreit, 2002; Sharp y Srai, 2007). Sin embargo, esta vía de absorción no está bien caracterizada y hay pocas evidencias que defiendan su existencia, por lo que revisiones recientes sobre el tema consideran que la absorción de Fe^{3+} por dicho mecanismo es minoritaria (Bleackley et al., 2009).

Otra forma en la que se puede encontrar el hierro no hemo en los alimentos es como ferritina. Si bien la biodisponibilidad de la ferritina aún es tema de controversia, varios estudios han demostrado que ambas fuentes de ferritina (animal y vegetal) son bien absorbidas en los seres humanos, con una biodisponibilidad equivalente a la del sulfato ferroso (Murray-Kolb et al., 2003; Davila-Hicks et al., 2004; Lonnerdal et al., 2006), sal de referencia ampliamente utilizada para el tratamiento de anemia ferropénica debido a su alta biodisponibilidad.

Figura 2. Absorción de hierro no hemo, hemo y ferritina en el enterocito



Transportador divalente de metales (DMT-1), citocromo B duodenal (Dcytb), heme carrier protein (HCP-1), hemo-oxigenasa (HO), monóxido de carbono (CO), biliverdina (Bv), bilirrubina (Bb), ferroportina (FPN).

Aunque el mecanismo de absorción no está bien determinado, una posibilidad es que la actividad de las proteasas gastrointestinales degraden la molécula de ferritina y liberen el hierro que contiene, el cual se absorbería a través de la ruta Dcytb/DMT1 (Sharp y Srai, 2007). Sin embargo, ya que otros estudios han demostrado que la ferritina es resistente a altas temperaturas, bajo pH y a agentes desnaturalizantes de proteínas, se sugiere la posibilidad de que la absorción de ferritina pudiera ser diferente a la del hierro hemo y a la de otras formas de hierro de menor peso molecular (Lonnerdal et al., 2006; Lonnerdal, 2009). La ferritina se absorbería intacta, se degradaría en los lisosomas del enterocito y posteriormente se liberaría el hierro (Sharp y Srai, 2007). Sin embargo, este mecanismo requiere la existencia de un receptor de ferritina en la membrana apical del enterocito, similar a los que se han descrito en el hígado (Moss et al., 1992), y hasta el momento no ha sido identificado ninguno en el tejido intestinal (Sharp y Srai, 2007).

1.4.1.2. Absorción de hierro hemo

Antes de que el hierro hemo pueda ser absorbido, debe ser liberado de las partículas de hemoglobina y mioglobina por la actividad proteolítica de enzimas en el lumen del estómago y en la primera porción del intestino delgado. El grupo hemo permanece soluble y es absorbido intacto como una metaloporfirina (protoporfirina + Fe^{2+}) por el enterocito, aunque dicha captación no está bien caracterizada. Existen transportadores específicos de hemo en la membrana apical del enterocito para su captación. Se ha identificado la proteína transportadora de hierro hemo-1 (HCP1), como la encargada de dicha captación. Tras la unión del hemo con la HCP1 en la superficie de la célula, el complejo es internalizado en la misma a través de una endocitosis mediada por receptores. Aunque la expresión de la HCP1 es elevada en células del epitelio intestinal y podría ser la responsable de la captación del hierro hemo de la dieta, datos recientes apuntan a que la HCP1 es también capaz de transportar folato, por lo que se requieren más estudios para profundizar en su función en el metabolismo del hierro (Conrad y Umbreit, 2002; Sharp y Srai, 2007; Han, 2011).

Una vez dentro del enterocito, la molécula permanece en las vesículas unidas a la membrana del citoplasma. Posteriormente la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) y sus homólogos HO-2 y HO-3 son las encargadas de romper el hemo y liberar el hierro ferroso del anillo de protoporfirina. Dicha reacción genera monóxido de carbono (CO), que está involucrado en vías de señalización, y biliverdina, que se convertirá enzimáticamente en bilirrubina. La digestión del hemo es completada en el enterocito, ya que no hay evidencia de que exista un flujo de salida a través de la membrana basolateral (Conrad y Umbreit, 2002; Sharp y Srai, 2007; Han, 2011).

1.4.2. Almacenamiento de hierro y transporte intracelular

El hierro absorbido tiene dos destinos en función de los requerimientos del organismo. Si las necesidades están cubiertas y los almacenes completos, es almacenado en el enterocito en forma de gránulos de ferritina (en su forma férrica), que se elimina cada 3-4 días por descamación. En caso contrario, el hierro es exportado a la circulación a través de la membrana basolateral (Anderson et al., 2009).

La ferritina se caracteriza por su estructura tridimensional, similar a una esfera, diseñada para acumular grandes cantidades de Fe^{3+} en una forma segura, soluble y biodisponible. Esta reacción es biológicamente importante debido a que, en primer lugar, la capacidad de unión de la ferritina con el hierro es muy alta. Una molécula de ferritina puede contener hasta 4000 átomos de hierro por molécula, concentrados en una forma compacta y segura, que pueda estar disponible para cuando se necesite, y de esta forma evitar la pérdida de este metal tan indispensable para el organismo. En segundo lugar, la ferritina también tiene un papel de protección antioxidante, ya que secuestra al hierro dentro de su cavidad, alejándolo de dioxígenos, peróxidos de hidrógeno y superóxidos. De esta forma, evita la producción de reacciones de Fenton, en las que la oxidación espontánea del Fe^{3+} transforma especies reactivas de oxígeno inocuas, tal como H_2O_2 , en radicales altamente tóxicos (Theil, 2001; Arosio et al., 2009).

El mecanismo molecular del transporte intracelular de hierro es aún desconocido, pero existe una hipótesis, la de una familia de proteínas implicadas en el transporte de metales en el citoplasma (*metallochaperons*). Son bien conocidos los chaperones implicados en el transporte de níquel y cobre, sin embargo, recientemente se han identificado aquellos implicados en el transporte intracelular de hierro: el primero transporta hierro hacia la mitocondria (faraxina) y el segundo, hacia la ferritina (PCBP1) (Shi et al., 2008; Subramanian et al., 2011).

1.4.3. Transferencia de hierro a la circulación

La transferencia de hierro a la circulación tiene lugar por la acción combinada de la ferroportina (FPN), proteína transportadora expresada en enterocitos, macrófagos y hepatocitos, (Nemeth y Ganz, 2006), y de la ferroxidasa hefaestina, la cual parece tener un papel en la estabilidad del complejo de la FPN en la superficie de la membrana (Bleackley et al., 2009). Además, el flujo de salida de hierro de la célula también depende de la ceruloplasmina, otra ferroxidasa plasmática dependiente de cobre. La acción de la ceruloplasmina es necesaria para la incorporación del hierro a su proteína transportadora en sangre, la transferrina (Tf), la cual distribuirá el metal por todo el cuerpo para su utilización y almacenamiento (Sharp y Srai, 2007).

1.4.4. Reciclado de hierro

El suministro constante de hierro a los precursores eritrocitarios en la médula ósea y a otros tejidos, es posible fundamentalmente gracias al reciclado del hierro proveniente de los eritrocitos senescentes (Nemeth y Ganz, 2006). La cantidad reciclada diariamente es aproximadamente 20-25 mg, suficiente para asegurar los requerimientos de la eritropoyesis. Este mecanismo es llevado a cabo principalmente por los macrófagos del bazo y la médula ósea, y en menor medida, por las células Küpffer del hígado. Las modificaciones bioquímicas que se producen en la membrana de los eritrocitos durante la senescencia así como la externalización de la fosfatidilserina, la peroxidación de la membrana lipoproteica, la pérdida de los residuos de ácido siálico y la formación de antígenos de senescencia, constituyen señales

esenciales para el macrófago, que logra así identificar a los eritrocitos que deben ser eliminados (Knutson y Wessling-Resnick, 2003).

El hierro liberado se une a la transferrina y pasa a la circulación, donde vuelve a estar disponible para los precursores de los eritrocitos y para otras células que necesitan hierro (Ganz, 2008).

Las fluctuaciones de las demandas o del suministro de hierro son amortiguadas por el hierro almacenado en los hepatocitos y los macrófagos del hígado y del bazo, cuya cantidad es aproximadamente 1 gramo (Ganz, 2008).

1.4.5. Regulación de la homeostasis del hierro

A pesar de ser un micronutriente esencial para la vida, paradójicamente el exceso de hierro es altamente peligroso para la salud debido a su capacidad para catalizar reacciones que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno. Es por ello que el organismo debe regular cuidadosamente sus niveles de hierro de modo que cubra con sus necesidades esenciales, a la vez de ser capaz de responder rápidamente ante un incremento en las demandas (por ejemplo, en el embarazo). De igual forma, es necesaria la existencia de un mecanismo que limite su absorción una vez que los almacenes estén completos (Han, 2011).

La homeostasis del hierro depende de la regulación de la absorción intestinal debido a que las pérdidas del metal no están reguladas y obedecen a procesos como la exfoliación de las células y los sangrados (Garrick y Garrick, 2009). Por lo tanto, para mantener los niveles adecuados de hierro en el organismo, hay que tener en cuenta 3 factores principales: una ingesta que aporte una cantidad de hierro dietético suficiente y biodisponible; las pérdidas sanguíneas; y las fluctuaciones en las demandas para la eritropoyesis y otros procesos que requieren hierro. En los procesos inflamatorios o infecciones, existen mecanismos reguladores para reducir la absorción de hierro y la cantidad de hierro en el espacio extracelular. Se asume que es una respuesta evolutiva para que los microorganismos invasores no tuvieran disponible este nutriente esencial (Ganz, 2008).

La homeostasis sistémica de hierro mantiene la concentración del complejo hierro-transferrina del plasma y de los fluidos extracelulares. Esto se realiza mediante la regulación del flujo de hierro hacia la circulación a través de: el reciclado de hierro de los eritrocitos senescentes, la liberación del hierro almacenado en los hepatocitos, la absorción de hierro dietético en los enterocitos, y durante el desarrollo fetal, mediante la transferencia de hierro de la madre al hijo a través de la placenta (Ganz, 2005). El hierro es liberado de todos éstos tejidos a través de la FPN, regulada a su vez por la hormona hepcidina. La hepcidina causa la degradación de la ferroportina y como consecuencia, bloquea el traslado del hierro a la circulación. A su vez, los niveles plasmáticos de hepcidina son mediados por los niveles de hierro y anemia/hipoxia, asegurando así el control de la homeostasis sistémica de hierro (Nemeth y Ganz, 2006).

Por otro lado, existe una regulación intracelular de las concentraciones de hierro. Los niveles intracelulares de hierro son mediados por las proteínas IRP1 e IRP2 (Hentze et al., 2004). Cuando las concentraciones citoplasmáticas de hierro son bajas. Las IRPs se unen al elemento IRE del mRNA de algunas de las proteínas reguladoras de hierro. Dependiendo de la posición en la que la IRP se una al IRE (regiones 5' o 3'), tiene efectos opuestos en la síntesis de dichas proteínas: si la unión es en la región 3'IREs, entonces se estabiliza el mRNA y se incrementa la síntesis, mientras que si la unión es en la región 5'IREs, previene el traslado del mRNA y disminuye la síntesis de proteínas. Las proteínas que regulan el sistema IRP/IRE incluyen aquellas involucradas en la captación celular de hierro, almacenamiento y liberación, y son el receptor de la transferrina, la ferritina, el DMT1 y la ferroportina. Así, mientras las concentraciones extracelulares de hierro se encuentren dentro de rangos de normalidad, la homeostasis celular de hierro es mediada por este sistema (Nemeth y Ganz, 2006).

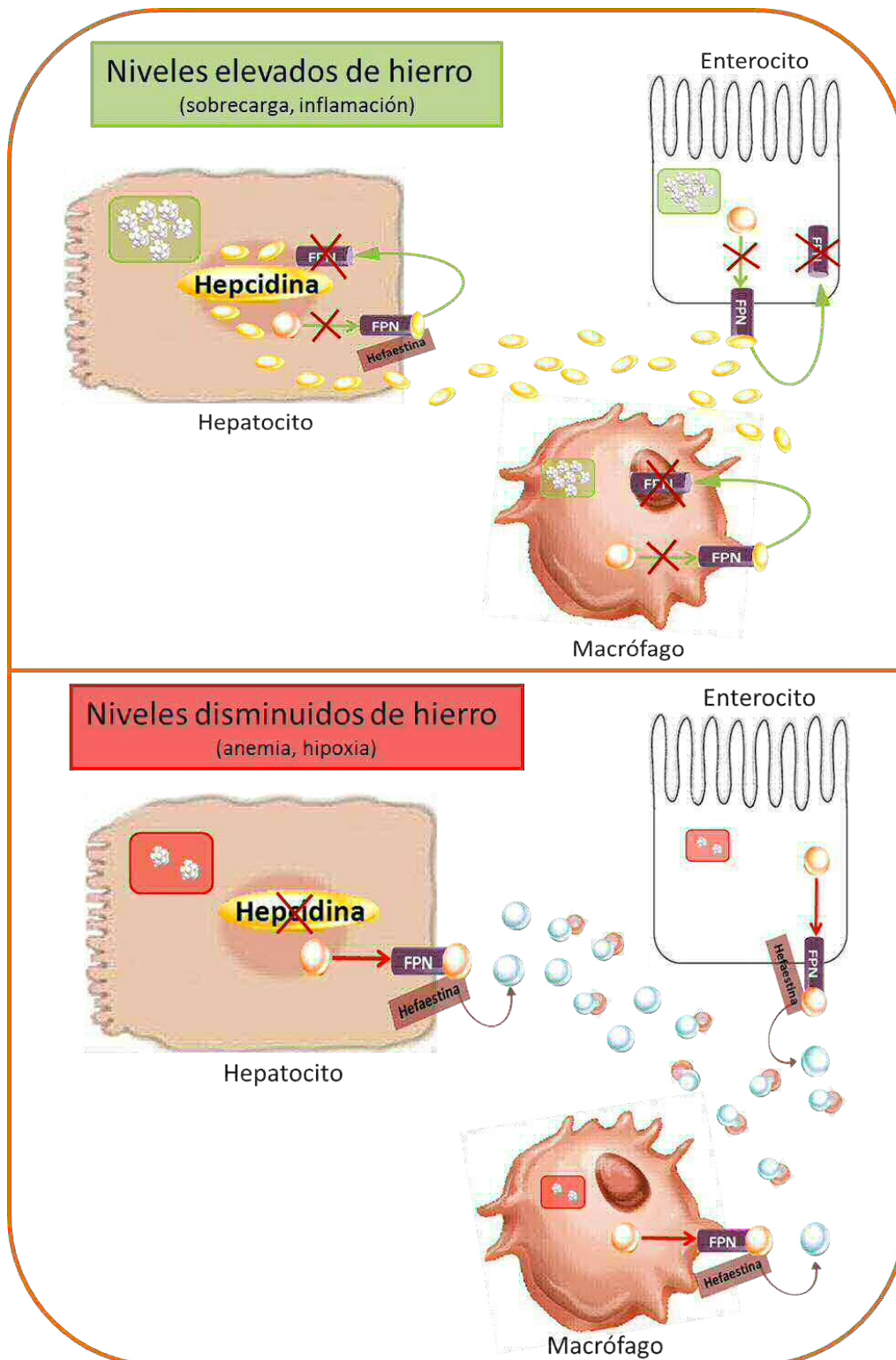
1.4.5.1. Hepcidina

Ya desde 1940 se propuso estimar la absorción intestinal de hierro mediante la diferencia entre el hierro dietético ingerido y el eliminado por las heces y por la orina, además se conocía que la absorción de hierro se veía incrementada en individuos con

deficiencia de hierro. Estudios posteriores afirmaron que la regulación de la homeostasis del hierro debía ser un proceso coordinado a nivel sistémico, puesto que diferentes estados de hierro del individuo suponían diferencias en su absorción intestinal y en su reciclado por parte de los macrófagos. Sin embargo, no ha sido hasta hace unos 10 años cuando se describió por primera vez la que se considera la “hormona reguladora de la homeostasis del hierro”, denominada hepcidina (Ganz, 2011).

La hepcidina es una hormona sintetizada en el hígado que controla la concentración plasmática de hierro y su distribución a los tejidos, mediante la inhibición de la absorción, el reciclaje y la movilización de las reservas de hierro (Nemeth y Ganz, 2006; Ganz, 2011). El mecanismo de acción de la hepcidina es mediante la unión con la ferroportina, causando su internalización y degradación en los lisosomas (Figura 3) (Delaby, Pilard et al. 2005). Se ha descrito que personas con mutaciones en el gen *HAMP*, gen que codifica la expresión de la hepcidina, desarrollan sobrecarga de hierro a edad temprana, causando hemocromatosis juvenil (Roetto et al., 2003). La expresión de la hepcidina es estimulada por la sobrecarga de hierro e inflamación, e inhibida por anemia e hipoxia (Babitt et al., 2006; Nemeth y Ganz, 2006). Un incremento en las concentraciones plasmáticas de hepcidina, inhibe la absorción intestinal de hierro y su liberación de los macrófagos y lugares de almacenamiento. Sin embargo, aunque el hígado sea el lugar donde se secrete la hepcidina y cabría esperar que el “sensor” que detectara las concentraciones de hierro sérico se encontrara ahí, aún no está claro el lugar exacto donde se encuentra dicho “sensor”. En estudios *in vitro* realizados en células hepáticas de ratones y humanos y en líneas celulares, muestran que el aporte de hierro, en forma de hierro-transferrina y otras formas de hierro, no incrementa la expresión de mRNA de la hepcidina (Pigeon et al., 2001; Gehrke et al., 2003). Actualmente se piensa que la hepcidina tiene un efecto indirecto en el sistema IREs/IRPs (*iron-responsive elements / iron-regulatory proteins*), en respuesta a la concentración de hierro, regulando así la producción de proteínas implicadas en el metabolismo de hierro.

Figura 3. Regulación de la homeostasis del hierro



Niveles elevados niveles de hierro: se sintetiza hepcidina en los hepatocitos la cual impide el flujo de hierro a la circulación por su unión con la ferroportina (FPN); Niveles disminuidos de hierro, no se sintetiza hepcidina y el hierro puede ser liberado a la circulación.

Se han identificado dos proteínas que regulan la expresión de hepcidina: la hemojuvelina (*HJV*, *HFE2* o *RGMC*) y la matriptasa-2 (*TMPRSS6*). La *HJV* se expresa en el músculo esquelético, hígado y corazón (Nemeth y Ganz, 2006), codifica al gen *HFE2* y funciona como correceptora de la proteína morfogenética ósea (BMP) (Viatte y Vaulont, 2009). A su vez, la BMP6 se eleva cuando las concentraciones de hierro hepáticas son altas, lo que sugiere que puede ser una señal que refleje los almacenes de hierro (Ganz, 2011). El complejo formado por BMP/*HJV* promueve la síntesis del RNAm de la hepcidina. Así, con determinadas mutaciones del gen de la *HJV*, se presentan concentraciones séricas de hepcidina disminuidas (Viatte y Vaulont, 2009). Se han encontrado mutaciones de la *HJV* en pacientes con hemocromatosis severa o hemocromatosis juvenil.

Por su parte la deficiencia de matriptasa-2 está asociada a anemia ferropénica refractaria, que no responde a tratamientos orales de hierro debido a que no se produce su absorción. La *HJV* asociada a la membrana puede ser inactivada mediante escisión por la matriptasa-2. Esto atenuaría la vía BMP/*HJV*, actuando la *TMPRSS6* como inhibidor de la expresión de hepcidina (Silvestri et al., 2008). Los niveles altos de hepcidina, a pesar de la deficiencia de hierro en esta situación, indican que la matriptasa-2 inhibe la síntesis de hepcidina (Ramsay et al., 2008).

Se sabe que la anemia ferropénica, las pérdidas de sangre y la hipoxia son situaciones en las que las concentraciones de hepcidina se encuentran bajas, de modo que la absorción intestinal de hierro y su movilización desde los almacenes y los macrófagos se ven favorecidas para hacer disponible el hierro para la eritropoyesis (Nemeth y Ganz, 2006). En cambio, la inflamación y la infección incrementan la producción de hepcidina, causando una disminución en los niveles séricos de hierro y es probablemente un mecanismo de defensa que limita la disponibilidad de hierro a los microorganismos invasores. Esto contribuye al desarrollo de la anemia de la inflamación y la anemia de los procesos crónicos. Este efecto es mediado por citoquinas inflamatorias, predominantemente la IL-6 que estimulan la producción de hepcidina (Nicolas et al., 2002; Nemeth et al., 2003; Kemna et al., 2005).

1.5. Biodisponibilidad

1.5.1. Concepto de biodisponibilidad

La biodisponibilidad de un nutriente o componente de un alimento se entiende como la proporción del mismo que se absorbe y utiliza para funciones normales del organismo. Es importante tener en cuenta que dicho nutriente debe estar también disponible para ser transportado a los lugares de acción o a sus reservorios corporales según el metabolismo normal del mismo (Vaquero, 1998; Pérez-Granados et al., 2003; Van Dokkum, 2003).

1.5.1.1. Factores dietéticos

Dado que el proceso digestivo constituye el principal regulador fisiológico del hierro corporal y que una vez absorbido los mecanismos para excretarlo son ineficaces, los componentes de los alimentos que afectan su solubilidad y transporte intestinal, modificarán su biodisponibilidad (Vaquero, 1998; Van Dokkum, 2003).

1.5.1.1.1. Estimulantes

Se ha documentado muy bien el papel estimulante de la absorción de hierro que ejerce la vitamina C o ácido ascórbico. Este nutriente actúa por dos mecanismos a la vez: reduce el hierro a la forma Fe^{2+} , más soluble, y forma en el medio ácido del estómago un complejo de ascorbato férrico muy estable, que permanece soluble al pH más alto del duodeno. Dicho complejo evita la interacción del hierro con otros componentes de la dieta. Constituye por tanto el mejor potenciador de la biodisponibilidad del hierro no hemo que se conoce. La relación idónea ácido ascórbico/ hierro no hemo debe ser 4:1 según diversos autores (Pérez-Llamas et al., 2012; Vaquero y Navarro, 2013).

Los alimentos de origen animal (carne, pescado, pollo) incrementan la absorción del hierro. Se han realizado numerosos estudios para conocer el compuesto responsable y el mecanismo de acción implicado. Durante la digestión, las proteínas del tejido muscular liberan una serie de péptidos que son capaces de reducir y quelar al hierro, manteniéndolo en una forma absorbible, mecanismo similar al que ejerce el ácido

ascórbico. De hecho, las proteínas miofibrilares se digieren por acción de la pepsina en el estómago, donde se formarían los péptidos que captarían el hierro impidiendo su precipitación con el pH superior del duodeno. Al mismo tiempo, el hierro así unido quedaría a salvo de la interacción con otros componentes de la dieta. Así, el pescado, cuyo contenido en hierro es bajo, es capaz de incrementar la absorción del hierro de una comida rica en inhibidores (Hurrell y Egli, 2010). En esta línea, en un estudio de absorción con isótopos estables en mujeres con deficiencia de hierro, Navas-Carretero et al., (2008) concluyeron que el consumo de salmón, rico en proteínas y en ácidos grasos omega-3, incrementa la absorción de hierro no hemo proveniente de alimentos ricos en fitatos.

El medio ácido en el intestino favorece la absorción de los minerales en general, debido a que se mantienen en forma soluble. La modificación de la acidez intestinal puede realizarse por la inclusión de ácidos orgánicos presentes en los alimentos naturales. Respecto a la grasa, los ácidos grasos saturados y el aceite de oliva favorecen la absorción de hierro, mientras que la grasa más insaturada, particularmente el ácido linoléico, reducen la biodisponibilidad de este micronutriente (Pérez-Granados et al., 1995; Vaquero, 1998; Pérez-Granados et al., 2003; Van Dokkum, 2003).

1.5.1.1.2. Inhibidores

Tradicionalmente se ha considerado que la fibra dietética es un inhibidor de la absorción de minerales. Sin embargo, no todos los tipos de fibra son inhibidores e incluso es preciso tener en cuenta que los alimentos integrales son ricos en minerales, por lo que el efecto global sobre la biodisponibilidad del hierro dependerá del conjunto de la dieta. Asociados a la fibra se distinguen una serie de componentes, como polifenoles y fitatos, que son capaces de captar el hierro y dificultar su absorción. El ácido fítico (inositol hexafosfato) es un potente inhibidor de la absorción del hierro no hémico, tanto más cuantos más grupos fosfato tenga. Si por determinados tratamientos culinarios o industriales (lixiviación, fermentación, germinación) este

ácido pierde grupos fosfato, se reduce proporcionalmente su capacidad de secuestrar hierro (Hurrell y Egli, 2010).

Los polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, polifenoles condensados), aun siendo solubles como los del café y en el té, pueden unirse al hierro fuertemente impidiendo su absorción. El té se considera el inhibidor más potente de la absorción del hierro con variaciones dependiendo del tipo y la concentración de la infusión (Hurrell y Egli, 2010). Los polifenoles del té negro parecen ser los que tienen un mayor efecto inhibitorio en comparación con otras infusiones o con el vino (Cook et al., 1995; Hurrell et al., 1999).

Otros minerales interactúan con el hierro en el tracto gastrointestinal. Así, ingestas excesivas de calcio pueden reducir la biodisponibilidad del hierro interactuando en la propia mucosa. Algunos estudios indican que el calcio es capaz de inhibir tanto al hierro hemo como al no hemo. Se ha observado que la adición de 75 a 300 mg de calcio a productos de panadería y 165 mg de calcio en productos lácteos inhiben la absorción de hierro en una manera dosis-dependiente (Hallberg et al., 1991). Sin embargo, otro estudio demostró que la absorción del hierro no se veía afectada por la adición de 200 mg de calcio a una comida estándar a base de maíz (Troesch et al., 2009). Esto indica que la repercusión de la interacción Ca-Fe en dietas variadas dependerá de las cantidades de calcio y hierro que se consuman, de la presencia de otros componentes interactuantes y del momento en que se consuman los alimentos ricos en calcio y en hierro (Hurrell y Egli, 2010).

Es importante tener en cuenta que para que los estimulantes o inhibidores de la biodisponibilidad del hierro sean eficaces deben actuar durante la digestión. Es decir, para estimular la absorción, deben ingerirse en la misma comida los alimentos ricos en hierro y los que aportan vitamina C y no tomar en esa misma comida té o café, que se consumirán preferentemente entre horas. Además es necesario ingerir una cantidad suficiente de alimentos ricos en hierro, especialmente en hierro hemo (Vaquero, 1998; Van Dokkum, 2003; Vaquero y Navarro, 2013). La Tabla 4 muestra los alimentos con mayor contenido de hierro.

Tabla 4. Alimentos ricos en hierro

| Alimentos ricos en hierro hemo | Alimentos ricos en hierro no hemo |
|---|-------------------------------------|
| Carnes rojas | Legumbres |
| Morcilla | Espinacas |
| Hígado | Acelgas |
| Cordero | Col |
| Productos cárnicos y embutidos (paté, chorizo, jamón cocido, jamón serrano) | Berros |
| Moluscos en conserva (berberechos, mejillones) | Frutos secos (pistachos, almendras) |
| | Cereales de desayuno enriquecidos |

1.5.1.2. Factores del individuo

1.5.1.2.1. Factores fisiológicos

El estado de hierro del individuo regula la absorción de hierro a nivel intestinal, a través de la modulación de la expresión de las proteínas transportadoras DMT-1 y FPN en el enterocito mediante la regulación de la síntesis de hepcidina.

Diversos estudios han demostrado que la relación entre el estado de hierro y su absorción intestinal es lineal e incluso se ha llegado a explicar matemáticamente utilizando la ferritina sérica como indicador del estado de hierro (Cook y Reddy, 2001). Además, habrá que considerar la situación fisiológica junto con otros factores como el estado del hierro. En este sentido, hay investigaciones que apuntan a que la absorción de hierro de una comida es mayor en mujeres que presentan bajos niveles de hierro frente a las que muestran niveles normales, independientemente de la presencia de otros componentes de los alimentos (Moretti et al., 2006; Thankachan et al., 2008).

Además, existen situaciones fisiológicas asociadas a un mayor riesgo de padecer deficiencia de hierro o anemia ferropénica, ya sea por un incremento en las necesidades de hierro, como en el caso de los niños, los adolescentes y las mujeres

embarazadas; o por un aumento en las pérdidas, como en las mujeres menstruantes (Vaquero et al., 2012).

1.5.1.2.1. Factores genéticos

Los factores genéticos propios del individuo también influyen de manera determinante en el estado del hierro. Existe amplia información sobre la base genética de la sobrecarga de hierro, pero son escasos los estudios centrados en anemia ferropénica (Bertoncini et al., 2011; Blanco-Rojo et al., 2011a; McLaren et al., 2011).

Inicialmente las investigaciones se centraron en mutaciones concretas de un gen específico, siguiendo las corrientes científicas de hace más de una década. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la absorción de hierro era similar en mujeres con deficiencia de hierro que presentaban la mutación G277S en el gen de la transferrina (TF) frente a las del genotipo habitual (G277G), y que ambos grupos respondían de forma similar a la adición en la comida de un estimulante de la absorción del hierro (Sarria et al., 2007b). Se concluyó que ésta mutación, no constituía en sí misma un factor de riesgo de anemia, por lo que se sugirió el estudio de combinaciones de polimorfismos genéticos (Sarria et al., 2007a). Así, se describió que la presencia simultánea de varios SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) en genes del metabolismo del hierro, tanto de sobrecarga como de deficiencia, explicaba un porcentaje elevado de la variabilidad genética de la transferrina sérica en la población general (Benyamin et al., 2009; Blanco-Rojo et al., 2011a). En esta línea, se ha constatado en mujeres con riesgo de anemia, la asociación entre biomarcadores del hierro y varios de estos SNPs. También se ha descrito en este grupo poblacional las interacciones entre 4 SNPs, 2 situados en el gen *HFE* (las mutaciones C282Y y H63D asociadas a sobrecarga de hierro o hemocromatosis) y 2 en el gen *TF*, rs1799852 y rs3811647, siendo este último el que se relaciona con niveles más desfavorables de la saturación de la transferrina y de la transferrina sérica; de modo que su efecto estaría compensado si se presenta simultáneamente con alguna de las otras variantes genéticas (Bertoncini et al., 2011; Blanco-Rojo et al., 2011a).

Los avances en el conocimiento de las diversas mutaciones que afectan al estado nutricional del individuo, han dado lugar recientemente a la aparición de una nueva disciplina, la nutrigenética. Los estudios de nutrigenética existentes en el ámbito del hierro se han centrado en las mutaciones del gen *HFE*. Así, se ha estudiado la influencia de la presencia de las mutaciones C282Y y H63D, bien en sujetos portadores de determinadas mutaciones o en enfermos de hemocromatosis, sobre la absorción y el estado del hierro. Hutchinson et al. (2008), demostraron mediante un estudio postprandial que la absorción de hierro era mayor en los portadores de mutaciones de *HFE*, tal como se esperaba, pero similar a la de pacientes con anemia ferropénica. Desafortunadamente en este estudio no se analizó el genotipo de los pacientes con anemia. Otros estudios han relacionado estado de hierro, la dieta y algunas mutaciones del gen *HFE* (C282Y, H63D y S65C) en poblaciones del Reino Unido (Cade et al., 2005; Fairweather-Tait et al., 2007) y España (Aranda et al., 2010). En este último trabajo se muestra que en portadores de mutaciones de sobrecarga férrica el consumo de calcio y fibra se asocia con menores almacenes de hierro.

1.6. Ingestas recomendadas de hierro

El conocimiento de la influencia de los aspectos nutricionales sobre la salud ha provocado una gran preocupación para conseguir establecer unas pautas o normas de referencia que sirvan de guía para garantizar un estado nutricional adecuado. En las primeras etapas, las recomendaciones se centraban en evitar las carencias nutricionales, sin embargo, posteriormente los conceptos se fueron ampliando, hasta llegar a las Ingestas Dietéticas de Referencia (*Dietary Reference Intakes, DRI*) que surgieron en Estados Unidos y Canadá. Dichas ingestas no sólo toman en cuenta las cantidades necesarias de nutrientes para evitar carencias, sino que constituyen los valores de referencia de los nutrientes que debe contener una dieta para prevenir las enfermedades debidas a sus deficiencias, reducir enfermedades crónicas y conseguir una salud óptima, aprovechando el potencial máximo de cada nutriente (Institute of Medicine, 2001). Las DRI incluyen 4 tipos de valores de referencia con aplicaciones concretas:

1. Requerimiento medio estimado (*Estimated Average Requirement, EAR*). Es el valor de ingesta diaria de un nutriente que se estima adecuado para cubrir las necesidades del 50% de un grupo homogéneo de población sana de igual edad, sexo y con condiciones fisiológicas y de estilo de vida similares. Es por tanto, una mediana (percentil 50) que puede coincidir con la media si los datos siguen una distribución normal. El EAR es el parámetro de elección para juzgar la adecuación de ingestas de grupos de población (estimar la prevalencia de ingestas inadecuadas) y para planificar dietas adecuadas para grupos.

2. Ingestas dietéticas recomendadas (*Recommended Dietary Allowances, RDA*). Se definen como la cantidad de un nutriente que se juzga apropiada para cubrir los requerimientos nutricionales de casi todas las personas (97.5 %) de un grupo homogéneo de población sana de igual edad, sexo y con condiciones fisiológicas y de estilo de vida similares.

Las RDA se calculan matemáticamente a partir del EAR. Considerando la variabilidad en los requerimientos entre individuos, el EAR se incrementa en una cantidad para tener la seguridad de que quedan cubiertas las necesidades del 97-98% de las personas del grupo. Todos los nutrientes se estiman de esta forma, excepto la energía que se establece como el requerimiento medio, sin ningún margen de seguridad. En España, los valores de referencia se conocen como Ingestas Recomendadas (IR) y corresponden al concepto de RDA. (Carbajal, 2003; Federación Española de Sociedades de Nutrición (FESNAD), 2010). La Tabla 5 muestra las EAR, RDA (Institute of Medicine, 2001) y las IR de hierro para la población española (Federación Española de Sociedades de Nutrición, 2010; Cuervo et al., 2009).

3. Ingesta adecuada (*Adequate Intake, AI*). Son estimaciones que se usan cuando no hay suficiente evidencia científica para establecer el valor del EAR y calcular las RDA, por lo que la ingesta se valora cualitativamente. Se basa en datos de ingestas medias de grupos de individuos sanos, determinadas por observación, experimentalmente o por extrapolación. El significado práctico de la AI es el mismo que el de las RDA. La distinción terminológica se refiere a la forma en la que se han calculado los dos valores. Generalmente la AI es numéricamente mayor que el EAR y posiblemente incluso mayor que las RDA, pero su precisión es menor.

Tabla 5. EAR, RDA e IR de hierro (mg/día)

| Categoría | Institute of Medicine | | | Ingestas Recomendadas para la población española | |
|---------------|-----------------------|------|------|--|----|
| | Edad (años) | EAR | RDA | Edad (años) | IR |
| Niños / niñas | 1 - 3 | 3,0 | 7,0 | 1 - 3 | 8 |
| | 4 - 8 | 4,1 | 10,0 | 4 - 5 | 8 |
| | 9 - 13 | 5,9 | 8,0 | 6 - 9 | 9 |
| Hombres | 14 - 18 | 7,7 | 11,0 | 1 - 13 | 12 |
| | 19 - 30 | 6,0 | 8,0 | 14 - 19 | 11 |
| | 31 - 51 | 6,0 | 8 | 20 - 29 | 9 |
| | 51 - 70 | 6,0 | 8 | 30 - 39 | 9 |
| | > 70 | 6,0 | 8 | 40 - 49 | 9 |
| | | | | 50 - 59 | 9 |
| | | | | 60 - 69 | 10 |
| | | | > 70 | 10 | |
| Mujeres | 9 - 13 | 5,7 | 8,0 | 10 - 13 | 15 |
| | 14 - 18 | 7,9 | 15,0 | 14 - 19 | 15 |
| | 19 - 30 | 8,1 | 18,0 | 20 - 29 | 18 |
| | 31 - 51 | 8,1 | 18 | 30 - 39 | 18 |
| | 51 - 70 | 5,0 | 8 | 40 - 49 | 18 |
| | > 70 | 5,0 | 8 | 50 - 59 | 15 |
| | | | | 60 - 69 | 10 |
| | | | > 70 | 10 | |
| Embarazo | 14 - 18 | 23,0 | 27 | | |
| | 19 - 30 | 22,0 | 27 | | 25 |
| | 31 - 50 | 22,0 | 27 | | |
| Lactancia | 14 - 18 | 7,0 | 10 | | |
| | 19 - 30 | 6,5 | 9 | | 15 |
| | 31 - 50 | 6,5 | 9 | | |

4. Ingesta máxima tolerable (*tolerable upper intake levels, UL*). Se define como el nivel más alto de ingesta diaria de un nutriente (a partir de alimentos, agua, alimentos fortificados y suplementos) que incluso de forma crónica, a largo plazo, no entraña riesgo para la salud de la mayor parte de los individuos de un grupo de población. Según aumente la ingesta sobre el nivel de UL, el riesgo de efectos adversos

aumentará. En el caso del hierro, el *Institute of Medicine* estableció que la ingesta máxima tolerable es de 40 mg de hierro al día para niños de 0 a 13 años y de 45 mg de hierro al día para adultos a partir de los 14 años, incluyendo mujeres embarazadas y lactantes (*Institute of Medicine*, 2001). Sin embargo, recientemente la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) considera que son insuficientes los datos disponibles para establecer un nivel máximo de consumo tolerable de hierro. Una dosis aguda de 60 mg de hierro por kg de peso corporal puede ser letal. Dosis orales de hierro por debajo de aproximadamente 10 a 20 mg de hierro por kg de peso corporal no causan toxicidad sistémica aguda. En cuanto a la administración oral a corto plazo, se han indicado efectos gastrointestinales adversos (por ejemplo, náuseas, malestar epigástrico, estreñimiento) con dosis de 50-60 mg diarios de suplementos de hierro no hemo, sobre todo si se administran sin alimentos. Además, se ha detectado sobrecarga de hierro con síntomas clínicos, como la cirrosis hepática, en personas que reciben tratamiento médico con altas dosis de hierro a largo plazo (160-1200 mg de hierro / día) (EFSA, 2006).

Aunque el objetivo de las RDA es cubrir los requerimientos del 97,5% de la población, es preciso hacer una excepción en el caso de las mujeres menstruantes, cuyas recomendaciones únicamente cubren al 90-95% de la población en cuestión (*Commission of the European Communities*, 1993). Esto es porque sus requerimientos de hierro pueden verse sesgados debido a que algunas mujeres tienen pérdidas menstruales abundantes. Por lo tanto, en el caso del hierro, para que las recomendaciones cubrieran al 97% de la población, deberían aumentarse a cantidades desproporcionadas y potencialmente excesivas (Harvey et al., 2013). Es por esto que la OMS y la FAO (*Food Agriculture Organization*) han establecido una serie de recomendaciones tomando en cuenta dietas con biodisponibilidad de hierro de 15, 12, 10 y 5 % (Tabla 6) (WHO / FAO, 2002).

Tabla 6. Recomendaciones de hierro basadas en la variabilidad de la disponibilidad del hierro dietético.

| Categoría | Edad (años) | Media de peso corporal (kg) | RDA* | | | |
|-------------------------|-------------|-----------------------------|--|------|------|------|
| | | | % de biodisponibilidad de hierro dietético | | | |
| | | | 15 | 12 | 10 | 5 |
| Mujeres no menstruantes | 11 - 14 | 46.1 | 9.3 | 11.7 | 14 | 28 |
| Mujeres menstruantes | 11 – 14 | 46.1 | 21.8 | 27.7 | 32.7 | 65.4 |
| | 15 – 17 | 56.4 | 20.7 | 25.8 | 31 | 62 |
| | > 18 | 62 | 19.6 | 24.5 | 29.4 | 58.8 |
| Postmenopausia | | 62 | 7.5 | 9.4 | 11.3 | 22.6 |
| Lactantes | | 62 | 10 | 12.5 | 15 | 30 |

* mg de hierro al día

1.7. Estrategias para la prevención de la anemia por deficiencia de hierro

Las estrategias dietéticas para corregir la deficiencia de hierro incluyen: modificación o diversificación de la dieta para aumentar la biodisponibilidad del hierro; suplementación con hierro, que se refiere a un aporte de altas dosis de hierro, sin modificar el consumo de alimentos; y fortificación de alimentos con sales de hierro (Zimmermann y Hurrell, 2007).

1.7.1. Modificación de la dieta

La prevención de la anemia ferropénica es uno de los principales objetivos de la OMS desde hace más de una década (WHO, 2001) y las estrategias nutricionales que se proporcionan deben aplicarse a los distintos grupos de riesgo. El papel de la dieta es fundamental en las primeras etapas de la deficiencia, ya que si llega a desarrollarse anemia ferropénica, la recuperación sólo puede realizarse a través de la farmacología.

En primer lugar, se debe aconsejar e informar a la población acerca de la ingesta dietética de hierro adecuada según su edad, situación fisiológica y género, teniendo en cuenta que la biodisponibilidad del mineral depende de varios factores. Dentro de las recomendaciones nutricionales y de estilo de vida para la prevención de la anemia por

falta de hierro en los grupos de riesgo se pueden mencionar (Vaquero et al., 2012; Vaquero y Navarro, 2013):

- Ingerir cantidad suficiente de hierro, teniendo en cuenta las ingestas recomendadas
- Evitar dietas hipocalóricas si no se tiene ni obesidad ni sobrepeso
- No restringir alimentos que contengan hierro hemo de alta biodisponibilidad
- Combinar en la misma comida alimentos ricos en hierro no hemo con estimulantes de su absorción (por ejemplo, legumbres con frutas cítricas), así como separar aquellos alimentos que contengan inhibidores de las comidas principales (por ejemplo, té o café)
- Acudir al médico en caso de hipermenorrea u otras hemorragias, alteraciones digestivas u hormonales, que podrían contribuir al desarrollo de anemia ferropénica.

En personas con deficiencia de hierro, el consejo habitual consiste en aumentar el consumo de carne. Un estudio realizado por Navas-Carretero et al., mostró que los 18 mg/día que se recomiendan (RDA, para cubrir al 97.5 % de la población) para mujeres en el rango de 19-30 años no se alcanzó aun cuando la dieta incluía 5 porciones de carne roja, 2 porciones de pollo y 1 porción de pescado blanco a la semana, por lo que, en el caso de grupos que presentan riesgo de anemia ferropénica, se propone la fortificación de los alimentos como una buena estrategia para alcanzar dicha recomendación. Sin embargo, a la población general se le recomienda un consumo de carne moderado, en beneficio de la salud cardiovascular. Así, dietas variadas ricas en alimentos de origen animal, como pescado, aves y carne, serían compatibles con el mantenimiento del estado de hierro sin perjudicar la salud cardiovascular (Navas-Carretero et al., 2008).

1.7.2. Suplementación

La suplementación oral con sales ferrosas (sulfato ferroso y gluconato ferroso) para el tratamiento de anemia ferropénica ha sido ampliamente utilizada debido a su bajo coste y alta biodisponibilidad (Zimmermann y Hurrell, 2007). El tratamiento estándar para anemia ferropénica es una dosis de sulfato ferroso de unos 100 mg de hierro al día. Aunque la absorción se ve incrementada cuando se toma en ayunas, el efecto adverso más frecuente en estas condiciones es dolor epigástrico y náuseas. Si las molestias continúan, el médico debe considerar disminuir la dosis o indicar que el hierro se consuma con los alimentos, aunque la absorción disminuye alrededor de 2/3 (Cook, 2005). Por ello, la mayor limitación de la suplementación es la baja adherencia al tratamiento debido a efectos adversos de tipo gastrointestinales (Zimmermann y Hurrell, 2007).

1.7.3. Fortificación de los alimentos

La fortificación de los alimentos es probablemente la solución más práctica, sostenible y rentable a largo plazo para prevenir la deficiencia de hierro y anemia ferropénica en grupos de riesgo. Su consumo, como parte de la dieta habitual, puede mejorar o mantener un óptimo estado de hierro de dichas poblaciones (Hurrell, 2002a; Blanco-Rojo et al., 2011b). Sin embargo, esto no es siempre fácil de lograr, ya que el hierro es el mineral más difícil de adicionar a los alimentos, por lo cual continúa siendo un reto para la industria (Hurrell, 2002a). Las investigaciones se centran actualmente en encontrar un compuesto de hierro que se absorba adecuadamente, que no cause cambios sensoriales en el alimento al que se adicione, que su absorción no se vea afectada por componentes de la dieta, tales como fitatos, compuestos fenólicos o calcio, y además que su coste no sea muy elevado. Así los factores que determinan una adecuada fortificación de los alimentos con hierro son (Hurrell et al., 1992; Hurrell, 2002b):

- La cantidad de hierro añadida
- La forma química del hierro fortificante

- El alimento a fortificar (matriz)
- El estado de hierro del individuo

En cuanto a la forma química del hierro a utilizar deben tenerse en cuenta dos características: la biodisponibilidad relativa de la sal y los cambios sobre la apariencia y las propiedades de los alimentos. La biodisponibilidad relativa va a depender de la solubilidad de los compuestos, los cuales se pueden dividir en tres grupos (Hurrell, 2002a):

- *Compuestos solubles en agua:* Estos compuestos tienen la mayor biodisponibilidad relativa (aproximadamente el 100%) y deberían ser la primera opción a elegir para la fortificación, siempre y cuando fueran aceptados sensorialmente. El compuesto soluble en agua más comúnmente utilizado es el sulfato ferroso, debido a su alta absorción y bajo coste, sin embargo, se adiciona a muy pocos tipos de alimentos, ya que causa cambios organolépticos. Las fórmulas infantiles, panes y pasta se pueden fortificar con sulfato ferroso (Hurrell, 1999). También puede utilizarse para la fortificación de harina de trigo si se almacena en períodos cortos (Cook y Reusser, 1983), de otra forma puede provocar la oxidación de la grasa y producir sabores desagradables (Hurrell, 1984). Se ha descrito que el sulfato ferroso y otros compuestos solubles causan cambios en el color de productos derivados de cacao (Douglas et al., 1981), cereales infantiles (Hurrell, 1984) y sal (Rao, 1985); sabor metálico en productos líquidos; y precipitados en salsa de soja y salsa de pescado (Hurrell, 2002b). El sulfato ferroso liofilizado es menos prooxidante en cereales que su forma hidratada (Hurrell et al., 1989).
- *Compuestos con baja solubilidad en agua, pero solubles en ácido:* Estos compuestos causan menos cambios organolépticos en los alimentos, pero su biodisponibilidad relativa dependerá de su disolución en los jugos gástricos durante la digestión. Los compuestos con mayor biodisponibilidad relativa dentro de este grupo son el fumarato ferroso, que se adiciona a cereales infantiles, y el succinato ferroso, que se adiciona a concentrados sólidos para

bebidas de chocolate. Otros compuestos son citrato férrico, tartrato ferroso y glicerofosfato férrico que son menos biodisponibles que los anteriores (Hurrell, 2002b).

- *Compuestos insolubles en agua y poco solubles en ácido:* Estos compuestos tienen una biodisponibilidad relativa muy variable y no se disuelven por completo en los jugos gástricos durante la digestión. Su absorción es difícil de predecir debido a que va a depender de sus características físicas (tamaño, forma y área de la partícula) así como de la composición de la matriz. Se clasifican en dos grupos: fosfatos férricos y hierros elementales en polvo. Dentro de los fosfatos férricos se encuentra el pirofosfato férrico (difosfato férrico), altamente utilizado para la fortificación de cereales infantiles y preparados para bebidas de chocolate. En estudios de absorción en humanos, se ha obtenido una absorción del 21 al 74%, con una absorción relativa casi tan buena como la del sulfato ferroso, mientras que la del ortofosfato férrico fue del 25 al 32% (Hurrell, 2002b).

Por otro lado, algunos autores han realizado estudios añadiendo hemoglobina o extracto de sangre como fuente de hierro. La hemoglobina (glóbulos rojos liofilizados) es la forma de hierro de mayor biodisponibilidad ya que el hierro hemo se absorbe intacto en el enterocito, sin posibles interacciones con los demás compuestos de los alimentos. Las desventajas son: su color intenso, bajo contenido de hierro (0.34%), que es un posible vehículo de infecciones y las dificultades técnicas en su recolección, secado y almacenaje (Hurrell, 2002a; Hurrell, 2002b). Navas-Carretero et al., (2009a) encontraron que la adición en pequeñas cantidades de un pigmento sanguíneo (Aprored) no mejoraba la absorción del pirofosfato férrico de un producto cárnico en mujeres con deficiencia de hierro.

Se han creado estrategias y nuevas formas de compuestos de hierro para contrarrestar los efectos de los inhibidores de la absorción del metal, entre las cuales se pueden mencionar:

- Adición de ácido ascórbico a la matriz alimentaria, por ser un potente estimulante de la absorción
- Fortificación con NaFeEDTA, el cual se ha visto que en presencia de ácido fítico es una buena fuente de hierro que se absorbe de 2 a 3 veces mejor que el sulfato ferroso (International Nutritional Anemia Consultative Group, 1993).
- Fortificación con bisglicinato ferroso, tiene la ventaja de ser más “natural” que el NaFeEDTA, sin embargo, hay pocos estudios disponibles sobre su absorción (Hallberg et al., 1989).
- Degradación del ácido fítico. Es posible degradar completamente el ácido fítico de los alimentos a través de métodos enzimáticos en cereales y legumbres (Hallberg et al., 1989).
- Encapsulación de los compuestos de hierro. La microencapsulación de compuestos de hierro en liposomas es una tecnología por la cual las sales de hierro quedan envueltas por una cobertura formada por una o varias bicapas fosfolipídicas, con un tamaño que oscila desde submicras a milímetros. Esto permite que se reduzcan las interacciones con otros componentes de los alimentos (De Vos et al., 2010), a la vez que un menor tamaño de partícula se absorbe mejor. Se ha observado que una reducción del tamaño de la partícula del pirofosfato férrico de 2.5 a 0.5 μm incrementa la biodisponibilidad relativa hasta el 95% (Wegmuller et al., 2004). Concretamente, la microencapsulación de compuestos ferrosos en liposomas tiene las siguientes ventajas:
 - Reduce las posibles interacciones de los compuestos de hierro con otros componentes de la dieta que pueden disminuir su biodisponibilidad, tales como los taninos, polifenoles y fitatos (Hurrell, 2002b).
 - Disminuye el efecto catalizador de la oxidación que ejercen los compuestos de hierro sobre las proteínas y lípidos del alimento en el que se incluye (Marquez Ruiz et al., 2003).
 - Reduce el sabor metálico de los compuestos de hierro.

- Reduce la irritación que con frecuencia producen los compuestos de hierro en la mucosa gástrica.

La industria ha desarrollado distintos tipos de compuestos de hierro encapsulados, entre los que se incluyen formas de sulfato ferroso, fumarato ferroso, pirofosfato férrico (difosfato férrico) y hierro elemental y se ha comparado su estabilidad al añadirlos a los alimentos (Zimmermann et al., 2003).

El pirofosfato férrico es sin duda el compuesto que ha despertado más interés en los últimos años como fortificante de los alimentos. Las metodologías de microencapsulación, disminución del tamaño de la partícula y una correcta elección de la matriz a fortificar, han hecho de esta sal un elemento de elección para la fortificación de alimentos (Hurrell, 2002b; Wegmuller et al., 2004; Zimmermann, 2004; Wegmuller et al., 2006; Blanco-Rojo et al., 2011b). Recientemente, se ha publicado el listado de sustancias autorizadas para la fortificación de los alimentos por la legislación europea (Commission Regulation (EU) No 1161/2011) en la que se incluye esta sal. El pirofosfato férrico microencapsulado en liposomas se utiliza tanto en forma líquida como en forma liofilizada, para fortificar una serie de alimentos como leche, yogures, zumos, productos horneados y fórmulas infantiles.

De todo lo anterior se deduce que la fortificación de los alimentos con concentraciones de hierro en dosis fisiológicas, en comparación con la suplementación con dosis más altas, puede ser una estrategia útil para aumentar la ingesta de hierro en poblaciones con mayores requerimientos de este mineral, siendo además la intervención más segura según manifiesta la OMS (WHO / FAO, 2006).

2. VITAMINA D

2.1. Deficiencia de vitamina D

2.1.1. Aspectos históricos

La deficiencia de vitamina D y sus consecuencias para la salud se conocen desde la época de la industrialización del norte de Europa y del noreste de los Estados Unidos. La construcción de las viviendas en estrecha proximidad con las industrias y la grave contaminación producida por la combustión del carbón, redujo la exposición solar, dando como resultado deformaciones en los huesos de los niños. Se estima que a finales del siglo XIX, el 80-90% de los niños de los Países Bajos y de Boston padecían raquitismo (Holick, 2006).

El conocimiento empírico, especialmente en países escandinavos y en las costas de la Gran Bretaña, sobre la eficacia del consumo de aceite de hígado de bacalao en la prevención y tratamiento del raquitismo, condujo al estudio científico de la enfermedad. Se demostró en ratones raquícticos que la irradiación con luz ultravioleta, era igualmente eficaz para el tratamiento de la enfermedad que el aceite de hígado de bacalao, sugiriendo por primera vez que el factor antirraquíctico era tanto un nutriente como una hormona. Estas observaciones promovieron que se utilizaran rayos ultravioleta en humanos para comprobar su actividad antirraquíctica.

En la década de 1920 se identificó la molécula de ergosterol o vitamina D₂ y posteriormente su análogo colecalciferol, o vitamina D₃, que se emplearon para la fortificación de la leche (Holick, 2006; Rajakumar et al., 2007). La fortificación de la leche y el uso extendido del aceite de hígado de bacalao, llevaron a la eliminación del raquitismo como problema de salud pública (Centers for Disease Control, 1999; Holick, 2006). Así, la fortificación de los alimentos con vitamina D se convirtió desde mediados del siglo XX en una práctica popular en los Estados Unidos, enriqueciendo todo tipo de alimentos como natillas, perritos calientes e incluso cerveza.

Hacia 1950, un brote de hipercalcemia en niños de Gran Bretaña, dio lugar a regulaciones que prohibían la fortificación de productos lácteos con esta vitamina en toda Europa. Años después, se aceptó la fortificación de la margarina y los cereales de desayuno, y finalmente en la última década del siglo XX, se aprobó la fortificación de la leche en Finlandia y Suecia (Holick, 2006).

Actualmente, asistimos a un renovado interés por la vitamina D y por su papel en la protección frente a otras enfermedades, además de las relacionadas con el metabolismo óseo. De hecho, recientemente se están investigando sus efectos beneficiosos en otras patologías como anemia ferropénica, cáncer, diabetes e hipertensión entre otras. (Holick, 2010).

2.1.2. Prevalencia de deficiencia de vitamina D y grupos de riesgo

La deficiencia de vitamina D es considerada un problema de salud pública (Holick y Chen, 2008). Se estima que aproximadamente 1000 millones de personas en el mundo padecen deficiencia o insuficiencia de vitamina D, que se definen por valores séricos de 25-hidroxivitamina D (25OHD) < 20 ng/mL (<50 nmol/L), y 21-29 ng/mL (51-74 nmol/L) respectivamente (Holick, 2007b; Holick y Chen, 2008). Sin embargo, Wahl et al. (2012), recientemente han analizado los estudios disponibles referentes al estado de vitamina D en población sana a nivel mundial, concluyendo que es difícil conocer la prevalencia real de deficiencia de vitamina D en las poblaciones debido a limitaciones de la información disponible. Deben tomarse en cuenta criterios como: la estación del año en la que se realiza el estudio (invierno / verano), la variabilidad del método utilizado para la medición de los niveles de 25OHD (radioinmunoensayo (RIA), técnica de inmunoensayo (ELISA), quimioluminiscencia, cromatografía líquida de alto rendimiento o espectrometría de masas), así como información adicional como el peso corporal, hábitos de vestimenta y pigmentación de la piel.

En el caso específico de España, aunque sea un país con muchas horas de luz solar, se ha encontrado una prevalencia de deficiencia del 63% en mujeres adolescentes (Mata-Granados et al., 2008) y del 61% en adultos jóvenes (Rodríguez Sangrador et al., 2010).

Además, recientemente se ha descrito que el 42% y el 50% de un grupo de mujeres con deficiencia de hierro presentaban deficiencia e insuficiencia de vitamina D, respectivamente (Blanco-Rojo et al., 2013). Recientemente, González-Molero et al. (2011), observaron que un tercio de la población española se encuentra en riesgo de padecer deficiencia de vitamina D.

Los principales factores de riesgo de padecer deficiencia de vitamina D están asociados con una baja ingesta dietética y con poca exposición solar. Debido a que el 90% del aporte de la vitamina proviene de la síntesis cutánea, éste es el factor más determinante en el desarrollo de la deficiencia (Holick, 2007b). La baja exposición al sol está asociada con estilos de vida, pigmentación cutánea, lugar de residencia (latitudes alejadas del ecuador), y prácticas culturales y religiosas relacionadas con la utilización de indumentarias que cubren la mayoría del cuerpo.

Las principales causas de deficiencia de vitamina D son (Holick, 2007a; Marañon et al., 2011):

- *Reducción de síntesis cutánea.* Se ha observado que con el envejecimiento, disminuye significativamente la capacidad de la piel para sintetizar vitamina D₃, debido a que existe una importante disminución de 7-dehidrocolesterol (7DHC) cutáneo (MacLaughlin y Holick, 1985). Una persona de 75 años tiene una reducción aproximada del 75 % en comparación con un adulto de 20 años (Holick et al., 2007). Además, la capacidad de síntesis cutánea se ve afectada por otros factores como:
 - Uso de cremas con filtro solar y pigmentación oscura de la piel, ya que la melanina de la piel no absorbe las radiaciones ultravioletas.
 - Estación y latitud. Hay una menor síntesis de vitamina D en invierno y en latitudes alejadas del ecuador, dado que la radiación ultravioleta es inferior.
 - Secuelas de quemaduras extensas, cuyo daño se asocia con una disminución 7DHC.

- *Reducción de la biodisponibilidad.* Al ser una vitamina liposoluble, los problemas de malabsorción de la grasa conllevan una disminución de la absorción de la vitamina D. Por ejemplo en el caso de la enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, determinados fármacos que reducen la absorción de colesterol y cirugías bariátricas.
- *Incremento del catabolismo de vitamina D,* relacionado con el uso de fármacos como anticonvulsivantes, glucocorticoides, tratamiento antirretrovirales y fármacos inmunosupresores
- *Disminución de la síntesis de 25OHD,* por fallo hepático.
- *Incremento de excreción urinaria de 25OHD,* como es el caso del síndrome nefrótico.
- *Disminución de síntesis de 1,25-hidroxivitamina D (1,25OHD),* por enfermedad renal crónica.
- *Factores genéticos:* raquitismo dependiente de vitamina D, de tipo 1, por la mutación del gen *CYP27B1* (1 α -hidroxilasa); tipo 2, por la mutación de receptor de la vitamina D (VDR); tipo 3, causada por sobreexpresión de la proteína de unión de elemento (*hormone responsive element binding protein*); raquitismo hipofosfatémico, causado por una mutación del gen que codifica el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), previniendo o reduciendo su degradación; raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, que causa niveles elevados de FGF23 y otros factores que regulan la actividad del fosfato.

Actualmente, se están estudiando con mayor profundidad y en grandes muestras de población otros factores genéticos involucrados en la actividad de la vitamina D. Estudios de asociación en población europea han identificado polimorfismos asociados significativamente con las concentraciones de 25OHD. Se han identificado polimorfismos en los genes *DHCR7*, que codifica la 7-dehidrocolesterol reductasa, los genes *CYP2R1*, *CYP24A1* que codifican a la 25-hidroxilasa y 24-hidroxilasa, respectivamente y el gen *GC*, que codifica la

proteína de transporte de vitamina D. Variantes genéticas en estos genes identifican a las personas de ascendencia europea que tienen riesgo elevado de insuficiencia de vitamina D (Ahn et al., 2010; Wang et al., 2010).

- *Otras enfermedades adquiridas.* Hiperparatiroidismo primario, hipertiroidismo y osteomalacia de origen neoplásico, entre otros.

2.1.3. Consecuencias para la salud

Sin vitamina D, únicamente el 10-15 % del calcio dietético y aproximadamente el 60% del fósforo son absorbidos. La interacción de la 1,25OHD, forma activa de la vitamina, con su receptor intestinal, hace que aumente la absorción del calcio dietético hasta un 30-40% y la del fósforo hasta un 80%. Esto explica que la principal consecuencia de la deficiencia de vitamina D para la salud, sea el desarrollo de enfermedades relacionadas con el metabolismo óseo (Holick, 2007b; Laird et al., 2010). Así, es bien sabido desde el año 1900, que una deficiencia severa de vitamina D ocasiona osteomalacia (en adultos) y raquitismo (en niños), enfermedades caracterizadas por deformidades esqueléticas producidas por un descenso de la mineralización de los huesos y cartílagos debido a niveles bajos de calcio y fósforo en la sangre. Concentraciones de 25OHD por debajo de 20 nmol/L, reducen la absorción intestinal de calcio y posiblemente también se ven disminuidas todas las actividades de la forma activa 1,25OHD. A estos niveles, las concentraciones de calcio (sérico o ionizado) disminuyen marcadamente con incremento de la parathormona (PTH) (Ryan et al., 2013).

Por otra parte, la evidencia clínica indica que la deficiencia de vitamina D, menos severa que la que causa osteomalacia, contribuye al desarrollo de osteoporosis, enfermedad caracteriza por un deterioro estructural del tejido óseo y una disminución de la densidad mineral ósea (Ryan et al., 2013), provocando un aumento de la susceptibilidad a las fracturas, generalmente de cadera, columna y muñeca. La osteoporosis es un problema importante de salud pública debido a la morbilidad y la discapacidad asociada, la disminución de la calidad de vida y la mortalidad (WHO, 2004).

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente en la edad adulta y uno de los problemas más importantes asociados a la edad y al envejecimiento. La masa ósea aumenta progresivamente durante el crecimiento y alcanza un pico máximo alrededor de los 30 años, para posteriormente producirse una pérdida progresiva del 0,3 – 0,4 % por año en ambos sexos. En las mujeres, ésta pérdida se incrementa después de la menopausia debido al déficit hormonal y alcanzando el 2 - 5 % por año (OMS, 2004; Reginster y Burlet, 2006). Se estima que alrededor de 200 millones de personas en el mundo padecen osteoporosis. Además, para el año 2050, se prevé que el número de fracturas de cadera aumente alrededor de tres o cuatro veces respecto al año 1990, cuando se estimó un mínimo de 1700000 (Reginster y Burlet, 2006). En España, dos millones de mujeres y medio millón de hombres están afectados por esta enfermedad y es la causa directa de 30000 fracturas de cadera al año, con una mortalidad de entre el 12 y el 20 %. De igual forma, la osteoporosis está asociada con el 90 % de todas las fracturas en personas mayores de 65 años (Alvarez y Peris, 2002).

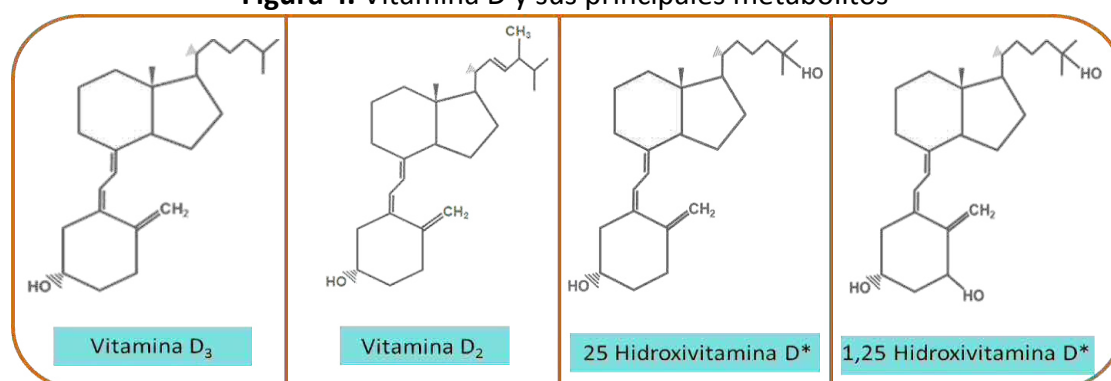
Otro problema asociado a la deficiencia de vitamina D es la debilidad muscular e incremento del riesgo de caídas, debido al papel de la vitamina D en el músculo esquelético. Se ha postulado que el 1,25OHD, a través del receptor de la vitamina D, regula la expresión de la síntesis proteica en el músculo esquelético (Holick y Chen, 2008). Además a través de vías no genómicas, parece ser que dicho receptor facilita la entrada del calcio al retículo endoplásmico y la posterior contracción muscular. En este sentido, distintos estudios muestran que un mejor estado de vitamina D se relaciona con menor riesgo de caídas en ancianos institucionalizados (Holick, 2007b). Así, la EFSA ha aceptado la declaración de salud “la vitamina D puede reducir el riesgo de caídas. La caída es un factor de riesgo de fracturas”, para ingestas totales de 20 µg (800 UI) por día, y población de 60 años o superior (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2011).

2.2. Nomenclatura de vitamina D

La vitamina D existe en dos formas: ergocalciferol (vitamina D₂) y colecalciferol (vitamina D₃). Existen numerosos derivados de la vitamina D que desempeñan un

papel particularmente importante a nivel metabólico, entre los que se pueden mencionar: calcidiol (25-hidroxivitamina D), calcitriol (1,25-hidroxivitamina D) y 24,25 dehidroxivitamina D₃. La Figura 4 y la Tabla 7 proporcionan una visión general de la vitamina D y sus principales metabolitos.

Figura 4. Vitamina D y sus principales metabolitos



*Se indican las formas para los metabolitos D₃. En el caso de las formas D₂, existe un doble enlace entre los carbonos C22 y C23 y un metilo en el C24.

Tabla 7. Vitamina D y sus principales metabolitos

| Nombre | Nomenclatura | Comentario |
|-------------------|------------------------------------|---|
| Colecalciferol | Vitamina D ₃ | Sintetizada en la piel Se encuentra en alimentos de origen animal Empleada en la suplementación y fortificación de alimentos |
| Ergocalciferol | Vitamina D ₂ | Se encuentra en algunos tipos de setas Empleada en la suplementación y fortificación de alimentos |
| Calcidiol | 25-hidroxivitamina D, 25OHD | Se produce por la hidroxilación de colecalciferol en el hígado. Biomarcador empleado para medir el estado de vitamina D. Refleja ingesta dietética y síntesis cutánea |
| Calcitriol | 1,25-hidroxivitamina D, 1,25OHD | Se produce por la hidroxilación de 25OHD. Forma más activa de la vitamina |
| Ácido calcitróico | 24 vitamina D, 24OHD | Producto de la hidroxilación de 25 vitamina D y 1,25OHD, que constituye el último paso para la degradación de la molécula |

2.3. Evaluación del estado de la vitamina D

Las concentraciones séricas de 25OHD permanecen estables durante semanas, por lo que son el indicador funcional del estado de vitamina D de los individuos. Sin embargo, hay controversia respecto a la concentración óptima de 25OHD suficiente para realizar sus funciones fisiológicas básicas en el hueso y también las funciones beneficiosas adicionales sobre el sistema inmunológico, metabolismo de la glucosa, sistema cardiovascular y cáncer, entre otros (Norman y Bouillon, 2010; van Schoor y Lips, 2011).

La deficiencia de vitamina D alude a niveles séricos de 25OHD que ocasionan enfermedades óseas histológicamente evidentes, tales como osteomalacia y raquitismo, mientras que la insuficiencia de vitamina D se refiere a alteraciones en los niveles de la PTH, la cual, si se prolonga en el tiempo puede contribuir a pérdida de masa ósea e incremento de fracturas (Wang, 2009). De manera general, el raquitismo en niños ocurre con niveles de 25OHD de 10 ng/mL (25 nmol/L), mientras que en adultos concentraciones 32 ng/mL (<80nmol/L) están asociados con una disminución de la absorción de calcio, osteoporosis e incremento del riesgo de fracturas (Heaney et al., 2003; Heaney, 2004). Por lo tanto, son generalmente aceptados los puntos de corte de deficiencia en 10 ng/mL (25 nmol/L) y de insuficiencia en 30 ng/mL (75 nmol/L) (Holick y Chen, 2008).

Sin embargo, el Instituto de Medicina de Estados Unidos (*Institute of Medicine*), basándose en la salud ósea, concluyó recientemente que concentraciones de 25OHD de 20 ng/mL (50 nmo/L) cubren los requerimientos de por lo menos el 97.5 % de la población (Ross et al., 2011). Por su parte, Holick (2007), teniendo en cuenta también las funciones extra esqueléticas de la vitamina, hizo la siguiente clasificación del estado de la vitamina D de acuerdo a las concentraciones séricas de 25OHD (Holick, 2007b; Holick y Chen, 2008):

- Deficiencia: 25(OH)D < 20 ng/ml (<50 nmol/L)
- Insuficiencia: 25(OH)D 21 - 29 ng/ml (51-74 nmol/L)

- Suficiencia: 25(OH)D > 30 ng/ml (> 75 nmol/L)
- Intoxicación: 25(OH)D >150 ng/mL (374 nmol/L)

2.4. Metabolismo de la vitamina D

2.4.1. Fuentes y absorción

El ser humano recibe el aporte de vitamina D a través de la síntesis cutánea y de la ingesta dietética.

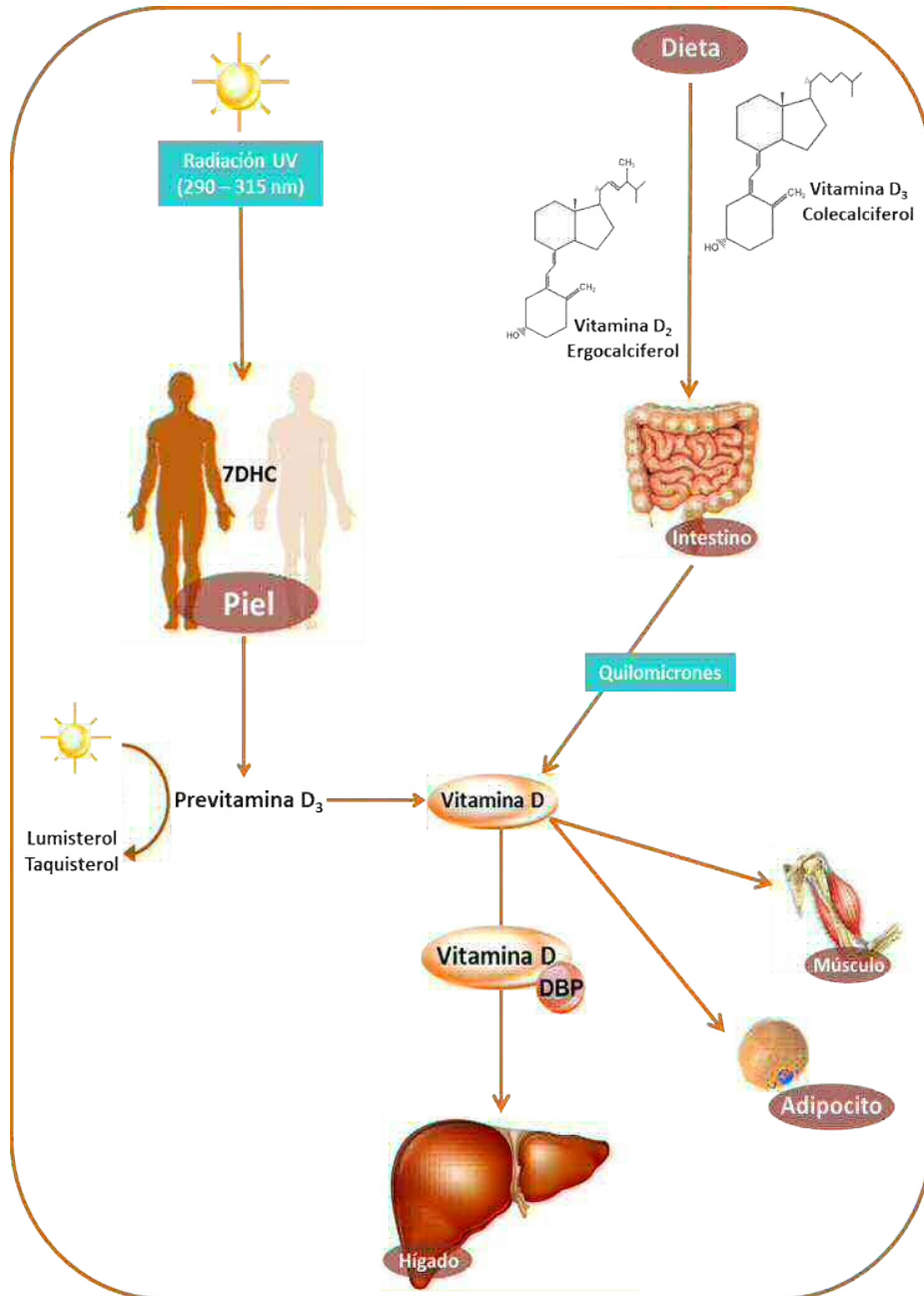
2.4.1.1. Síntesis cutánea

Como ya se ha comentado, la mayor fuente de vitamina D en los humanos es la luz solar. La síntesis endógena de vitamina D comienza en la piel. Cuando la piel se expone al sol, los fotones de los rayos ultravioleta (UV) (280-315 nm) son absorbidos en la membrana citoplasmática de la epidermis por el 7-dehidrocolesterol (7DHC), que se transforma en previtamina D₃ (Figura 5) (Tian et al., 1993; Christakos et al., 2012; Battault et al., 2013). Durante este proceso fotoquímico se forma el isómero cis-cis de la previtamina D₃, que es termodinámicamente inestable y se isomeriza a vitamina D₃ o colecalciferol (Holick et al., 2007). Si la exposición solar es muy prolongada, la previtamina D₃ en lugar de isomerizarse a vitamina D₃, se isomeriza a lumisterol y taquisterol que son moléculas biológicamente inactivas. Es por esto que la síntesis de vitamina D₃ muestra una meseta de alrededor del 10-15 % de 7DHC disponible (Battault et al., 2013).

Todo aquello que influya en el número de fotones UV que llegan a la piel, tiene un impacto sobre la fotosíntesis de previtamina D₃. La melanina, que es el protector solar natural de la piel, absorbe los rayos UV y disminuye marcadamente la producción de vitamina D₃ de la piel (Clemens et al., 1982). De la misma forma, las cremas solares impiden la producción de vitamina D₃. Una crema solar con factor de protección de 30, absorbe aproximadamente el 98% de la radiación solar ultravioleta y por lo tanto, reduce la síntesis de vitamina D₃. Del mismo modo, una persona de ascendencia afroamericana, puede tener cantidades de melanina equivalentes a un factor de

protección 15, por lo que su producción de vitamina D₃ puede verse reducida hasta en un 90% (Holick et al., 2007; Holick, 2012).

Figura 5. Absorción de vitamina D



7DHC, 7-dehidrocolesterol; DBP, proteína transportadora de vitamina D; UV, ultravioleta

El efecto de la luz ultravioleta sobre el estado de la vitamina D, varía en función de la distancia desde el ecuador. Así, en países que se encuentran en una latitud de 40° N, como España, la radiación de la luz ultravioleta es capaz de convertir el 7DHC en

vitamina D₃ en la piel durante aproximadamente 7 meses al año. Por el contrario, en los situados en latitudes de entre 55 - 65° N, la exposición a los rayos ultravioleta tiene lugar aproximadamente 5 meses al año (Norman y Bouillon, 2010).

La efectividad y duración de la exposición a los rayos ultravioleta depende también del ángulo cenital solar, ángulo entre la línea del cenit (el punto más alto en el cielo con relación al observador, que se encuentra justo sobre él en ángulo recto) y una línea dirigida hacia el sol (Gallagher y Sai, 2010). Cuando el ángulo cenital solar es oblicuo, el paso de la luz a través de la estratosfera de la capa de ozono es mayor, disminuyendo así el número de fotones que alcanzan la superficie de la tierra (Holick et al., 2007). El ángulo cenital solar es más oblicuo en invierno que en verano, razón por la cual en esta última estación la producción de vitamina D₃ es mayor (Webb et al., 1988). Por el mismo motivo, con la luz solar de las mañana y de la tarde, la síntesis cutánea de vitamina D₃ es menor (Holick et al., 2007).

2.4.1.2. Ingesta dietética y absorción

Además de la síntesis cutánea, la vitamina D puede obtenerse a través de la dieta. La vitamina D es liposoluble y desafortunadamente, son escasos los alimentos que la contienen, siendo los pescados grasos y extractos de hígado los que mayor contenido de vitamina D poseen (Norman y Bouillon, 2010). La vitamina D de los alimentos se encuentra en dos formas: vitamina D₃ (colecalfiferol), que se encuentra en fuentes animales; y vitamina D₂ (ergocalciferol), que se encuentra en fuentes vegetales (Battault et al., 2013). El ergocalciferol es fabricado a partir de levaduras a través de irradiación ultravioleta (Holick, 2007b).

La vitamina D que se consume a través de la dieta es absorbida y posteriormente transportada a través de los quilomicrones (Figura 5) (Battault et al., 2013). La dieta contribuye únicamente al 10 - 20 % de las reservas de vitamina D en los adultos, siendo este porcentaje aún menor en los niños (Sichert-Hellert et al., 2006; WHO, 2011b). Así, incrementar su ingesta a través de alimentos fortificados tales como cereales, quesos y leche es una buena estrategia para aumentar el consumo de vitamina D. La Tabla 8 muestra los alimentos que contienen más vitamina D de forma natural (Holick, 2007b).

Tabla 8. Alimentos ricos en vitamina D

| Alimento | Cantidad | Vitamina D |
|--------------------------------|---------------|--|
| Aceite de hígado de bacalao | 1 cucharadita | 400-1000 UI, Vitamina D ₃ |
| Salmón fresco (salvaje) | 100 g | 600-100 UI, Vitamina D ₃ |
| Salmón fresco de criadero | 100 g | 100 – 250 UI, Vitamina D ₃ y D ₂ |
| Salmón enlatado | 100 g | 300 – 600 UI, Vitamina D ₃ |
| Sardinas enlatadas | 100 g | 300 UI, Vitamina D ₃ |
| Caballa enlatada | 100 g | 250 UI, Vitamina D ₃ |
| Atún enlatado | 100 g | 236 UI, Vitamina D ₃ |
| Setas shiitake frescas | 100 g | 100 UI, Vitamina D ₂ |
| Setas shiitake, secadas al sol | 100 g | 1600 UI, Vitamina D ₂ |
| Yema de huevo | Unidad | 20 UI, Vitamina D ₂ o D ₃ |

UI, Unidades Internacionales. UI = 0.025 µg

2.4.2. Transporte

Los metabolitos de la vitamina D son transportados en la circulación unidos a la proteína transportadora específica de vitamina D (DBP, *vitamin D-binding protein*) (Battault et al., 2013). Del 85 al 90 % de la 25OHD y la 1,25OHD circulan unidas a la DBP, del 10 al 15 % unidos a albúmina y únicamente menos del 0.1 % circula en su forma libre (Bikle et al., 1985).

Existe una hipótesis que postula que únicamente las hormonas liberadas de sus proteínas transportadoras se introducen en las células y producen su acción biológica (Mendel, 1989). Sin embargo, en el caso concreto de la vitamina D aún no está del todo claro. Se ha visto en ratones, que la DBP aumenta la vida media de la 25HOD sérica y es un factor de protección contra deficiencia al ser un reservorio de la vitamina, aunque por otra parte, limita la acción biológica de un aporte externo de

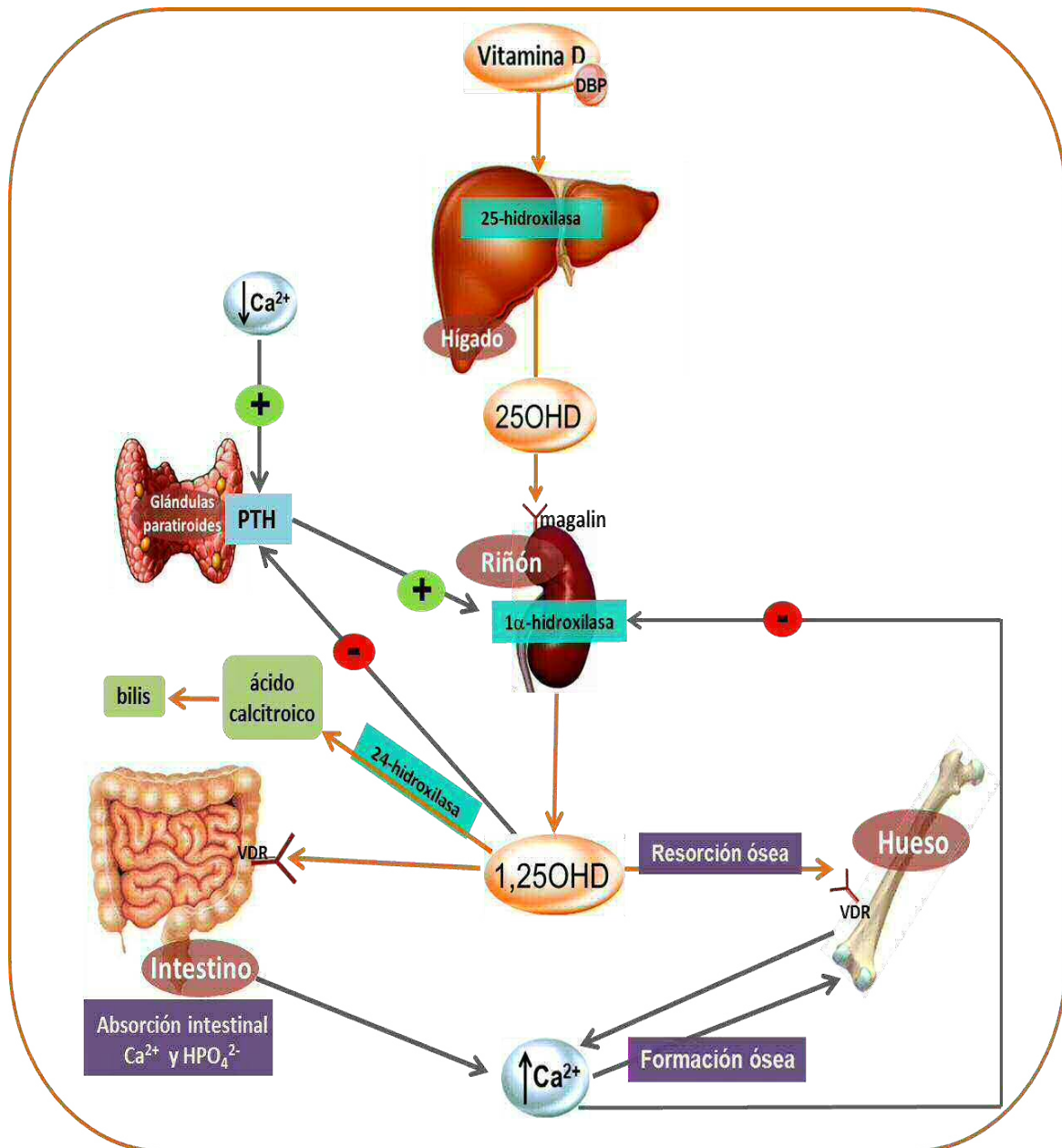
1,25OHD (Safadi et al., 1999). Además, otro estudio realizado en adultos jóvenes concluyó que las concentraciones de 25OHD libres se correlacionaron mejor con la densidad mineral ósea que los niveles de 25OHD unida a DBP (Powe et al., 2011). No obstante, Zella et al., (2008) demostraron en un modelo animal que la DBP aumenta las concentraciones totales de 1,25OHD en la sangre, pero no parece influir en los niveles de la hormona que están libres para entrar en las células y tejidos. Así, la unión de los metabolitos de la vitamina D a su transportador parece protegerlos de su catabolismo además de modular su actividad biológica, pero se requieren más estudios para aclarar su posible influencia en el caso de las acciones extra esqueléticas de la vitamina D.

2.4.3. Hidroxilación hepática

En el hígado, tiene lugar la hidroxilación de la vitamina D en el carbono de la posición 25, dando como resultado el metabolito 25OHD o calcidiol. Se ha demostrado la existencia de tres citocromos microsomales (CYP2R1, CYP2J2 y CYP3A4) y uno mitocondrial (CYP27A1), con capacidad hidroxilasa. Este último corresponde a la 24-hidroxilasa (Figura 6). Existen evidencias científicas que apuntan a que el citocromo CYP2R1 es la mayor 25-hidroxilasa, asociándose su deficiencia con la enfermedad de raquitismo dependiente de vitamina D tipo 1B (Pikuleva y Waterman, 2013). Además, algunos autores han observado mutaciones en el gen *CYP2R1* en personas con niveles bajos de 25OHD, con síntomas clásicos de deficiencia de vitamina D y en niños con raquitismo (Dong y Miller, 2004; Christakos et al., 2012).

La 25OHD es la mayor forma circulante de vitamina D, y es el último paso antes de convertirse en su forma activa. Los niveles séricos de este metabolito reflejan la ingesta dietética, la síntesis de la piel y las reservas corporales de la vitamina, por lo que se considera el biomarcador del estado de esta vitamina en el ser humano (Battault et al., 2013).

Figura 6. Metabolismo de la vitamina D



1,25OHD, 1,25 hidroxivitamina D; 25OHD, 25 hidroxivitamina D; Ca^{2+} , calcio; DBP, proteína transportadora de vitamina D; HPO_4^{2-} , fosfato; PTH, parathormona; VDR, receptor de vitamina D.

2.4.4. Activación

La captación de la vitamina D en el riñón es llevada a cabo por un receptor miembro de la familia de los receptores de lipoproteínas LDL, llamado megalina (LRP2). De esta forma, la 25OHD unida a la DBP, se filtra a través del glomérulo renal y se reabsorbe en

los túbulos proximales mediante internalización endocítica (Christakos et al., 2012). Un estudio realizado en ratones *knockout* de LRP2 mostró que la carencia de este receptor produce deficiencia severa de vitamina D y enfermedad ósea, lo que indica la importante implicación del receptor LRP2 en la preservación de los metabolitos de la vitamina D y en la internalización de la 25OHD en el riñón para su activación (Nykjaer et al., 1999).

Posteriormente, en el túbulo proximal del riñón, la vitamina D es hidroxilada en el carbono 1, dando como resultado la forma hormonalmente activa de la vitamina D, la 1-25-dihidroxitamina D, 1,25OHD o calcitriol, la cual es la responsable de las funciones biológicas de la vitamina (Christakos et al., 2012), también denominada hormona D.

El enzima responsable de la activación de la vitamina D es el citocromo P450 monooxigenasa, 1 α -hidroxilasa o CYP27B1. La inhibición de la expresión de *CYP27B1* causada por mutaciones genéticas, causa raquitismo dependiente de vitamina D tipo 1A, enfermedad autosómica recesiva caracterizada por un inicio temprano y severo de raquitismo. De momento, se han descrito 48 mutaciones en el gen *CYP27B1* asociadas a la reducción de su actividad enzimática o incluso su supresión (Pikuleva y Waterman, 2013).

Aunque el CYP27B1 se expresa principalmente en el riñón, también lo hace, en menor medida, en tejidos como piel, placenta, hueso, glándula paratiroidea y en monocitos y macrófagos (Bikle, 2009; Christakos et al., 2012). La síntesis extra-renal de la 1,25OHD juega un papel importante en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, tal es el caso de la piel, donde su actividad es necesaria para la maduración completa de los queratinocitos, células predominantes de la epidermis, de modo que actúan como una barrera eficaz frente a agresiones ambientales (Pikuleva y Waterman, 2013).

Por otra parte, los efectos del CYP27B1 en el metabolismo óseo se observan mediante su expresión en las tres principales células del hueso: osteocitos, osteoclastos y osteoblastos (Ryan et al., 2013). Estudios *in vitro* indican que la producción local de 1,25OHD por los osteoblastos estimula su diferenciación, favoreciendo la

mineralización ósea (van Driel et al., 2004; Atkins et al., 2007). Además, se ha visto que la regulación de la expresión del *CYP27B1* en los osteoblastos, es independiente de la renal (Anderson et al., 2004). Resultados obtenidos en modelos de ratones transgénicos con una expresión elevada de *CYP27B1* en osteoblastos y osteocitos, han mostrado que se incrementan los volúmenes de hueso cortical (hueso compacto) y trabecular (hueso esponjoso o reticulado) (Anderson et al., 2011). Dicho aumento es resultado de un incremento en la formación ósea más que de un cambio en la actividad de los osteoclastos (Ryan et al., 2013).

Para que la vitamina D pueda ejercer sus efectos biológicos, es necesaria la unión del 1,25OHD con el receptor nuclear de vitamina D (VDR) en los tejidos diana (Battault et al., 2013). El VDR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, incluyendo receptores de hormonas esteroideas y tiroideas y ácido retinoico. Tras la unión con su ligando 1,25OHD, el VDR forma un heterodímero con el receptor X retinoide (RXR) de manera que regula la transcripción de los genes de vitamina D. Este complejo de heterodímeros, interactúa con secuencias específicas del ADN (elementos de respuesta de vitamina D, *vitamin D response elements*, VDRE's), generalmente dentro del promotor de los genes diana, resultando en la activación o represión de la transcripción (Bikle, 2009).

2.4.5. Excreción

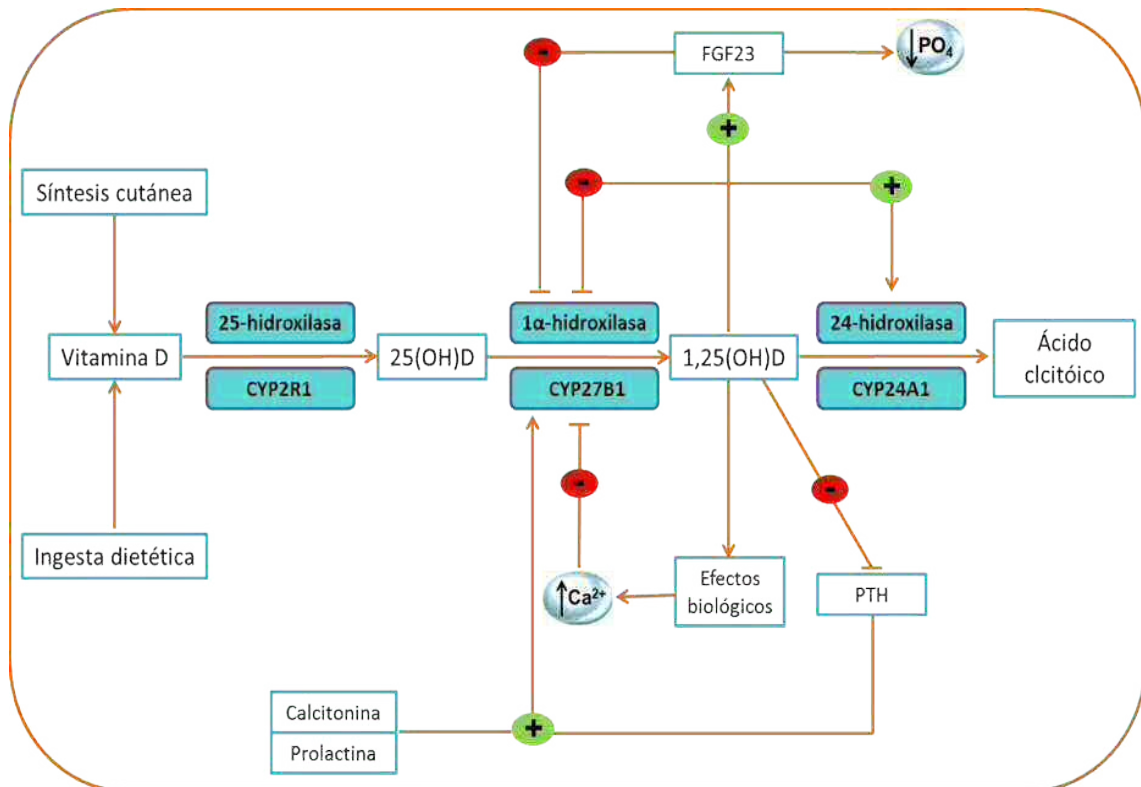
La 1,25OHD se degrada mediante el citocromo CYP24A1 (1 α ,25-hidroxivitamina D 24-hidroxilasa), que produce ácido calcitroico, que es hidrosoluble y excretado por la bilis (Holick, 2007b; Marañón et al., 2011). El citocromo CYP24A1 es una enzima mitocondrial de producción principalmente hepática, aunque también se expresa en los tejidos diana de la vitamina D, como riñón, hueso, intestino y piel. Dicha enzima se induce rápidamente en respuesta a la forma activa de la vitamina D (1,25OHD), a la cual inactivará a través de oxidaciones múltiples de su cadena de esteroides (Pikuleva y Waterman, 2013). Así, su función es catalizar reacciones de hidroxilación en los carbonos C-24 y C-23 del 25OHD y 1,25OHD. De hecho, este único citocromo es responsable de dos rutas distintas de catabolismo de la vitamina D. La primera se inicia

con la rotura de las cadenas entre el carbono 23 y 24 del la 1,25OHD, para posteriormente oxidar el C-23 hasta convertirlo en un grupo carboxilo, de manera que se forma el ácido calcitrónico, un compuesto hidrosoluble que es excretado por la bilis. Una transformación semejante ocurre con la 25OHD a través de esta ruta. La segunda ruta comienza con la hidroxilación del C-23, con lo que se forma el compuesto $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23$ -lactona (Martínez Gómez y del Campo Balsa, 1999; Jones et al., 2012). Se ha observado que el grado en el que se produce cada vía depende de la especie. Mientras que las cobayas utilizan la ruta de la hidroxilación del C-23, las ratas hidroxilan el C-24 a partir de 25(OH)D. En los humanos se han observado ambas rutas. Sin embargo, el significado biológico de las dos vías en las diferentes especies aún no está claro (Prosser et al., 2007; Jones et al., 2012).

Esto indica que el papel del CYP24A1 es limitar o atenuar la acción de la 1,25OHD, activada previamente en los tejidos diana, en un bucle de retroalimentación negativa (Figura 7). Así, el catabolismo de la vitamina D protege a las células de un exceso de vitamina D activa y previene su toxicidad (Jones et al., 2012). La pérdida de la funcionalidad del CYP24A1 produce hipercalcemia idiopática infantil, enfermedad rara caracterizada por retraso en el desarrollo, vómitos, deshidratación y nefrocalcinosis. (Pikuleva y Waterman, 2013).

2.4.6. Regulación del metabolismo de la vitamina D

En la Figura 7 se muestra un esquema de las rutas metabólicas y los principales reguladores de la vitamina D. Para que la vitamina D pueda ejercer todas sus funciones, es necesaria una regulación de la absorción y de los procesos de activación/desactivación de la misma. Esto ocurre gracias a retroalimentaciones positivas y negativas, que producen cambios en la expresión de las diferentes hidroxilasas responsables (Christakos et al., 2012).

Figura 7. Regulación de los procesos de activación/desactivación de la vitamina D.

1,25OHD, 1,25 hidroxivitamina D; 25OHD, 25 hidroxivitamina D; Ca^{2+} , calcio; FGF23, factor de crecimiento de fibroblastos-23; PTH, paratohormona.

2.4.6.1. Regulación por calcio, fósforo y hormona paratiroidea.

La 1α -hidroxilasa renal es estimulada por la PTH e inhibida por el calcio, el fósforo y por la propia 1,25 dihidroxivitamina D (Blike. 2009).

Se requiere una concentración de 25OHD de al menos 30 ng/ml (75 nmol/l) para lograr una inhibición efectiva de la PTH. Una reducción del calcio sanguíneo por debajo de 8,8 mg/dl origina un aumento de PTH, lo cual provoca una movilización del calcio del hueso a través de la activación de los osteoclastos, produciéndose resorción ósea. Por otra parte, la PTH, al estimular la síntesis de 1,25OHD, incrementa la absorción cálcica en el intestino (Holick, 2007b; Christakos et al., 2012).

2.4.6.2. Regulación por otros factores

El factor de crecimiento de fibroblastos-23 (FGF23) es un regulador fisiológico de la vitamina D. Su efecto más destacado es incrementar la excreción urinaria de fósforo.

La 1,25OHD estimula la expresión de *FGF23* en el hueso, el cual inhibe la 1α -hidroxilasa y estimula la 24-hidroxilasa renal, impidiendo así la activación y promoviendo el catabolismo de la vitamina D. Una vez que los niveles séricos de 1,25OHD han descendido, disminuye también la expresión de *FGF23*, formando así un circuito de retroalimentación negativa entre la vitamina D y el *FGF23* (Shimada et al., 2004).

La calcitonina también desarrolla un papel importante en la regulación de la vitamina D. Es una hormona producida por las células C de la glándula tiroidea. Entre sus funciones fisiológicas se encuentran la inhibición de la resorción ósea, la inhibición de la secreción de prolactina y los efectos sobre el intercambio de calcio materno-fetal. Por otro lado, es sabido que en condiciones de hipocalcemia, la PTH estimula la transcripción de la 1α -hidroxilasa, con lo que se incrementa la síntesis de 1,25OHD. Sin embargo, en normocalcemia este mecanismo es ineficaz. Por lo tanto, bajo estas condiciones, la calcitonina realizaría la función de la PTH, incrementando la activación de la 25OHD e incrementando también la transcripción de la 1α -hidroxilasa (Yoshida et al., 1999; Zhong et al., 2009).

Otro factor que interviene en la regulación del metabolismo de la vitamina D, es la prolactina, hormona secretada en la hipófisis, que estimula la producción de leche en las glándulas mamarias y la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo. Se ha visto, que una elevada concentración de prolactina, estimula la producción de 1,25OHD y la expresión de la 1α -hidroxilasa, además de favorecer la absorción intestinal de calcio mediante la regulación de las proteínas transportadoras de calcio intestinal (Ajibade et al., 2010).

Por lo tanto, la calcitonina y la prolactina tienen una relevancia biológica importante en el embarazo y en la lactancia, situaciones fisiológicas en las que es necesario un incremento en la absorción de calcio para proteger el hueso de la madre (Christakos et al., 2012).

2.5. Almacenamiento y toxicidad

El lugar de almacenamiento de la vitamina D es el tejido adiposo y el músculo y, a diferencia de otras vitaminas liposolubles, prácticamente no se almacena en el hígado.

A través de una dieta normal no es posible consumir cantidades excesivas de vitamina D. Sin embargo, se ha visto que la ingestión accidental o provocada de dosis mayores de 50000 UI por día elevan los niveles de 25OHD por encima de 150 ng/mL (374 nmol/L), los cuales están asociados con hipercalcemia, hiperfosfatemia e hipercalciuria secundarias (Holick, 2007b; Norman y Bouillon, 2010). Con el fin de evitar posibles intoxicaciones, el nivel máximo de ingesta de vitamina D al día tolerable se ha establecido en los siguientes valores, para las edades que se indican: 0-6 meses, 1000 UI; 6-12 meses, 1500 UI; 1-3 años, 2500 UI; 4-8 años, 3000 UI; y a partir de 9 años, incluyendo a mujeres embarazadas y lactantes, 4000 UI (Institute of Medicine, 1997).

2.6. Funciones de la vitamina D

2.6.1. Funciones en el metabolismo óseo

La forma activa de la vitamina D, 1,25OHD incrementa la absorción de calcio a través del VDR. Dicho receptor regula a su vez la expresión del gen del canal epitelial de calcio (TRPV6) y de la calbindina, o proteína de unión de calcio (*calcium binding protein*). De igual forma, la 1,25OHD incrementa la absorción intestinal de fosfato, así como su reabsorción en el riñón, a través de la síntesis del FGF23. Por todas estas vías, la vitamina D mantiene un equilibrio fosfo-cálcico sanguíneo adecuado, lo cual favorece la mineralización y regula el remodelado óseo, que es la principal función de la vitamina D (Ryan et al., 2013).

2.6.1.1. Remodelado óseo

El tejido óseo sufre un recambio constante predominando la formación durante procesos fisiológicos como el crecimiento. En un esqueleto maduro, el remodelado óseo sirve para reemplazar el hueso viejo y dañado por hueso nuevo. Además es importante para el mantenimiento de la homeostasis mineral, el equilibrio ácido-base

y el mantenimiento y protección de la médula ósea (Boyce et al., 2012). Este proceso es el responsable de la completa regeneración del esqueleto de un adulto cada 10 años (Manolagas, 2000).

El tejido óseo está formado por un componente celular y una matriz proteica. El componente celular está formado por los osteoblastos y los osteoclastos, mientras que la mayor parte de la matriz proteica (90%) está formada por el colágeno tipo 1. El resto de dicha matriz está formada por otras proteínas no colágenas, que incluyen, entre otras, los proteoglicanos, glicoproteínas y osteocalcina, las cuales se incorporan a la matriz colágena durante o después de su formación (Alvarez y Peris, 2002).

El remodelado óseo es un proceso complejo que se produce en determinados lugares del esqueleto llamados unidades de remodelado óseo, y es producto de la acción de los osteoblastos (células formadoras de hueso), de los osteocitos (células situadas en la matriz ósea), de los osteoclastos (células encargadas de la resorción) y las células de revestimiento óseo. El conjunto de osteoclastos y osteoblastos que actúan coordinadamente sobre una misma superficie ósea para su remodelación, constituye la unidad multicelular básica (*basic multicellular unit*: BMU). El tejido resultante de la acción de esta unidad se denomina unidad estructural ósea (Reynaga Montesinos y Zeni, 2009; Boyce et al., 2012).

El remodelado óseo comprende cuatro etapas: activación, resorción, reposo y formación (Boyce et al., 2012). La activación es la atracción desde la circulación de los precursores osteoclásticos, su diferenciación a osteoclastos maduros y su activación (Reynaga Montesinos y Zeni, 2009; Kular et al., 2012). Los mecanismos por los cuales los osteoclastos son atraídos a los sitios de resorción siguen siendo poco conocidos. Sin embargo, algunos estudios indican que, en respuesta a fuerzas mecánicas, los osteocitos regulan el reclutamiento de los osteoclastos en los sitios de resorción (Boyce y Xing, 2008).

Durante la segunda etapa, la de resorción, los osteoclastos excavan una cavidad en el hueso mediante la disolución del mineral, al producir un microambiente en la superficie del hueso, y mediante la degradación de la matriz colágena a través de la

acción de enzimas. En consecuencia se liberan minerales desde la matriz ósea a la sangre, entre los que destacan los iones de calcio y fosfato. La resorción es un proceso rápido que dura aproximadamente 10-12 días y que finaliza con la apoptosis del osteoclasto. Así, los osteoclastos dan lugar a una cavidad erosionada que es revestida por células mononucleares durante la fase de reposo. Esta fase también es conocida como la transición de la actividad osteoclástica a la osteoblástica (Alvarez y Peris, 2002). En la última etapa del remodelado óseo, los osteoblastos sintetizan una nueva matriz orgánica denominada osteoide, que posteriormente se mineralizará (Reynaga Montesinos y Zeni, 2009).

La duración del remodelado óseo varía en función de la localización, siendo menor en el hueso cortical que en el hueso esponjoso. Este último tiene una duración promedio de 200 días, con la mayor parte del tiempo (aproximadamente 150 días) destinado a la formación (Kular et al., 2012).

El remodelado óseo es el resultado de la acción conjunta de varias células, por lo que la señalización y comunicación entre ellas es muy importante para regular dicho proceso.

2.6.1.1.1. Regulación del remodelado óseo

El remodelado óseo se inicia en respuesta a varios estímulos, entre los que se encuentran: daños en alguna parte del hueso, como consecuencia al desgaste normal; generación de microfracturas con pérdida de carga mecánica; cambios en las fuerzas mecánicas, por modificaciones en la forma corporal, el peso o el ejercicio; baja concentración de calcio en el líquido extracelular; y la liberación local de citoquinas o factores de crecimiento, debido a alteraciones en los niveles de hormonas sistémicas. Es un proceso finamente regulado, en el que la formación sigue a la resorción específicamente en cada sitio donde se realice, encontrándose más de un millón de estos focos microscópicos de BMU en cualquier momento en el esqueleto adulto (Boyce y Xing, 2008).

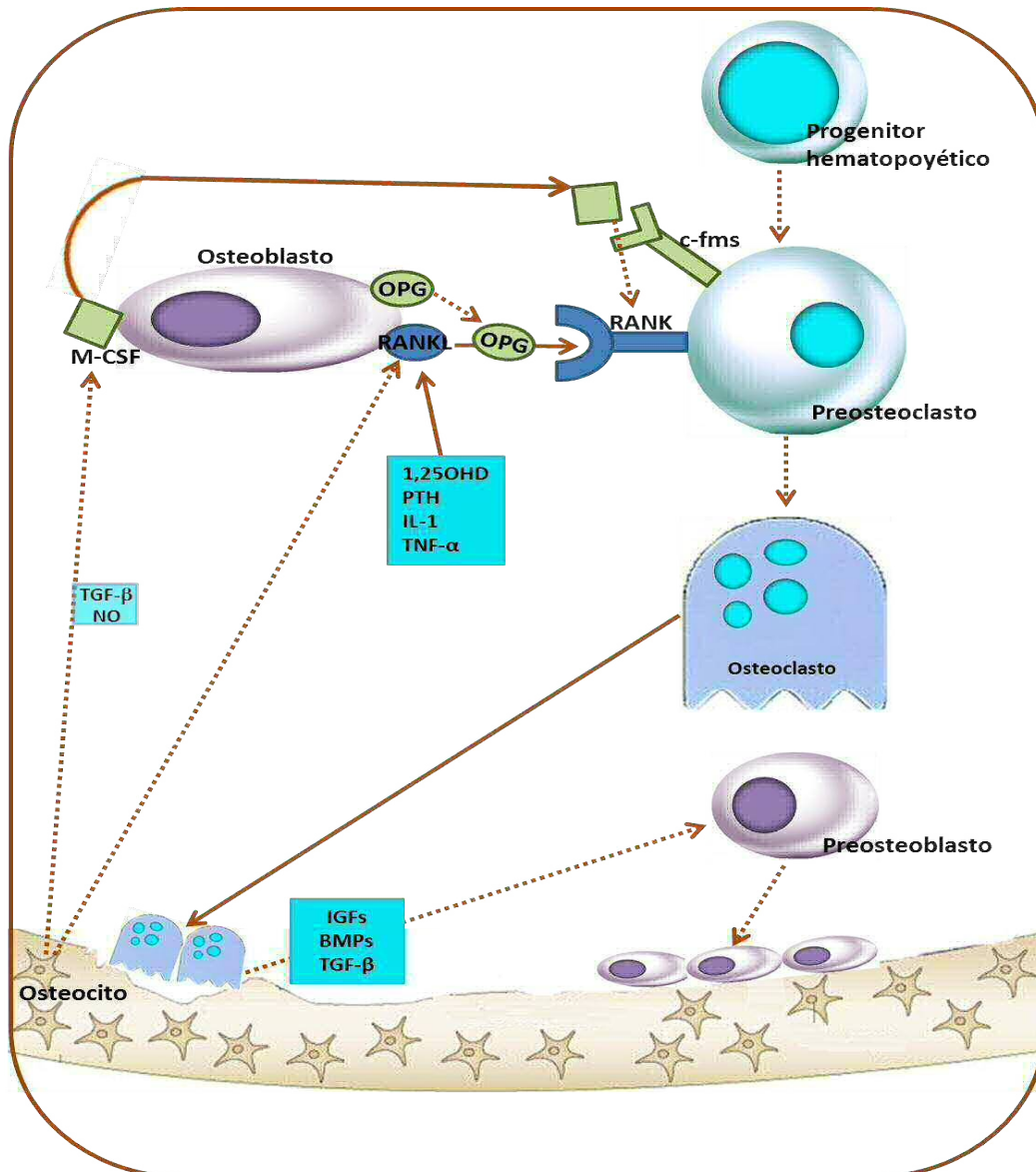
Para que se inicie el remodelado óseo debe existir una correcta comunicación osteoblasto-osteoclasto. Los osteoclastos son células multinucleares que se pueden encontrar en dos estados funcionales con diferencias morfológicas entre sí: el móvil o el resortivo. En el estado móvil los osteoclastos se dirigen desde su localización en la médula ósea, hasta el sitio donde se requiere que actúen, y en el estado resortivo es cuando realizan sus funciones (Kular et al., 2012).

Las células madre hematopoyéticas dan lugar a los precursores de los osteoclastos, los cuales necesitan de factores producidos por los osteoblastos y otras células, como los linfocitos T, para poder diferenciarse. Dos de los factores producidos por los osteoblastos que son necesarios y suficientes para promover la osteoclastogénesis son; el factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF) y el receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK), llamado RANKL. Así, para que se inicie la diferenciación se expresa el receptor RANK, tanto en las superficies de los preosteoclastos como en los osteoclastos maduros en respuesta a la unión del factor M-CSF con su receptor c-fms (Figura 8) (Lafita, 2003, Boyce y Xing, 2008). Otros factores que estimulan indirectamente la expresión del RANKL son la PTH, la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la 1,25OHD (Boyce y Xing, 2008). Recientemente se ha observado que los osteocitos tienen un papel muy importante en el remodelado óseo. Su apoptosis inducida en ratones transgénicos, incrementa la expresión de RANKL en los osteoblastos (Tatsumi et al., 2007), lo que sugiere que dicha apoptosis produce señales regulatorias que inician la reparación del hueso dañado. Del mismo modo, mediante sus prolongaciones dendríticas envían las señales químicas involucradas en la iniciación del remodelado óseo y determinan qué parte del hueso se degradará al censar las microfracturas y la pérdida de carga mecánica. Otras posibles señales osteocíticas son el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el óxido nítrico (NO), que inducirán la producción de M-CSF, (Reynaga Montesinos y Zeni, 2009).

Otro receptor importante producido por los osteoblastos es la osteoprotegerina (OPG), el cual liga a RANKL e impide su unión a RANK, limitando la formación del osteoclasto. Las concentraciones de RANKL y OPG limitan la diferenciación del osteoclasto en el hueso y por lo tanto la masa ósea (Boyce et al., 2012).

Investigaciones recientes apuntan que durante la resorción, los osteoclastos envían señales que estimulan la diferenciación de la célula precursora del osteoblasto, estimulando la formación. Dichas señales son: el factores de crecimiento de la insulina (isulin-like growth factors, IGFs), proteínas morfogénicas ósea (BMPs) o incluso el TGF- β (Figura 8) (Seeman, 2009).

Figura 8.Regulación del remodelado óseo



1,25OHD, 1,25 hidroxivitamina D; BMPs, proteínas morfogénicas ósea; c-fms, receptor del factor estimulante de colonia de macrófagos; IGFs, factores de crecimiento de la insulina; IL-1, interleucina-1; M-CSF, factor estimulante de colonia de macrófagos; NO, óxido nítrico; OPG, osteoprotegerina; PTH, paratohormona; RANK, factor nuclear kappa B; RANKL, receptor activador del factor nuclear kappa β ; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; TNF- α , factor de necrosis tumoral.

2.6.1.1.2 Valoración de la masa ósea y del remodelado óseo

La masa ósea es el factor que mejor se relaciona con la resistencia del hueso, por lo que su cuantificación predice el riesgo de fractura. Se han desarrollado técnicas que determinan el contenido mineral del esqueleto. La mayoría de ellas incluyen métodos radiológicos como la absorciometría dual de rayos X (DEXA), que puede realizarse en zonas específicas o en la totalidad del esqueleto, o bien, la tomografía computarizada cuantitativa (QCT). Estas técnicas son de gran utilidad para el diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis y habitualmente se realizan en las regiones en las que con más frecuencia se producen las complicaciones, tales como la columna lumbar y el fémur. Sin embargo, no indican la actividad del tejido óseo, es decir, cuál será la evolución de la masa ósea después de la medición. Es por esto, que se han desarrollado técnicas de marcadores bioquímicos en muestras de sangre y orina que permiten valorar de forma indirecta el metabolismo óseo (Alvarez y Peris, 2002).

Los marcadores bioquímicos del remodelado óseo son enzimas, proteínas o fragmentos de proteínas secretadas por los osteoblastos u osteoclastos, o bien secretados durante el proceso de formación o de resorción. Así, se han dividido en marcadores de formación, provenientes de la actividad de los osteoblastos, determinados en sangre y, los de resorción, provenientes de la actividad de los osteoclastos, medidos en sangre u orina (Alvarez y Peris, 2002; Reynaga Montesinos y Zeni, 2009). Cuando la resorción es más rápida que la formación, indica pérdida de masa ósea. De esa forma, aunque no sean una herramienta diagnóstica, son de gran utilidad para la identificación de individuos con alto remodelado, con el fin de poder emplear tratamientos preventivos para evitar la pérdida de hueso (Reynaga Montesinos y Zeni, 2009). La Tabla 9 muestra los principales marcadores óseos disponibles en la práctica clínica para medir la formación y resorción ósea.

Tabla 9. Principales marcadores del remodelado óseo

| Formación ósea | Resorción ósea |
|---|---|
| Fosfatasa alcalina total | Fosfatasa ácida resistente al tartrato (FART) |
| Fosfatasa alcalina ósea | Telopéptido de colágeno tipo 1 carboxilo terminal (CTX) |
| Osteocalcina (BGP) | Telopéptido de colágeno tipo 1 aminoterminal (NTX) |
| Péptido aminoterminal del colágeno tipo 1 (P1NP1) | Deoxipiridinolina libre (Dpir) |
| Propéptido C terminal del colágeno tipo 1 (PICP) | Piridinolina libre (Pir) |
| Osteocalcina no totalmente carboxilada (BGPu) | Hidroxiprolina (HIP) |
| | Calcio / creatinina |
| | Sialoproteína ósea (BSP) |
| | Glucósidos de hidroxilisina (GHIL) |

Las ventajas del uso de los marcadores bioquímicos del remodelado óseo es que dan una visión general de lo que sucede en el conjunto del esqueleto, se pueden realizar en períodos cortos de tiempo, dada la facilidad de la obtención de la muestra, además de ser relativamente baratos (Alvarez y Peris, 2002; Lafita, 2003). Es por esto, que ha habido un gran interés en los marcadores de remodelado óseo como herramientas clínicas para evaluar el riesgo de fractura y monitorizar el tratamiento, para elegir así las estrategias de intervención (Vasikiran et al., 2011).

En cuanto a valoración de la respuesta y monitorización de un tratamiento, los marcadores más aconsejables son: NTX o CTX en orina, y CTX sérico entre los marcadores de resorción; y entre los marcadores de formación, la fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina y P1NP (Tabla 9). Los marcadores de resorción permiten detectar una reducción de la reabsorción ósea incluso al mes de tratamiento, mientras que la disminución de la formación se observa aproximadamente a los tres meses (Alvarez y Peris, 2002). Las guías Europeas para el diagnóstico y manejo de la osteoporosis en

mujeres postmenopáusicas recomiendan la osteocalcina y el P1NP dentro de los marcadores de formación y los productos resultantes de la rotura del telopéptido de colágeno tipo 1 como marcador de resorción. Sin embargo, aún hay incertidumbres sobre su utilidad clínica debido a su variabilidad, a la limitación de estudios que comparen la respuesta a diferentes tratamientos utilizando el mismo marcador y a que de momento no existen referencias establecidas por organismos internacionales (Vasikaran et al., 2011; Kanis et al., 2013).

2.6.2. Funciones beneficiosas adicionales de la vitamina D

Actualmente se ha identificado el VDR en numerosos tipos de células que no participan en la homeostasis del metabolismo óseo. Así, tejidos como el cerebro, mama, próstata, colon y células del sistema inmunológico responden a la forma activa de la vitamina D e incluso algunos de estos tejidos expresan el CYP27B1 (1α -hidroxilasa), enzima responsable de la activación de la vitamina (Bouvard et al., 2011)

Directa o indirectamente, la $1,25\text{OHD}$ controla más de 200 genes, incluyendo aquellos responsables de la regulación de la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y angiogénesis, lo que le confiere un papel importante en la homeostasis de diversos sistemas y en la prevención de ciertas enfermedades (Holick, 2007b).

2.6.2.1. Funciones en el sistema inmunológico

La vitamina D es un potente inmunomodulador. Se ha visto que en su forma activa y la 1α -hidroxilasa tienen un efecto importante sobre la inmunidad innata y adaptativa (Bikle, 2009). Hay evidencia de la presencia de VDR en células presentadoras de antígeno (*antigen-presenting cell*, APC), monocitos, macrófagos, linfocitos B y T, células dendríticas y *Natural Killer* (NK).

Entre los mecanismos de acción de la vitamina D sobre el sistema inmune, se han descrito: disminución de la respuesta inmune mediada por las células T colaboradoras tipo 1 (Th1), las cuales activan macrófagos y son responsables de la inmunidad mediada por células; disminución de la liberación de citoquinas de macrófagos;

producción de anticuerpos de células B y reducción de la liberación de IL-2 e interferón- γ de las células CD4 (Borradale y Kimlin, 2009).

Además, un incremento en la producción de vitamina D, resulta en una mayor síntesis de catelicidina, un péptido capaz de destruir agentes infecciosos como la bacteria *M.tuberculosis*, entre otros. Asimismo, hay estudios en los que se ha observado que con concentraciones de 25OHD por debajo de 20ng/mL (50 nmol/L), no se inicia la respuesta inmune innata de los monocitos y macrófagos, lo que puede explicar por qué las personas afroamericanas residentes en el hemisferio norte, que son más propensas a padecer deficiencia de vitamina D, también tienen mayor predisposición a contraer tuberculosis que las personas de raza blanca, además de ser menos agresiva la enfermedad en este último grupo poblacional (Liu et al., 2006; Holick, 2007b).

Otras observaciones indican que la deficiencia de vitamina D en poblaciones que viven en latitudes más altas (con menor exposición solar) está asociada con enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, asma o enfermedad de Crohn (Ponsonby et al., 2002; Bikle, 2009).

2.6.2.2. Metabolismo de la glucosa

La vitamina D ejerce un efecto beneficioso en la función de las células β del páncreas, además de mejorar la acción de la insulina. Los posibles mecanismos por los cuales la vitamina D parece influir en el metabolismo de la glucosa se citan a continuación:

- Directamente, mejorando la función de las células β del páncreas. Hay evidencia de la presencia de VDR y de la expresión de 1α -hidroxilasa en las células β del páncreas. De este modo, la vitamina D incrementa directamente la sensibilidad a la insulina a través de la estimulación de la expresión de los receptores de insulina y/o activando el receptor PPAR- δ , factor de transcripción expresado principalmente en el tejido adiposo y regulador principal de la diferenciación adipocitaria y participando en la homeostasis de la glucosa.

- Indirectamente mediante la regulación de las concentraciones de calcio extracelular. A través de su papel en este proceso, la vitamina D asegura un flujo adecuado de calcio a través de las membranas celulares en las células β y los tejidos periféricos diana de la insulina. Alteraciones en el flujo del calcio pueden tener efectos adversos en la secreción de la insulina, proceso dependiente de calcio (Pittas et al., 2007).

2.6.2.3 Sistema cardiovascular

Actualmente, se han publicado numerosos estudios transversales y longitudinales sobre la relación de la vitamina D con el riesgo cardiovascular. Se han encontrado asociaciones entre bajas concentraciones séricas de 25OHD e incremento en el riesgo de padecer eventos cardiovasculares y mortalidad (Wang et al., 2008; Leu y Giovannucci, 2011; Saliba et al., 2012). Sin embargo, las asociaciones observadas con marcadores específicos de riesgo cardiovascular no son consistentes y en algunos casos, son contradictorias, aun cuando se estudian en la misma población, con una proporción similar de hombres y mujeres y con los ajustes pertinentes de los factores confundentes (Melamed et al., 2008; Jorde et al., 2010; Jorde y Grimnes, 2011).

Los mecanismos por los cuales la vitamina D contribuye a disminuir el riesgo cardiovascular, se relacionan con su efecto en la presión arterial, actuando a través de la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Vaidya y Forman, 2010). Sin embargo, son escasos los estudios controlados aleatorizados diseñados especialmente para evaluar los efectos de la suplementación de vitamina D sobre los marcadores del riesgo cardiovascular, por lo que continúa siendo un tema de investigación de gran actualidad (Jorde et al., 2010; Jorde y Grimnes, 2011; Wang et al., 2012).

2.6.2.4 Eritropoyesis

Se ha sugerido una asociación entre la deficiencia de vitamina D y un mayor riesgo de anemia, menor concentración de hemoglobina y un mayor uso de estimulantes de producción de eritrocitos, lo que sugiere que la vitamina D tiene un efecto en la eritropoyesis (Sim et al., 2010). Dicha relación se ha observado en estudios en los que

la suplementación con vitamina D (Aucella et al., 2003) o su metabolito activo incrementan la eritropoyesis en cultivos celulares (Alon et al., 2002). El mecanismo puede deberse al incremento de la expresión del receptor de la eritropoyetina (Aucella et al., 2003). Sin embargo, se necesitan más estudios para profundizar en las acciones de los metabolitos de la vitamina D y su interacción con la eritropoyesis. Además, se carece de estudios sobre la posible sinergia de la fortificación con hierro y vitamina D en humanos.

2.6.2.5. Cáncer

Diversos estudios epidemiológicos, prospectivos y retrospectivos, indican que concentraciones séricas de 25OHD por debajo de 20 ng (mL (50 nmol/L) se asocian a un incremento del 30-50 % de riesgo de cáncer de colon, próstata y mama, además de con un incremento en la mortalidad por estas causas. De igual forma, se ha visto que la población que vive en latitudes altas presentan un riesgo mayor de padecer linfoma de Hodgkin, cáncer de colon, páncreas, próstata, ovario y mama, entre otros (Bikle, 2009; Holick, 2010).

El colon, la próstata y el tejido mamario, expresan el 1α -hidroxilasa. De esta forma, cuando una célula se convierte en maligna, el $1,25\text{OHD}$ inicia procesos apoptóticos y evita la angiogénesis, frenando la progresión tumoral. Una vez que la vitamina D ha cumplido su función, se estimula el CYP24 que la inactiva, formando ácido calcitroico. Así se evita que un exceso de vitamina D activa influya sobre el metabolismo fosfocálcico (Holick y DeLuca, 1974; DeLuca, 2004; Holick, 2010) y origine por ejemplo calcificaciones ectópicas u otras alteraciones metabólicas.

2.7. Ingestas recomendadas de vitamina D

Es difícil definir una adecuada ingesta de vitamina D, ya que el estado de esta vitamina en el individuo depende tanto de la dieta como de la exposición solar (Gallagher y Sai, 2010). Es por esto que existe una gran variabilidad de las RDA de los distintos países.

Tabla 10. RDA e IR de vitamina D por día

| Categoría | Instituto de Medicina | | | Ingestas Recomendadas para la población española | |
|---------------|-----------------------|----------------|----------------|--|-----------------|
| | Edad (años) | RDA (1997)* | RDA (2011) | Edad (años) | IR* |
| Niños / niñas | 1 - 3 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 1 - 3 | 300 UI (7,5 µg) |
| | 4 - 8 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 4-9 | 200 UI (5 µg) |
| Hombres | 9 - 13 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 10-13 | 200 UI (5 µg) |
| | 14 - 18 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 14 – 19 | 200 UI (5 µg) |
| | 19 - 50 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 20 - 29 | 200 UI (5 µg) |
| | 31 - 50 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 20 - 39 | 200 UI (5 µg) |
| | 51 - 70 | 400 UI (10 µg) | 600 UI (15 µg) | 40 - 49 | 200 UI (5 µg) |
| | > 70 | 600 UI (15 µg) | 800 UI (20 µg) | 50 - 59 | 200 UI (5 µg) |
| | | | | 60 - 69 | 300 UI (7,5 µg) |
| | | | > 70 | 400 UI (10 µg) | |
| Mujeres | 9 - 13 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 10-13 | 200 UI (5 µg) |
| | 14 - 18 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 14 – 19 | 200 UI (5 µg) |
| | 19 - 30 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 20 - 29 | 200 UI (5 µg) |
| | 31 - 51 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 20 - 39 | 200 UI (5 µg) |
| | 51 - 70 | 400 UI (10 µg) | 600 UI (15 µg) | 40 - 49 | 200 UI (5 µg) |
| | > 70 | 600 UI (15 µg) | 800 UI (20 µg) | 50 - 59 | 200 UI (5 µg) |
| | | | | 60 – 69 | 300 UI (7,5 µg) |
| | | | > 70 | 400 UI (10 µg) | |
| Embarazo | 14 - 18 | | | | |
| | 19 - 30 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | 2a. mitad | 400 UI (10 µg) |
| | 31 - 50 | | | | |
| Lactancia | 14 - 18 | | | | |
| | 19 - 30 | 200 UI (5 µg) | 600 UI (15 µg) | | 400 UI (10µg) |
| | 31 - 50 | | | | |

*Ingesta adecuada

Debido a las funciones beneficiosas que se le atribuyen a la vitamina D y a que es un campo de estudio de plena actualidad, recientemente el Instituto de Medicina de Estados Unidos y Canadá ha incrementado los valores de ingestas dietéticas de referencia para esta vitamina (Institute of Medicine, 1997; Institute of Medicine, 2011)

(Tabla 10), mientras que en Europa, los valores de referencia están en revisión (www.eurreca.org).

Como se ha mencionado con anterioridad, mediante la ingesta dietética no es posible cubrir los requerimientos de vitamina D. Además, en el caso concreto de España, a pesar de ser un país Mediterráneo con muchas horas de luz solar, se ha observado una alta prevalencia de deficiencia de vitamina D (González-Molero et al., 2011) por lo que tanto la suplementación como la fortificación de alimentos parecen ser herramientas valiosas para conseguir que la población mantenga unos valores adecuados de la vitamina.

2.8 Estrategias para la prevención de la deficiencia de vitamina D

2.8.1 Exposición al sol

La exposición a los rayos ultravioleta es una buena fuente de vitamina D, ya que como se ha comentado, el cuerpo humano tiene una gran capacidad para sintetizarla a través de la piel. Una persona en bañador expuesta a los rayos solares durante 1 dosis mínima para producir eritema equivale a la ingesta de 20 000 UI de vitamina D (Holick et al., 2007). Así, se ha demostrado que una exposición solar de brazos y piernas durante 5-30 minutos entre las 10:00 h y las 15:00 h, dos veces por semana, provee un aporte adecuado de vitamina D₃ (dependiendo del día, temporada, latitud y pigmentación de la piel) (Holick, 2007b).

Las cabinas de bronceado emiten entre un 2-6 % de radiación ultravioleta, por lo que son una buena fuente de vitamina D, sobre todo para personas con síndromes malabsortivos (Holick, 2007b). Se ha visto que aquellas personas que han recibido sesiones de bronceado tienen mayor concentración sérica de 25OHD (aproximadamente 46 ng/mL, 115 nmol/L) en comparación con aquellas que no utilizan este método (aproximadamente 24 ng/mL, 60 nmol/L). Además, las que las utilizaron por un período \geq 5 años, presentaron mayor densidad ósea de la cadera (Tangpricha et al., 2004).

Sin embargo, la recomendación de exposición a los rayos UV es un tema de controversia, debido a la preocupación de los dermatólogos con respecto a la elevada incidencia de melanoma, la forma más maligna de cáncer de piel, y muchos desestiman la importancia de la deficiencia de vitamina D sobre la salud argumentando que es suficiente el aporte de vitamina D a través de los alimentos (Calvo et al., 2005). De cualquier forma, es importante advertir a la población de que la exposición a los rayos UV debe hacerse de una manera moderada.

2.8.2 Suplementación

Tanto la vitamina D₃ (colecalfiferol) como la vitamina D₂ (ergocalciferol), se pueden utilizar para la suplementación y para la fortificación de alimentos, aunque algunos autores definen al ergocalciferol como la forma “artificial” de la vitamina (Battault et al., 2013). Al comparar ambas moléculas en términos de eficacia, Armas et al. (2004), comprobaron en dos grupos de personas con los mismos niveles séricos basales de 25OHD, que la suplementación de una dosis única de 50 000 UI de vitamina D₂ o D₃ marcadas, era comparable en términos de absorción, y que la elevación de la concentración de 25OHD, durante los primeros 3 días de la suplementación era similar. Sin embargo, a partir del tercer día, el grupo que consumía el suplemento de vitamina D₂ tuvo una caída de las concentraciones de 25OHD. De igual forma, Romagnoli et al., 2008, observaron que la suplementación con 300 000 UI en una dosis única de colecalfiferol es casi dos veces más efectiva en aumentar y mantener las concentraciones de 25OHD que el ergocalciferol (Romagnoli et al., 2008). Otros autores como Holick et al., (2008), no están de acuerdo y en un estudio controlado, aleatorizado con dosis diarias de 1000 o 500 UI de colecalfiferol o ergocalciferol durante 11 semanas, encontraron que ambas formas son igualmente efectivas en el aumento y mantenimiento de las concentraciones de 25OHD (Holick et al., 2008). Todo ello hace pensar que ambas vitaminas son igualmente efectivas.

Se ha estudiado el efecto de diversas dosis de suplementación con vitamina D en poblaciones sanas y con riesgo de deficiencia. Se ha visto que dosis de 800-5000 UI/día de vitamina D mejoran la salud ósea, disminuyendo la tasa de fracturas y caídas en adultos >65 años (Haines y Park, 2012). En niños con deficiencia de vitamina D, dosis

de 2000 IU/día y 50000 UI/semana durante 6 semanas, parecen ser igualmente efectivas para aumentar las concentraciones séricas de 25OHD por encima de 30 ng/mL (Holick et al., 2011). En adultos con deficiencia de vitamina D, una dosis de 600 000 UI administrada durante varias semanas restablece las reservas de la vitamina. Deben evitarse dosis únicas de 300 000 – 500 000 UI, además de no ser recomendable el uso rutinario de suplementos en la población general, ya que aunque hay evidencias de su posible beneficio, los estudios disponibles hasta el momento no son robustos en su diseño y hace falta evidencia científica de más alto nivel. En cualquier caso, dosis <2000 UI en adultos sanos, no parece causar efectos adversos. Sin embargo, para los pacientes que no están en riesgo de desarrollar deficiencia de vitamina D, la exposición al sol moderada es una forma barata y efectiva de mantener las reservas de vitamina D (Haines y Park, 2012).

2.8.3 Fortificación de alimentos

Debido a que la ingesta dietética de vitamina D en mujeres y hombres españoles mayores de 19 años presenta un rango de 1.5-3.3 y 1.8-4.8 µg/d, respectivamente, la fortificación parece ser una estrategia útil para prevenir la deficiencia y potenciar los efectos beneficiosos de la vitamina D en España (Serra-Majem, 2001).

La eficacia de la fortificación de alimentos con vitamina D ha sido estudiada por investigadores de todo el mundo, observándose que la fortificación de los alimentos incrementa las concentraciones de 25OHD de una manera dosis-dependiente (Kiely y Black, 2012). Sin embargo, aún es necesario profundizar y realizar más estudios controlados aleatorizados que muestren datos más sólidos sobre el efecto de alimentos fortificados con vitamina D en las concentraciones séricas de 25OHD, la prevención de la deficiencia y los beneficios potenciales para la salud.

En la actualidad un gran número de alimentos son fortificados con vitamina D. Dentro de la estrategia de fortificación, es indispensable encontrar una matriz adecuada, de preferencia que sea un alimento básico accesible a toda la población, en especial a los grupos de riesgo (Calvo et al., 2005). Por ejemplo, algunos autores sugieren que la fortificación de la harina de trigo puede ser más eficaz que la fortificación de leche en

países como India y Jordania, donde dicho alimento no es consumido habitualmente (Kiely y Black, 2012). En una reciente revisión, se presentan los resultados de algunos estudios controlados, aleatorizados sobre los efectos de la fortificación de alimentos con vitamina D en la salud ósea en diversos países (Black et al., 2012). En Europa, la EFSA ha aceptado la inclusión de ambas formas de vitamina, la D₂ y la D₃ para la fortificación de los alimentos y ha aprobado la declaración respecto a que dosis de 5 µg (200 UI) al día de vitamina D son efectivas para el mantenimiento de la salud ósea. Considera también aprobado que contribuye al mantenimiento la función muscular normal, el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. Sin embargo, considera que aún no se ha establecido una relación causa-efecto entre la ingesta de vitamina D y el mantenimiento de la salud cardiovascular normal (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2010).

ESTUDIOS REALIZADOS Y METODOLOGÍA

Para la realización de esta Tesis Doctoral se llevó a cabo un estudio de asociación entre los parámetros del metabolismo del hierro y los del metabolismo óseo, lípidos y presión arterial en mujeres en edad fértil. Además, se realizó la valoración de la ingesta habitual de energía, nutrientes y alimentos de dichas mujeres, y se estimaron sus pérdidas menstruales, relacionándolo todo ello con su estado de hierro.

Por último, se estudió el efecto del consumo, como parte de la dieta habitual, de un producto lácteo fortificado con hierro frente al equivalente con hierro y vitamina D, sobre el metabolismo de hierro, el remodelado óseo, lípidos y presión arterial en mujeres jóvenes con riesgo de anemia ferropénica.

Todos los estudios presentados en esta Tesis Doctoral fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid) y por el Comité Ético de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid).

La intervención nutricional con los productos lácteos fortificados con hierro o hierro y vitamina D fue registrada en ClinicalTrials.gov con el número NCT01739907.

Todas las determinaciones analíticas fueron realizadas con los correspondientes controles de calidad según los requerimientos de la norma ISO 9001:2008.

A continuación se presentan los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral y un resumen de la metodología empleada.

1. Estudios realizados

En base a los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo los siguientes estudios:

Estudio 1.

Estudio de la relación entre el estado del hierro y el metabolismo óseo en mujeres jóvenes; y efectos del consumo de una bebida fortificada con hierro o hierro y vitamina D sobre el remodelado óseo.

Publicación: Toxqui L, Pérez-Granados AM, Blanco-Rojo R, Wright I, de la Piedra C, Vaquero MP. Low iron status as a factor of increased bone resorption and effects of an iron and vitamin D fortified skimmed milk on bone remodelling in young Spanish women. Eur J Nutr, 2013. DOI: 10.1007/s00394-013-0544-4.

Estudio 2.

Efectos del consumo de una bebida fortificada con hierro o hierro y vitamina D sobre el metabolismo del hierro: ensayo controlado aleatorizado, doble ciego en mujeres jóvenes con deficiencia de hierro.

Publicación: Toxqui L, Pérez-Granados AM, Blanco-Rojo R, Wright I, González-Vizcayno C, Vaquero MP. Effects of an iron or iron and vitamin D-fortified flavored skimmed milk on iron metabolism: a randomized controlled double-blind trial in iron-deficient women. J Am Coll Nutr, 2013. 32(5):312-20. DOI: 10.1080/07315724.2013.826116.

Estudio 3.

Valoración de los cambios en la presión arterial, lípidos séricos y glucosa por el consumo de una bebida fortificada con hierro o hierro y vitamina D: estudio controlado aleatorizado.

Publicación: Toxqui L, Blanco-Rojo R, Wright I, Pérez-Granados AM, Vaquero MP. Changes in blood pressure and lipid levels in young women consuming a vitamin D-

fortified skimmed milk: a randomised controlled trial (Nutrients, 2013. 5(12):4966-77.
DOI: 10.3390/nu5124966)

Estudio 4.

Elaboración y diseño de un cuestionario sencillo y práctico para estimar las pérdidas menstruales: relación con parámetros hematológicos y ginecológicos en mujeres jóvenes.

Publicación: Toxqui L, Pérez-Granados AM, Blanco-Rojo R, Wright I, Vaquero MP. A simple and feasible questionnaire to estimate menstrual blood loss: relationship with haematological and gynaecological parameters in young women (enviado a BMC Women's Health)

Estudio 5.

Identificación de los principales factores dietéticos implicados en la biodisponibilidad del hierro y su asociación con los almacenes férricos en mujeres jóvenes.

2. Metodología empleada

2.1 Bebidas fortificadas

Para el estudio de intervención nutricional se diseñaron dos bebidas fortificadas con hierro o hierro y vitamina D a partir de leche desnatada. La cantidad añadida de hierro, o bien de hierro y vitamina D, se determinó en base a las ingestas dietéticas de referencia para la población española (FESNAD, 2010; Cuervo et al., 2009) tomando en cuenta también el reglamento europeo (No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 20 de diciembre de 2006), relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, particularmente a la importancia de que los nutrientes añadidos correspondan a dosis fisiológicas y a que el alimento que los proporciona deba consumirse como parte de la dieta habitual por el colectivo poblacional al que van dirigidos. Así, se diseñaron dos bebidas de composición idéntica, excepto en el contenido de vitamina D: bebida a base de leche desnatada enriquecida en hierro (Bebida Fe) y bebida a base de leche desnatada enriquecida en hierro y vitamina D (Bebida Fe+D) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de las bebidas lácteas fortificadas utilizadas en la intervención nutricional (por 100 mL de bebida).

| | Bebida fortificada con hierro (Fe) | Bebida fortificada con hierro y vitamina D (Fe+D) |
|-----------------------------|------------------------------------|---|
| Energía (Kcal) | 37 (156 kJ) | 37 (156 kJ) |
| Proteínas (g) | 3.1 | 3.1 |
| Hidratos de Carbono (g) | 5.4 | 5.4 |
| De los cuales azúcares (g) | 5.4 | 5.4 |
| Grasas (g) | 0.3 | 0.3 |
| De las cuales saturadas (g) | 0.2 | 0.2 |
| Colesterol (mg) | 2.6 | 2.6 |
| Calcio (mg) | 120 | 120 |
| Fósforo (mg) | 97 | 97 |
| Magnesio (mg) | 28.6 | 28.6 |
| Hierro (mg) | 3.1 | 2.9 |
| Vitamina D (µg) | 0 | 0.99 |

Ingredientes: Leche desnatada, azúcar, sucralosa, estabilizantes (E-452, E-412, E-407, E-339), aroma de vainilla, colorante (E-160a), pirofosfato férrico microencapsulado (Bebida Fe), y colecalciferol (bebida Fe+D).

Los productos Fe y Fe+D presentaron características organolépticas similares. La sal de hierro utilizada para la fortificación de la bebida fue pirofosfato férrico microencapsulado en liposomas. Dicha sal se encuentra incluida en el listado de sustancias minerales que pueden añadirse a los alimentos (Commission Regulation (EU) No 1161/2011). La cantidad de hierro añadida fue de 3 mg/100 mL y su composición analítica se determinó por el método de espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer, 5100PC). En cuanto a la vitamina D, se añadió 1 µg / 100 mL de colecalciferol, o vitamina D₃, y se determinó por espectrofotometría de masas (Agilent LC QQQ 6460).

2.2 Sujetos

Las voluntarias fueron reclutadas mediante anuncios en diferentes campus universitarios de Madrid (Complutense, Autónoma, Politécnica, San Pablo CEU), a través de la página web www.genutren.es y a través de difusión verbal en diferentes actos públicos.

Se reclutaron mujeres jóvenes, con edades comprendidas entre los 18 y 35 años, caucásicas, no fumadoras, no embarazadas, ni madres lactantes. Los criterios de exclusión fueron: amenorrea, menopausia, cualquier enfermedad que pudiera afectar el estado del hierro, incluyendo anemia ferropénica, talasemia o hemocromatosis, enfermedades gástricas crónicas (enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, úlceras sangrantes o colon irritable, *helicobacter pylori*) o enfermedad renal. Además, las mujeres tampoco podían haber donado sangre o haber consumido suplementos de hierro en los 4 meses previos al estudio.

Las voluntarias seleccionadas con estos criterios se dividieron en dos grupos de acuerdo a sus reservas de hierro:

Grupo de referencia: Mujeres con ferritina sérica >30 ng/mL y hemoglobina ≥11 g/dL. A este grupo se le realizó un seguimiento durante 16 semanas sin intervención.

Grupo de intervención nutricional: Mujeres con ferritina sérica ≤ 30 ng/mL y hemoglobina ≥ 11 g/dL. Además, en este grupo se excluyeron aquellas mujeres que tenían alergia a algún componente de las bebidas lácteas fortificadas.

Un total de 584 mujeres contactaron con el grupo de investigación y recibieron información sobre el estudio. A 289 de ellas, se les realizó una analítica para conocer su estado general de salud y sus niveles de hemoglobina y ferritina, de modo que se clasificaron en el grupo de intervención o en el grupo de referencia. Aquellas mujeres que se negaron a participar o no cumplían los criterios de inclusión fueron excluidas (n=104). Finalmente un total de 129 mujeres con deficiencia de hierro participaron en la intervención nutricional y 56 mujeres formaron el grupo de referencia. Todas las voluntarias recibieron información verbal y escrita sobre el estudio y firmaron un consentimiento informado aceptando su participación.

2.3. Diseño e intervención nutricional

El estudio se realizó en Madrid y consistió en un diseño aleatorizado, doble ciego, controlado de grupos paralelos de 16 semanas de duración, durante el invierno. La variable que se utilizó para el cálculo del tamaño muestral fue ferritina con un valor medio en población con deficiencia de hierro de 26 ± 16 ng/dL. Fijada la potencia estadística de 90% y un nivel de confianza de 95%, para detectar una diferencia mínima de 10 unidades entre grupos, se requería un mínimo de 54 sujetos por grupo.

Las 129 voluntarias seleccionadas para la intervención, fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos (Fe, n=64; o Fe+D, n=65). Un grupo consumió, como parte de su dieta habitual, la bebida láctea enriquecida en hierro, mientras que el otro grupo consumió la bebida enriquecida en hierro y vitamina D. La cantidad de hierro que ambas bebidas aportaron fue de 15 mg por ración al día (envase de 500 mL), correspondiente al 83.3% de las ingestas recomendadas, mientras que la bebida enriquecida en vitamina D aportó 5 μ g de colecalciferol por ración, correspondiente al 100% de las ingestas recomendadas para este grupo poblacional en España (FESNAD, 2010; Cuervo et al., 2009).

Durante la intervención nutricional con el alimento enriquecido, 16 participantes dejaron el estudio y 4 fueron excluidas por incumplimiento, por lo tanto, 109 voluntarias completaron el estudio (Fe, n=55; Fe+D, n=54).

Las voluntarias fueron instruidas para tomar un envase de la bebida separado al menos dos horas antes o después de otras comidas, y a agitarlo antes de beberlo. Si no podían consumirlo un día, se les indicó que al día siguiente bebieran dos. Se utilizó un cuestionario específico para valorar la adherencia al tratamiento.

2.4. Parámetros controlados

Todos los parámetros que se describirán a continuación fueron analizados en las voluntarias que formaban parte de los grupos de la intervención nutricional y del grupo de referencia, y estuvieron sujetos a los requerimientos de calidad de la norma ISO 9001-2012.

2.4.1. Medidas antropométricas, determinación de presión arterial, cuestionario de salud general y actividad física.

Las medidas antropométricas se tomaron mediante procedimientos estandarizados. Se midió el peso (báscula Seca, con una precisión de 100g), la altura (tallímetro incorporado a la balanza) y el perímetro de cintura, y se calculó el índice de masa corporal (IMC), [peso/talla² (kg/m²)]. La presión arterial sistólica y diastólica se midió mediante un tensiómetro digital automático validado (OMROM M6; Omrom Health Care Co., Kyoto, Japón). Para evitar variaciones inter-ensayo, la misma persona del equipo investigador, correctamente entrenada, se encargó de tomar las medidas antropométricas y la presión arterial de todas las participantes y en todos los tiempos, siempre bajo las mismas condiciones.

Al inicio, las voluntarias también completaron un cuestionario de salud general, para conocer si tenían antecedentes de hipertensión, hipercolesterolemia, hipo o hipertiroidismo, osteoporosis o enfermedad renal y para conocer si padecían algún tipo de enfermedad o tomaban algún medicamento.

En una entrevista personalizada cada vez que las voluntarias acudían a las analíticas, se les entregó un cuestionario de seguimiento para monitorizar su cumplimiento y conocer posibles factores que podían influir en las variables estudiadas (infecciones, operaciones, vacaciones con exposición al sol, etc). Además, se preguntó sobre la actividad física y posibles cambios en su estilo de vida (ocupación laboral, actividad física o deporte, tiempo y velocidad al caminar, horas de sueño).

2.4.2. Cuestionarios ginecológicos

Se emplearon dos cuestionarios ginecológicos. El primero se diseñó para conocer las características ginecológicas generales de las mujeres: edad de la menarquia, antecedentes de anemia ferropénica y grado de parentesco, si manchaban la cama en la noche durante las menstruación, si tenían pérdidas intermenstruales y el método anticonceptivo que utilizaban (tipo, duración y si cambiaron de método en los 3 meses previos o durante el estudio).

El segundo cuestionario fue diseñado para estimar las pérdidas menstruales. En este cuestionario se les pidió a las voluntarias que en cada período, anotaran durante la menstruación, el día del comienzo, la duración y el número de días intensos. También se les pidió que anotaran exactamente el número y tipo de compresas/tampones que utilizaron durante el día más intenso. Las voluntarias completaron este cuestionario durante 4 períodos menstruales consecutivos.

2.4.3. Valoración de la dieta

La valoración de la dieta fue realizada mediante un registro de 72 horas previamente validado (de Groot et al.,1996; Navas-Carretero et al., 2009b). El registro tenía que ser rellenado durante 3 días consecutivos, incluyendo un festivo. Las voluntarias fueron instruidas para apuntar de forma detallada todos los alimentos y bebidas que consumieron esos días, indicando el momento del día (desayuno, media mañana, almuerzo, merienda, cena o resopón), el peso aproximado o medidas caseras de las raciones, así como los ingredientes de los platos elaborados. El cálculo de la ingesta

diaria de alimentos, energía y macro y micronutrientes de la dieta se efectuó a través de un programa de valoración de dieta (DIAL, Alce Ingeniería) basado en las Tablas de Composición de Alimentos (Moreiras et al., 2011).

Además, las voluntarias contestaron un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FCA), elaborado y validado previamente por el grupo de investigación para conocer su consumo de hierro y de potenciadores y/o inhibidores de su absorción en el contexto de su dieta habitual.

2.4.4. Determinaciones analíticas

2.4.4.1. Marcadores hematológicos y bioquímicos del estado de hierro

Las participantes acudieron a las instalaciones del laboratorio tras 12 horas de ayuno. Las muestras de sangre fueron recogidas por venopunción entre las 8:00 y las 8:30 de la mañana. El suero y el plasma se obtuvieron por centrifugación (15 minutos a 1000g) y posteriormente se almacenaron a -80°C.

En la sangre total se determinaron los siguientes parámetros mediante técnicas estándar de laboratorio usando un autoanalizador (Symex NE 9100, Kobe, Japón): número total de hematíes, volumen corpuscular medio (VCM), índice de distribución de hematíes y hemoglobina (Hb). En suero, se analizó con un autoanalizador (Modular Analytic System Serum Work Area Analyzer. Roche, Suiza): hierro sérico, ferritina (Ft) y transferrina (Tf). La hemoglobina corpuscular media (HCM), capacidad total de unión a hierro (TIBC) y saturación de la transferrina se calcularon como se describe a continuación:

- $HCM (pg) = (Hb (g/dL) \times 10) / \text{número total de hematíes } (x10^{-12}/L)$
- $TIBC (\mu mol/L) = 25.1 \times Tf (g/L)$
- $\text{Saturación de la transferrina} = \text{hierro sérico } (\mu mol/L) / (TIBC) \times 100.$

El receptor soluble de la transferrina (sTfR) fue analizado por enzimo-inmuno-ensayo, ELISA (Human sTfR, Biovendor, Heidelberg, Alemania). Los coeficientes de variación intra- e inter ensayo fueron 6.8 y 6.3 %, respectivamente.

Todas las determinaciones del metabolismo del hierro se determinaron en los tiempos 0, 4, 8, 12 y 16 semanas.

2.4.4.2. Marcador del estado de la vitamina D (25-hidroxivitamina D)

La concentración de 25OHD se analizó en suero por la técnica de ELISA, técnica que determina conjuntamente las concentraciones de 25OHD₂ y 25OHD₃. Los coeficientes de variación intra- e inter- ensayo fueron 5.6 y 6.4 %, respectivamente (25-hydroxyvitamin D EIA, Immunodiagnosics system, UK).

2.4.4.3. Marcadores del metabolismo óseo

Como marcador de resorción ósea se analizó el telopéptido amino terminal del colágeno tipo 1 (NTx) en la segunda orina de la mañana en ayunas, por ELISA. Los coeficientes de variación intra- e inter- ensayo fueron 7.6 y 4.0 %, respectivamente (Osteomark®NTx Urine, Wampole Laboratories, USA). La creatinina urinaria se midió por un autoanalizador (modular Roche DDPP). El marcador NTx se expresa como equivalentes de nanomoles de colágeno óseo por litro por nanomoles de creatinina por litro (nM BCE/nM Cr).

El marcador de formación ósea analizado fue el propéptido aminoterminal del colágeno tipo 1 (PNP1) que se midió por quimioluminiscencia (Elecsys, Roche Diagnostics, USA). También se determinó la PTH en suero por quimioluminiscencia. Los coeficientes de variación intra- e inter- ensayo fueron: para P1NP 2.6 y 4.1 %, respectivamente y para PTH, 2.7 y 6.5 %, respectivamente.

Para evita el error inter- ensayo, todas las determinaciones del metabolismo óseo descritas se realizaron el mismo día para todos los tiempos de cada voluntario, en los tiempos 0, 8 y 16 semanas.

2.4.4.4. Parámetros del metabolismo lipídico y glucosa

En suero se realizó la determinación del colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos y glucosa mediante técnicas automatizadas; y se calcularon los índices de riesgo cardiovascular: colesterol total/HDL-colesterol y LDL-colesterol/HDL-colesterol.

2.5. Estadística

Los datos estadísticos se presentan como media \pm desviación estándar. Se realizó un test de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de la distribución de las variables. Las variables ferritina sérica, NTx urinario y triglicéridos se normalizaron mediante transformación logarítmica previamente a la realización de los análisis estadísticos.

Se realizaron correlaciones lineales de Pearson en el punto basal entre todas las variables cuantitativas. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los parámetros del estado del hierro y del metabolismo óseo, se realizaron regresiones lineales. En el caso de variables no paramétricas, se utilizó el test de Spearman.

Se aplicó el test de análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) para estudiar el efecto del tiempo y la interacción del tiempo x tratamiento. Además se realizó el test post hoc de Bonferroni para determinar las diferencias entre los tiempos. Se realizaron comparaciones entre los grupos Fe, Fe+D y el grupo de referencia, entre cada punto en el tiempo a través de un test de ANOVA. Para datos no paramétricos se utilizó el test de Kruskal Wallis.

Para estudiar la reproducibilidad del cuestionario de estimación de las pérdidas menstruales se utilizó el coeficiente α de Cronbach. También se llevó a cabo un análisis de *clusters* por el método de las K-medias.

Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo. Se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS (versión 20.0) y SigmaPlot (versión 12) para el análisis de los datos y la elaboración de los gráficos.

PUBLICACIONES

Bajas reservas de hierro como factor de una resorción ósea incrementada y efectos del consumo de un lácteo desnatado fortificado con hierro y vitamina d sobre el remodelado óseo en mujeres jóvenes españolas.

European Journal of Nutrition (2013) DOI: 10.1007/s00394-013-0544-4.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar si existe una relación entre el estado de hierro y el metabolismo óseo; y comparar los efectos del consumo, como parte de una dieta habitual, de una bebida láctea desnatada fortificada con hierro o hierro y vitamina D sobre el remodelado óseo en mujeres con deficiencia de hierro. **Métodos:** Se reclutaron mujeres jóvenes sanas deficiencia o con niveles normales de hierro (ferritina sérica ≤ 30 ng/mL o >30 ng/mL, respectivamente). Las mujeres con deficiencia de hierro fueron asignadas a una intervención nutricional que consistió en un estudio de diseño aleatorizado, controlado, doble ciego y paralelo de 16 semanas de duración realizado durante el invierno. Las voluntarias consumieron, como parte de su dieta habitual, una bebida láctea desnatada con sabor enriquecida en hierro (grupo Fe, n=54) o hierro y vitamina D (grupo Fe+D, n=55) (hierro, 15 mg/día; vitamina D₃, 5 μ g/día, 200 UI). Las mujeres con niveles normales de hierro siguieron su dieta habitual sin participar en la intervención nutricional (grupo R, n=56). La ingesta dietética, el peso corporal, los parámetros del estado de hierro, la 25-hidroxivitamina D (25OHD), la hormona paratiroidea (PTH), el péptido N terminal del colágeno tipo 1 (PNP1) y el telopéptido amino terminal del colágeno tipo 1 (NTx) fueron determinados. **Resultados:** Se encontraron asociaciones negativas entre los niveles basales del log-ferritina y el log-NTx ($p < 0.001$), y entre la transferrina y el P1NP ($p = 0.002$). Las concentraciones séricas de 25OHD se incrementaron (de 62 ± 21 a 71 ± 21 nmol/L, media \pm SD, $p < 0.001$), mientras que el P1NP y el NTx disminuyeron en el grupo Fe+D durante el estudio ($p = 0.004$ y $p < 0.001$, respectivamente). El NTx fue menor en el grupo Fe+D en comparación con el grupo Fe en la semana 8 ($p < 0.05$) y fue significativamente mayor en los grupos Fe y Fe+D en comparación con el grupo R durante el ensayo ($p = 0.01$). Las concentraciones de PTH no presentaron cambios. **Conclusiones:** La deficiencia de hierro está relacionada con un incremento en la resorción ósea en mujeres jóvenes. El consumo de un producto lácteo que aportaba 5 μ g/día de vitamina D₃, redujo el remodelado óseo e incrementó las concentraciones de 25OHD circulante casi hasta alcanzar a un estado óptimo de vitamina D, definido como concentraciones de 25OHD por encima de 75 nmol/L. **Palabras clave:** Biomarcadores del remodelado óseo; 25-hidroxivitamina D; deficiencia de vitamina D; deficiencia de hierro; alimentos fortificados; mujeres menstruantes.

Low iron status as a factor of increased bone resorption and effects of an iron and vitamin D-fortified skimmed milk on bone remodelling in young Spanish women

Laura Toxqui · Ana M. Pérez-Granados ·
Ruth Blanco-Rojo · Ione Wright ·
Concepción de la Piedra · M. Pilar Vaquero

Received: 19 March 2013 / Accepted: 4 June 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Purpose This study aimed to determine whether there is a relationship between iron status and bone metabolism, and to compare the effects of the consumption, as part of the usual diet, of an iron or iron and vitamin D-fortified skimmed milk on bone remodelling in iron-deficient women.

Methods Young healthy iron-deficient or iron-sufficient women (serum ferritin ≤ 30 ng/mL or >30 ng/mL, respectively) were recruited. Iron-deficient women were assigned to a nutritional intervention consisting of a randomised, controlled, double-blind, parallel design trial of 16 weeks during winter. They consumed, as part of their usual diet, an iron (Fe group, $n = 54$) or iron and vitamin D-fortified (Fe+D group, $n = 55$) flavoured skimmed milk (iron, 15 mg/day; vitamin D₃, 5 µg/day, 200 IU). The iron-sufficient women followed their usual diet without supplementation (R group, $n = 56$). Dietary intake, body weight, iron biomarkers, 25-hydroxyvitamin D (25OHD), parathyroid hormone (PTH), procollagen-type 1 N-terminal propeptide (P1NP), and aminoterminal telopeptide of collagen I (NTx) were determined.

Results Negative correlations were found between baseline log-ferritin and log-NTx ($p < 0.001$), and between transferrin and P1NP ($p = 0.002$). Serum 25OHD

increased (from 62 ± 21 to 71 ± 21 nmol/L, mean \pm SD, $p < 0.001$) while P1NP and NTx decreased in Fe+D during the assay ($p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively). NTx was lower in Fe+D compared to Fe at week 8 ($p < 0.05$) and was higher in Fe and Fe+D compared to R throughout the assay ($p < 0.01$). PTH did not show changes.

Conclusions Iron deficiency is related with higher bone resorption in young women. Consumption of a dairy product that supplies 5 µg/day of vitamin D₃ reduces bone turnover and increases circulating 25OHD to nearly reach an optimal vitamin D status, defined as 25OHD over 75 nmol/L.

Keywords Bone turnover markers · 25-hydroxyvitamin D · Vitamin D deficiency · Iron deficiency · Fortified food · Menstruating women

Introduction

Vitamin D deficiency is found in most countries all over the world and it is recognised as a pandemic problem [1]. Effects of vitamin D on bone health are well known. The primary effect of vitamin D is to enhance calcium absorption in the small intestine. Thus, vitamin D deficiency leads to decreased calcium absorption and calcium release from bone in order to maintain circulating concentrations [2]. Prolonged and severe vitamin D deficiency causes rickets in children and osteomalacia in adults [3]. Recently, vitamin D deficiency has also been associated with other disorders such as cancer, diabetes, hypertension, and autoimmune diseases [4].

Another important global health problem is iron deficiency anaemia. A relationship between iron and vitamin D

L. Toxqui · A. M. Pérez-Granados · R. Blanco-Rojo ·
I. Wright · M. P. Vaquero (✉)
Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN),
Spanish National Research Council (CSIC),
C/José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain
e-mail: mpvaquero@ictan.csic.es

C. de la Piedra
Department of Biochemistry Investigation, Fundación Jiménez
Díaz Institute for Medical Research (IIS-FJD), Madrid, Spain

deficiencies has been proposed [5]. Low 25-hydroxyvitamin D (25OHD) levels have been associated with low levels of erythrocytes, serum iron, and transferrin saturation, suggesting that vitamin D has an effect on erythropoiesis [6–8]. Regarding the possible role of iron in bone metabolism, it is known that this metal is a cofactor of prolyl and lysyl hydroxylases in collagen synthesis that play an important role in collagen maturation [9]. Studies in rats have shown that severe iron deficiency anaemia has a significant impact on bone, affecting bone mineralization [10–12], and there is one study in humans that found a positive association between dietary iron and bone mineral density in healthy postmenopausal women [13].

The main source of vitamin D for humans is sun exposure [14]. Even though Spain is a country with many hours of sunshine, studies have shown a high prevalence of vitamin D deficiency [15–17]. Blanco-Rojo et al. [8] found a very high prevalence of vitamin D deficiency or insufficiency (92 %) in a group of iron-deficient Spanish women.

Food fortification is probably the most practical and cost-effective prevention programme for correcting iron deficiency [18], and fortification with vitamin D is also a good strategy when sun exposure is limited, as few foods naturally contain this vitamin [1, 19]. However, except for infant formulas, very few products are fortified with both iron and vitamin D.

There are no reports regarding the effects of the intake of iron-fortified skimmed milk and the additional effects of the simultaneous fortification with vitamin D, on bone metabolism in iron-deficient subjects. Therefore, the aims of this study were: (a) to determine whether there is a relationship between iron status and bone remodelling in menstruating women, and (b) to compare the effects of the consumption, as part of the usual diet, of an iron or iron and vitamin D-fortified flavoured skimmed milk on bone metabolism in iron-deficient women.

Methods

Subjects

Volunteers were recruited by different announcements in press, university campus, and web pages of Madrid. The study was also verbally promoted at public events.

Healthy women aged 18–35 years, Caucasian, non-smoker, non-pregnant, non-breastfeeding were recruited. Those with low iron stores (serum ferritin ≤ 30 ng/mL, haemoglobin ≥ 11 g/dL) were assigned to the nutritional intervention and those with normal iron stores (serum ferritin > 30 ng/mL, haemoglobin > 11 g/dL) formed the reference group (R group) who followed their usual diet without supplementation.

For all subjects, the exclusion criteria were as follows: amenorrhoea, menopause, any known health problems likely to influence iron status including iron metabolism-related diseases (iron deficiency anaemia, thalassaemia, haemochromatosis), chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn disease, gastric ulcers, coeliac disease, haemorrhagic diseases, *Helicobacter pylori*), renal disease, blood donors, or regular consumption of iron supplements within the 4 months prior to participating in the study. For the nutritional intervention groups, another exclusion criterion was to be allergic to any of the components of the assayed dairy products.

A total of 584 women contacted the research group to receive information and 289 underwent the screening. Women who did not meet the inclusion criteria or declined to participate were excluded ($n = 104$). Finally, a total of 129 iron-deficient women agreed to participate in the nutritional intervention and were randomly distributed into two groups (Fe or Fe+D), and 56 iron-sufficient women were included in the reference group (R). During the study, 16 women abandoned the nutritional intervention and 4 were excluded due to lack of compliance. Therefore, 109 women completed the study and were analysed (Fe, $n = 55$ and Fe+D, $n = 54$). There were no dropouts in the R group.

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, and the Spanish National Research Council Committee, Madrid, Spain. All subjects signed written informed consent forms.

Nutritional intervention design

The study was performed in Madrid, Spain (latitude: 40.24°N), and consisted of a randomised, controlled, double-blind, parallel design trial of 16 weeks duration during the winter season.

Participants were randomly distributed into two groups, using the RAND function of Excel (Microsoft Office 2010). One group consumed, as part of their usual diet, 500 mL/day of the iron-fortified dairy product (Fe group, $n = 54$), whereas the other consumed 500 mL/day of the iron + vitamin D-fortified dairy product (Fe+D group, $n = 55$).

The Fe and Fe+D-fortified dairy products were manufactured from skimmed flavoured milk in 500-mL cartons in vanilla flavour. Both dairy products supplied 15 mg Fe/500 mL carton, in the form of microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin, equivalent to 83, 3 % of the recommended dietary allowance (RDA) per day [20, 21]. The Fe+D-fortified dairy product additionally

provided 200 IU (5 µg) of vitamin D₃/500 mL carton, equivalent to 100 % of the RDA/day [22]. Both products provided (per 100 mL): 37 kcal (156 kJ), 3.1 g of protein, 5.4 g of carbohydrates, 0.3 g of fat, 120 mg of calcium (data provided by the manufacturer, CAPSA, Spain). Analytical concentration of iron (atomic absorption spectrometry, Perkin Elmer 5100 PC) was 3.10 and 2.94 mg per 100 mL, for the Fe and Fe+D products, respectively, and vitamin D₃ (Mass Spectrometer, Agilent LC QQQ 6460) in the Fe+D product was 0.99 µg per 100 mL.

Participants were instructed to consume one 500 mL carton every day, all at once separately from meals (by at least 2 h) and had to shake it before consumption. Volunteers who could not drink the dairy product one day were instructed to consume two cartons the following day.

Dietary control and compliance and anthropometric determinations

All participants, intervention and reference groups, were instructed not to deviate from their regular habits and to maintain their normal diet and exercise level during the 4 months.

Dietary intake was evaluated at baseline and at 8 and 16 weeks to control any possible changes in energy and nutrient intake. Subjects completed a 72-h detailed dietary intake report specifying the types of food consumed and serving weights. Daily food, energy intake, nutrient intake, and energy provided by macronutrients were calculated by a computer application using the Spanish Food Composition Database (DIAL, Alce Ingeniería). The compliance of the nutritional intervention and the follow-up of the reference group were assessed bimonthly by questionnaires and a personal interview when volunteers underwent blood sampling.

At baseline, body weight was measured with a Seca scale (to a precision of 100 g) and height was measured with a stadiometer incorporated into the scale. Body mass index (BMI) was calculated. In addition, volunteers completed a questionnaire every 2 months in order to monitor possible health problems, medication use, and changes in their normal routine.

Blood sampling and biochemical determinations

All volunteers attended the laboratory facilities at baseline and at weeks 8 and 16. Blood samples were collected by venepuncture after a 12-h fasting period. Serum was obtained after centrifugation at 1,000 g for 15 min and the second morning urine was also collected to analyse the bone resorption marker (aminoterminal telopeptide of collagen I, NTx). High-quality results are obtained from 24-h urine as well as second morning urine samples; thus,

this was selected because it was easier to control and to be collected by the volunteer. Both samples were stored at -80°C .

Serum 25OHD concentration (25-hydroxyvitamin D₂ plus 25-hydroxyvitamin D₃) was determined by an ELISA commercial kit, with intra- and inter-assay coefficients of variation of 5.6 and 6.4 %, respectively (25-hydroxyvitamin D EIA, Immunodiagnostic Systems, IDS, United Kingdom). The bone resorption marker, urine aminoterminal telopeptide of collagen I (NTx), was determined in the second morning urine by an ELISA commercial kit with intra- and inter-assay coefficients of variation of 5.0 and 5.5 %, respectively (Osteomark[®] NTx Urine, Wampole Laboratories, USA). NTx is expressed as nanomoles of bone collagen equivalents per litre per millimol of creatinine per litre (nM BCE/mM Cr). Urinary creatinine levels were measured using an autoanalyser method (modular Roche DDPP). Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were <0.7 and <2.3 %, respectively. The bone formation marker procollagen-type 1 N-terminal propeptide (P1NP) and parathyroid hormone (PTH) were determined in serum by electrochemiluminescence (Elecsys, Roche Diagnostics, USA). Intra- and inter-assay coefficients of variation for P1NP were 2.6 and 4.1 %, respectively, and for PTH were 2.7 and 6.5 %, respectively. All determinations of the same parameter of each person were carried out in the same run to avoid inter-assay error.

Haemoglobin was determined in whole blood following standard laboratory techniques using the Symex NE 9100 automated haematology analyser (Symex, Kobe, Japan). Serum iron, serum ferritin, and serum transferrin were determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyser (Roche, Basel, Switzerland). Total iron binding capacity (TIBC) and transferrin saturation were calculated as follows: $\text{TIBC } (\mu\text{mol/L}) = 25.1 \times \text{transferrin } (\text{g/L})$; $\text{transferrin saturation} = \text{serum iron } (\mu\text{mol/L}) / \text{TIBC} \times 100$.

All determinations were subject to the ISO-9001-2000 requirements.

Statistical analysis

Data are presented as means with their standard deviations. A normal distribution of variables was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. Urine NTx and serum ferritin values were log-transformed for statistical testing. Pearson's linear correlation tests between iron and bone variables were performed at baseline. Linear regression was performed for those parameters with significant correlations.

Repeated measures analysis of variance (ANOVA) and post hoc Bonferroni test were used to study time effect within groups. Comparisons were also made at each time

point between the Fe, Fe+D, and R groups using ANOVA. A p value of <0.05 was considered significant. The SPSS statistical package for Windows (version 20.0) was used to analyse the data.

Results

A total of 165 women completed the study. Ages of the volunteers were 24.8 ± 4.1 , 24.7 ± 4.6 , and 26.5 ± 3.8 years, and BMI were 21.9 ± 3.0 , 21.4 ± 3.0 , and 22.4 ± 3.2 kg/m², for the Fe, Fe+D, and R groups, respectively, without significant differences between groups for either parameter.

Tables 1 and 2 present baseline characteristics of the volunteers. No differences were found in energy, macro- or micronutrient intakes between groups at baseline. Moreover, volunteers did not change their dietary intake throughout the assay (data not shown). Serum iron ($p = 0.027$), log-ferritin

($p < 0.001$), serum transferrin ($p < 0.001$), TIBC ($p < 0.001$), and transferrin saturation ($p = 0.002$) showed significant differences between groups without differences between the Fe and the Fe+D groups. Haemoglobin levels were similar in the three groups and reflected normal values.

Significant negative correlations were found between baseline log-ferritin and log-NTx ($R^2 = 0.079$, $p < 0.001$), and between P1NP and transferrin ($R^2 = 0.058$, $p = 0.002$) for all volunteers (Figs. 1, 2).

Table 3 presents changes in bone turnover biomarkers during 16 weeks for the iron-deficient women consuming Fe or Fe+D dairy products and for the R group. Serum 25OHD significantly increased in the Fe+D group during the assay ($p < 0.001$) and at weeks 8 and 16, it was significantly higher compared to the R group ($p < 0.01$). In the Fe group, it presented a decrease at week 8 but at the end of the study, it recovered baseline levels ($p = 0.01$). The R group showed the same evolution, although time differences were not significant. PTH did not show changes throughout the intervention in any of the groups.

There were no time changes in P1NP in the Fe and R groups. However, in Fe+D group, it progressively decreased during the assay ($p = 0.004$), although the differences between groups did not reach significance.

NTx values were higher at baseline and at weeks 8 and 16 in Fe and Fe+D compared to the R group ($p < 0.01$). NTx levels significantly decreased during the intervention in the Fe+D group ($p < 0.001$), and they were significantly lower compared to Fe group at week 8 ($p < 0.05$). The Fe and R groups did not present time changes throughout the study for this parameter.

Discussion

Present results show for the first time a relationship between iron biomarkers and bone turnover markers in a group of young menstruating Spanish women. A negative

Table 1 Baseline energy and macronutrient intakes of iron-deficient women and the reference group

| | Fe | Fe+D | R |
|-------------------------|--------------|--------------|---------------|
| Energy (kcal) | 2,057 ± 515 | 2,095 ± 528 | 2,122 ± 487 |
| Protein (% energy) | 16.9 ± 3.5 | 16.3 ± 3.7 | 15.4 ± 3.1 |
| Carbohydrate (% energy) | 40.3 ± 6.4 | 38.7 ± 6.4 | 40.9 ± 6.7 |
| Lipid (% energy) | 39.4 ± 6.4 | 41.4 ± 5.8 | 40.0 ± 6.7 |
| Calcium (mg) | 910 ± 319 | 945 ± 362 | 909 ± 313 |
| Vitamin D (µg) | 3.2 ± 2.4 | 2.8 ± 3.1 | 4.0 ± 5.0 |
| Vitamin K (µg) | 108.2 ± 54.5 | 119.4 ± 80.6 | 127.7 ± 81.5 |
| Magnesium (mg) | 286.2 ± 92.4 | 264.7 ± 83.5 | 282.38 ± 80.0 |
| Phosphorous (mg) | 1,418 ± 466 | 1,365 ± 469 | 1,351 ± 342 |
| Iron (mg) | 13.5 ± 5.3 | 12.9 ± 5.2 | 13.0 ± 5.0 |

Values are mean ± SD

No differences were found between groups (ANOVA)

Table 2 Baseline iron biomarkers of iron-deficient women and the reference group

| | Fe | Fe+D | R | ANOVA p |
|----------------------------|----------------|-----------------|--------------|--------------|
| Haemoglobin (g/dL) | 13.3 ± 0.8 | 13.4 ± 0.7 | 13.4 ± 0.8 | NS |
| Serum iron (µg/dL) | 82.9 ± 31.9* | 88.1 ± 36.8 | 100.4 ± 34.5 | 0.027 |
| Ferritin (ng/mL) | 26.1 ± 13.7*** | 22.8 ± 11.3*** | 72.1 ± 29.5 | <0.001 |
| Transferrin (mg/dL) | 292.5 ± 50.7** | 301.5 ± 65.4*** | 261.6 ± 41.2 | <0.001 |
| Transferrin saturation (%) | 20.6 ± 8.0* | 22.5 ± 13.4* | 27.7 ± 9.5 | 0.002 |
| TIBC (µmol/L) | 73.4 ± 12.7** | 75.7 ± 16.4*** | 65.7 ± 10.3 | <0.001 |

Values are mean ± SD

p —Differences between groups (ANOVA)

Bonferroni test *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, compared to reference group. Difference between Fe and Fe+D was not significant

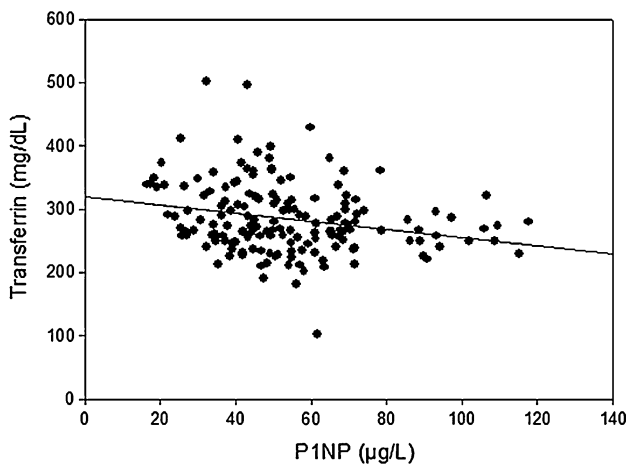


Fig. 1 Correlation between P1NP and serum transferrin in young women. ($R^2 = 0.058$, $p = 0.002$)

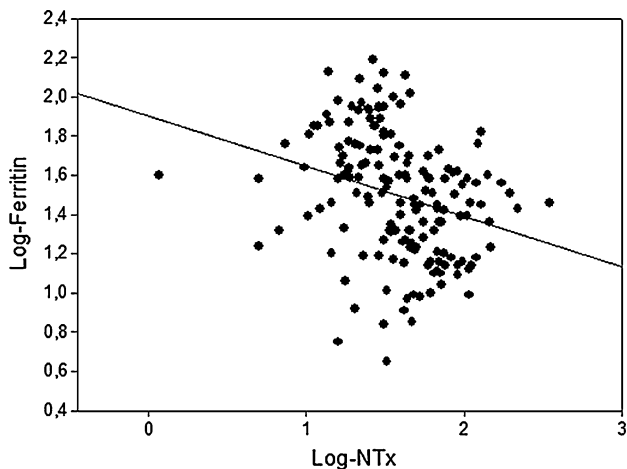


Fig. 2 Correlation between log-ferritin and log-NTx in young women ($R^2 = 0.079$, $p < 0.001$)

correlation between ferritin, the best biomarker of iron stores, and NTx, which reflects bone resorption, was observed in these women. The observed statistical power of the regression test, obtained with the 165 subjects, was 95.9 %. This is consistent with the higher bone resorption observed in the two groups of women with iron deficiency compared to the iron-sufficient group.

Studies in young women are scarce. NTx values of around 25 nmol BCE/nmol have been reported for healthy young women with age and BMI similar to the present assay [23], which is consistent with the NTx results of the R group. However, the high NTx levels of the Fe and Fe+D groups are in agreement with previous observations in iron-deficient women [8].

A negative association between transferrin, which is the main iron transporter protein to tissues, and P1NP, a bone formation marker, was found in this study. The observed

Table 3 Bone biomarkers changes of iron-deficient women consuming Fe or Fe+D dairy products and reference group

| | Baseline | Week 8 | Week 16 | Time effect (<i>p</i>) |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 25OHD (nmol/L) | | | | |
| Fe | 62.9 ± 20.8 ^a | 59.4 ± 19.6 ^b | 63.2 ± 18.3 ^a | 0.01 |
| Fe+D | 62.3 ± 20.8 ^a | 67.1 ± 19.8 ^{b*} | 71.2 ± 21.1 ^{c*} | <0.001 |
| R | 57.1 ± 17.8 | 53.8 ± 14.9 | 54.9 ± 16.0 | NS |
| PTH (pg/mL) | | | | |
| Fe | 41.2 ± 18.4 | 43.9 ± 22.1 | 41.6 ± 20.8 | NS |
| Fe+D | 39.7 ± 14.6 | 39.9 ± 14.9 | 40.9 ± 17.0 | NS |
| R | 37.5 ± 14.4 | 39.4 ± 14.7 | 40.7 ± 12.5 | NS |
| P1NP (µg/L) | | | | |
| Fe | 56.1 ± 22.0 | 53.2 ± 20.2 | 53.4 ± 19.8 | NS |
| Fe+D | 53.3 ± 21.5 ^a | 50.3 ± 21.1 ^{ab} | 48.4 ± 22.4 ^b | 0.004 |
| R | 50.8 ± 19.9 | 50.2 ± 20.5 | 49.0 ± 20.4 | NS |
| NTx (nmol BCE/nmol Cr) | | | | |
| Fe | 67.5 ± 55.8* | 78.9 ± 85.5* | 61.3 ± 49.4* | NS |
| Fe+D | 64.0 ± 40.7 ^{a*} | 45.7 ± 25.0 ^{b†*} | 47.4 ± 36.5 ^{b*} | <0.001 |
| R | 24.0 ± 10.8 | 23.3 ± 11.5 | 24.8 ± 9.1 | NS |

Values are mean ± SD

Values within a row with unlike superscript letters were significantly different $p < 0.05$, repeated measures ANOVA followed by Bonferroni test

* $p < 0.01$ compared to reference group

† $p < 0.05$ compared to Fe group

statistical power of the regression test in this case was 88.2 %. However, differences between groups were not significant during the intervention. To the best of our knowledge, there is limited information regarding bone remodelling in iron-deficient women. In a group of osteoporotic postmenopausal women, D’Amelio et al. [24] found an inverse correlation between transferrin and lumbar and femoral bone mineral density. Some other studies in rats show that severe anaemia decreases bone formation, evaluated by P1NP [10] and osteocalcin [11], and increases bone resorption, measured by urinary C-terminal telopeptides of type I collagen (CTx) [10, 11] which is in agreement with our baseline results. However, the relationship between iron and bone markers is still controversial, and other reports show no effect on osteocalcin [25] while urinary deoxypyridinoline (DPD), marker of bone resorption, shows no change [25] or even a decrease [11, 12]. Results in the present study support previous findings that iron deficiency involves alterations in bone metabolism.

The higher bone resorption in the iron-deficient groups compared to the R group cannot be attributed to PTH

action as PTH levels were within the normal range without significant differences between groups. Moreover, all volunteers were healthy and their calcium intake was adequate. This is also supported by the stability of PTH levels throughout the assay.

Concerning vitamin D status, the Institute of Medicine has recently concluded that, based on bone health, serum 25OHD levels of 50 nmol/L cover the requirements of at least 97.5 % of the population [26]. However, there is controversy regarding the concentration of serum 25OHD required to reach an optimal vitamin D status to cover non-classical functions of vitamin D, which include cancer, cardiovascular disease, diabetes, and autoimmune disorders [27]. Hollick 2008 [1] defined deficient vitamin D status as a circulating 25OHD concentration below 50 nmol/L (20 ng/mL), insufficient status between 51 and 74 nmol/L (21–29 ng/mL), and sufficient status over 75 nmol/L (30 ng/mL). According to these criteria, we found that 41 % of all of our volunteers were vitamin D deficient, 36 % were insufficient, and only 24 % were in a sufficient status. Therefore, 77 % of our volunteers presented vitamin D deficiency or insufficiency. This prevalence is higher than described previously for Spanish adolescent women (63 %) [28] and Spanish young adults (61 %) [29], but lower than observed in a group of iron-deficient Spanish menstruating women, also recruited during the winter season, who presented a prevalence of 92 % of vitamin D deficiency or insufficiency [8]. The main cause of vitamin D deficiency is low exposure to sunlight. However, there are several other factors that can affect vitamin D status such as ageing, obesity, medications (antiseizure, glucocorticoids, or fat malabsorption medications), and the fact that few foods naturally contain this vitamin [1]. The group of volunteers selected for the study were healthy young women, with BMI within normal limits. Therefore, this high prevalence of vitamin D deficiency or insufficiency could be attributed to the fact that the dietary vitamin D intake of the volunteers did not reach the RDA for this population group, which at present is 200 IU (5 µg/day) [26, 30], and to the fact that the analysis of the volunteers was performed in the winter season. A high prevalence of inadequate dietary vitamin D intake was also observed in general adult population in Europe when the estimated average requirement (EAR) cut-off point was applied [31].

Regarding other nutrients that are related to bone health, the three groups of women presented similar baseline intakes of energy, macro-, and micronutrients. Iron intake was below the RDA for this population group (18 mg/day) [21, 22]. Vitamin K intake, necessary for bone health, was sufficient, according to the adequate intake (90 µg/day) [21]. Average magnesium intake is above the EAR value, phosphorus was higher than recommended, and in contrast calcium intake almost achieved 100 % of the RDA

(1,000 mg/day) [22]. Consequently, Ca/P ratio was only 0.68, much lower than the recommended ratio of 1.3 [32] for optimal bone health. In many countries, low Ca/P ratios have been reported and it is known that excessive intake of phosphorous together with low dietary calcium may lead to an unfavourable imbalance in bone metabolism by inducing PTH secretion, which increases urinary phosphorous excretion but simultaneously increases bone resorption and reduces bone formation [33].

The intervention with the fortified skimmed milk drinks implied an extra intake of calcium and iron in both groups, and of vitamin D in the Fe+D group. Consumption of the vitamin D-fortified product during 4 months decreased both P1NP and NTx, in agreement with the described effects of this vitamin in the reduction in bone turnover [34]. The additional amount of vitamin D consumed in the Fe+D group was 5 µg/day (200 IU) that, together with the intake from the usual diet (Table 1), made a total of approximately 8 µg (300 IU) consumed daily. The present study shows that this consumption during 16 weeks was capable of increasing 25OHD mean levels to near the optimal value of 75 nmol/L [1]. However, at the end of the assay, NTx values of the Fe+D group did not reach the levels of the reference group. This could be due to the iron deficiency, as the iron-fortified dairy products were not effective in improving iron status, determined by the principal variable that reflects iron stores, serum ferritin [7]. The iron salt used to fortify the skimmed milks of the present study was microencapsulated iron pyrophosphate, and our research group previously demonstrated that this form of iron added to fruit juices clearly improved iron status in iron-deficient menstruating women and the beneficial effects were detected from the first month of intervention [35]. However, this form of iron in the flavoured skimmed milk is not absorbed due to the presence of casein and calcium, inhibitors of iron absorption, and absence of enhancers. Therefore, since this iron-fortified food did not increase iron status, the effect of iron on bone biomarkers could not be observed. Further studies are needed to clarify the role of iron supplementation on bone metabolism in different situations such as iron deficiency anaemia and osteoporosis, and in the case of fortified food using a food matrix that does not impair iron absorption.

To sum up, it was observed that iron deficiency is related with altered bone remodelling with markedly increased bone resorption in young women. Consumption of the iron and vitamin D-fortified skimmed milk reduced bone turnover and was successful in increasing circulating 25OHD to nearly reach an optimal vitamin D status.

Acknowledgments This study was financed by Project AGL2009-11437. LT and RBR were supported by a JAE-predoc grant from CSIC and European Social Fund. The authors are grateful to the volunteers who participated in the study. CAPSA (Spain) is acknowledged for providing the dairy products.

Conflict of interest None.

References

- Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87:1080S–1086S
- Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: Consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22:477–501
- Laird E, Ward M, McSorley E, Strain JJ, Wallace J (2010) Vitamin D and bone health: potential mechanisms. *Nutrients* 2:693–724. doi:10.3390/nu2070693
- Holick MF (2010) Vitamin D: extraskelletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:381–400. doi:10.1016/j.ecl.2010.02.016
- McGillivray G, Skull SA, Davie G, Kofoed SE, Frydenberg A, Rice J, Cooke R, Carapetis JR (2007) High prevalence of asymptomatic vitamin D and iron deficiency in East African immigrant children and adolescents living in a temperate climate. *Arch Dis Child* 92:1088–1093
- Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, Rasgon SA (2010) Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 89:447–452. doi:10.1007/s00277-009-0850-3
- Toxqui L, Pérez-Granados AM, Blanco-Rojo R, Wright I, González-Vizcayno C, Vaquero MP (2013) Intake of an iron or iron an vitamin D-fortified skimmed milk and iron metabolism in women. *Ann Nutr Metab* (in press)
- Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Zazo P, de la Piedra C, Vaquero MP (2013) Relationship between vitamin D deficiency, bone remodelling and iron status in iron-deficient young women consuming an iron-fortified food. *Eur J Nutr* 52:695–703. doi:10.1007/s00394-012-0375-8
- Tuderman L, Myllyla R, Kivirikko KI (1977) Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. I. Role of co-substrates. *Eur J Biochem* 80:341–348
- Diaz-Castro J, Lopez-Frias MR, Campos MS, Lopez-Frias M, Alferez MJ, Nestares T, Ojeda ML, Lopez-Aliaga I (2012) Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats. *Eur J Nutr* 51:241–247. doi:10.1007/s00394-011-0212-5
- Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2006) Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:2547–2550
- Katsumata S, Katsumata-Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2009) Severe iron deficiency decreases both bone formation and bone resorption in rats. *J Nutr* 139:238–243
- Harris MM, Houtkooper LB, Stanford VA, Parkhill C, Weber JL, Flint-Wagner H, Weiss L, Going SB, Lohman TG (2003) Dietary iron is associated with bone mineral density in healthy postmenopausal women. *J Nutr* 133:3598–3602
- Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266–281
- Gonzalez-Molero I, Morcillo S, Valdes S, Perez-Valero V, Botas P, Delgado E, Hernandez D, Oliveira G, Rojo G, Gutierrez-Repiso C, Rubio-Martin E, Menendez E, Soriguer F (2011) Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr* 65:321–328
- Vaquero MP, Sanchez-Muniz FJ, Carbajal A, Garcia-Linares MC, Garcia-Fernandez MC, Garcia-Arias MT (2004) Mineral and vitamin status in elderly persons from Northwest Spain consuming an Atlantic variant of the Mediterranean diet. *Ann Nutr Metab* 48:125–133
- Mata-Granados JM, Luque de Castro MD, Quesada Gomez JM (2008) Inappropriate serum levels of retinol, alpha-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D3 and 24,25 dihydroxyvitamin D3 levels in healthy Spanish adults: simultaneous assessment by HPLC. *Clin Biochem* 41:676–680. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.02.003
- McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B (2009) Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutr* 12:444–454. doi:10.1017/S1368980008002401
- Lips P (2010) Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:297–300. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.02.021
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2009) Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española. In: Tablas de composición de alimentos. Pirámide, Grupo Anaya, SA, Madrid, pp 227–230
- Institute of Medicine (2001) Iron. In: Institute of Medicine and Food and Nutrition Board (ed) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. National Academic Press, Washington, DC, pp 290–393
- Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB (2011) Dietary Reference Intakes for Calcium Vitamin D. The National Academic Press, Washington, D.C
- Ferrar L, van der Hee RM, Berry M, Watson C, Miret S, Wilkinson J, Bradburn M, Eastell R (2011) Effects of calcium-fortified ice cream on markers of bone health. *Osteoporos Int* 22:2721–2731. doi:10.1007/s00198-010-1513-x
- D'Amelio P, Cristofaro MA, Tamone C, Morra E, Di Bella S, Isaia G, Grimaldi A, Gennero L, Gariboldi A, Ponzetto A, Pescarmona GP, Isaia GC (2008) Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone* 43:1010–1015. doi:10.1016/j.bone.2008.08.107
- Medeiros DM, Stoecker B, Plattner A, Jennings D, Haub M (2004) Iron deficiency negatively affects vertebrae and femurs of rats independently of energy intake and body weight. *J Nutr* 134:3061–3067
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses SA (2011) The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 96:53–58. doi:10.1210/jc.2010-2704
- van Schoor NM, Lips P (2011) Worldwide vitamin D status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25:671–680. doi:10.1016/j.beem.2011.06.007S1521-690X(11)00071-6
- Rodríguez Sangrador M, Beltrán de Miguel B, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuny O (2010) Influence of sun exposure and diet to the nutritional status of vitamin D in adolescent Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project). *Nutr Hosp* 25:755–762
- Groba MV, Miravalle A, Gonzalez-Rodriguez E, García-Santana S, Gonzalez-Padilla E, Saavedra P, Soria A, Sosa M (2010) Factors related to vitamin D deficiency in medical students in Gran Canaria. *Revista de osteoporosis y metabolismo mineral* 2:11–18
- Federación Española de Sociedades de Nutrición Alimentación y Dietética (FESNAD) (2010) Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española. EUNSA, Navarra
- Vinas BR, Barba LR, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, Cavelaars A, de Groot LC, van't Veer P, Matthys C, de Majem LS (2011) Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Ann Nutr Metab* 59:84–95. doi:10.1159/000332762

32. Vaquero MP, Navarro MP (2013) *Minerales. Libro blanco de la nutrición en España*. Fundación Española de Nutrición, Madrid, pp 157–163
33. Kemi VE, Kärkkäinen MU, Lamberg-Allardt CJ (2006) High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *Br J Nutr* 96:545–552
34. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM (2013) Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr* 52:429–441. doi:[10.1007/s00394-012-0430-5](https://doi.org/10.1007/s00394-012-0430-5)
35. Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP (2011) Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr* 105:1652–1659. doi:[10.1017/S0007114510005490](https://doi.org/10.1017/S0007114510005490)

Efectos del consumo de una bebida láctea desnatada fortificada con hierro o hierro y vitamina d en el metabolismo del hierro: estudio aleatorizado, controlado, doble ciego en mujeres con deficiencia de hierro

Journal of the American College of Nutrition (2013), 32:1-9

Objetivos: La anemia por deficiencia de hierro y la deficiencia de vitamina D son consideradas pandemias. El objetivo de este estudio fue determinar si el consumo de un producto lácteo fortificado hierro y vitamina D en comparación con otro fortificado sólo con hierro, ejerce un efecto adicional en el metabolismo del hierro en mujeres menstruantes con deficiencia de hierro. **Métodos:** Se llevó a cabo un estudio aleatorizado, controlado por placebo, doble ciego de grupos paralelos de 16 semanas de duración. Los sujetos fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos que consumieron, como parte de su dieta habitual, 500 mL al día de una bebida láctea desnatada fortificada con hierro (n =54) o con hierro y vitamina D (n=55). Al inicio y mensualmente se determinó la ingesta dietética, el peso corporal y parámetros hematológicos y marcadores del estado del hierro. Se analizaron las concentraciones séricas de 25-hidroxivitamina D en el punto basal y en las semanas 8 y 16. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para observar los efectos del tiempo y la interacción del tiempo × tratamiento. **Resultados:** Un total de 109 voluntarias completaron el estudio. La ingesta dietética de calcio y de hierro se incrementó durante la intervención ($p < 0.001$, para ambos grupos). Las concentraciones de 25-hidroxivitamina D aumentaron significativamente en el grupo Fe+D durante la intervención ($p < 0.001$) y en la semana 16, fueron significativamente mayores en comparación con las del grupo Fe ($p < 0.05$). La ferritina sérica, transferrina, volumen corpuscular medio, hemoglobina y el ancho de distribución de hematíes mostraron un efecto del tiempo, pero no una interacción del tiempo × tratamiento. En la semana 8, se observaron valores más altos de eritrocitos ($p = 0.001$), hematocrito ($p = 0.005$) y hemoglobina ($p = 0.003$) en el grupo Fe+D en comparación con el grupo Fe. **Conclusión:** La bebida láctea desnatada fortificada con hierro y vitamina D no mejora el estado del hierro de las mujeres menstruantes con deficiencia de hierro. Sin embargo, la fortificación con vitamina D incrementa ligeramente la eritropoyesis y el estado de hierro.

Palabras clave: Vitamina D; pirofosfato férrico; fortificación; bebida láctea desnatada; deficiencia de hierro; mujeres.

Original Research

Effects of an Iron or Iron and Vitamin D–Fortified Flavored Skim Milk on Iron Metabolism: A Randomized Controlled Double-Blind Trial in Iron-Deficient Women

Laura Toxqui, MSc, Ana M. Pérez-Granados, PhD, Ruth Blanco-Rojo, PhD, Ione Wright, MSc, Carmen González-Vizcayno, MSc, M. Pilar Vaquero, PhD

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC) (L.T., A.M.P.-G., R.B.-R., I.W., M.P.V.), Clinical Analysis Laboratory, Madrid Salud (C.G.-V.), Madrid, SPAIN

Key words: vitamin D, ferric pyrophosphate, fortification, skim milk, iron deficiency, women

Objectives: Iron deficiency anemia and vitamin D deficiency are considered global pandemics. The aim of this study was to determine whether the consumption of a dairy product fortified with iron and vitamin D, compared to the equivalent with only added iron, exerts an additional effect on iron metabolism in iron-deficient menstruating women.

Methods: The design was a randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel-group trial of 16 weeks' duration. Subjects were randomized into 2 groups that consumed, as part of their usual diet, 500 mL/day of an iron ($n = 54$) or iron- and vitamin D–fortified ($n = 55$) flavored skim milk. At baseline and monthly, dietary intake, body weight, and hematological and iron metabolism biomarkers were determined. Serum 25-hydroxyvitamin D was analyzed at baseline and weeks 8 and 16. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) of repeated measures for time and Time \times Group interaction effects.

Results: A total of 109 volunteers completed the study. Calcium and iron intakes increased during the intervention ($p < 0.001$ for both groups). Serum 25-hydroxyvitamin D significantly increased in Fe + D group during the assay ($p < 0.001$) and at week 16 it was higher compared to the Fe group ($p < 0.05$). Serum ferritin, serum transferrin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, and red blood cell distribution width showed significant time effects but no Time \times Group interaction. Higher values of erythrocytes ($p = 0.01$), hematocrit ($p = 0.05$), and hemoglobin ($p = 0.03$) at week 8 were observed in the Fe + D group compared to the Fe group.

Conclusion: Iron-fortified flavored skim milk does not improve iron status in iron-deficient menstruating women. However, vitamin D fortification slightly enhances erythropoiesis and iron status.

INTRODUCTION

Iron deficiency anemia has been identified as one of the most common and widespread disorders in the world and it is considered a public health problem in both industrialized and nonindustrialized countries [1]. An estimated 2 billion people are affected by nutritional iron deficiency, including as high-risk groups children and women of childbearing age. A low iron status can reduce physical activity and increase susceptibility to

infections. Moreover, iron deficiency, even in absence of anemia, can cause fatigue and reduce work performance [2]. It has been observed in a group of young women that a good iron status enhances various components of well-being [3].

Dietary strategies for correcting iron deficiency include dietary modification, iron supplementation, and food fortification [2]. Regarding dietary modification, our research group has observed that the recommended dietary allowance (RDA) of 18 mg/day of iron [4] for women was not easily reached even

Address correspondence to: M. Pilar Vaquero, PhD, C/José Antonio Novais 10, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), 28040, Madrid, SPAIN. E-mail: mpvaquero@ictan.csic.es

ClinicalTrials.gov: NCT01739907.

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations: Hb = hemoglobin, MCH = mean corpuscular hemoglobin, MCV = mean corpuscular volume, RDW = red blood cell distribution width, sTfR = serum transferrin receptor, TIBC = total iron binding capacity.

when the volunteers consumed 5 portions of red meat and 2 portions of poultry/week [5]. For oral iron supplementation, treatment with ferrous iron salts is widely used because of their low cost and high bioavailability. Nevertheless, poor compliance due to gastrointestinal discomfort is a major limitation [2,6]. Consequently, iron fortification is probably the most practical and cost-effective prevention program. However, it still remains a challenge because iron compounds that have greater bioavailability also cause higher organoleptic changes in food [7].

The use of microencapsulation of iron salts, such as ferric pyrophosphate, a substance authorized to be added in food [8], emerges as an alternative with the following advantages: reducing interference with other components of the diet that could inhibit iron absorption, such as polyphenols and phytates [9]; masking the metallic flavor of iron salts; decreasing gastric discomfort; and diminishing the catalytic oxidation of food proteins and lipids by iron [2].

A very important issue to take into account in food fortification is that the bioavailability of iron varies markedly depending on the food matrix [10]. Therefore, the matrix should contain components that enhance iron absorption and absence of inhibitors [9,10]. In this regard, Blanco-Rojo et al. [11] verified the efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin in a fruit juice rich in ascorbic acid and concluded that this iron compound within this food matrix had a high bioavailability and improved iron status in iron-deficient young women; thus, it could be used to prevent iron deficiency anemia.

Another important nutritional deficiency also recognized as a pandemic is vitamin D deficiency [12]. It has been reported that vitamin D insufficiency (considered as a mean serum 25-hydroxyvitamin D level below 50 nmol/L) exists in around 50% of the world population [13]. The major causes of vitamin D deficiency are low sun exposure and the fact that few foods naturally contain vitamin D. In addition, fortified foods are often inadequate to satisfy either a child's or an adult's vitamin D requirement [12,14].

Sim et al. [15] suggested an association between vitamin D deficiency and greater risk of anemia, lower mean hemoglobin, and higher usage of erythrocyte-stimulating agents, suggesting that vitamin D has an effect on erythropoiesis [15]. Another report proposed a relationship between iron deficiency and low 25-hydroxyvitamin D levels [16], and our research group [17] found that 92% of the individuals of a group of iron-deficient women were vitamin D deficient or insufficient. In addition, we recently reported an inverse association between iron status and bone resorption in young menstruating women [18].

Because dairy products are often fortified with vitamin D and micronized microencapsulated ferric pyrophosphate can be added to this type of food, the aims of this study were to (1) know the influence of the consumption, as part of the usual diet, of an iron-fortified flavored skim milk on iron metabolism in iron-deficient menstruating women, and (2) investigate whether the supplementation of vitamin D to the same iron-fortified

dairy product exerts an additional effect on iron metabolism on these women.

MATERIALS AND METHODS

The present study was carried out following the statement guidelines of the Consolidated Standards of Reporting Trials [19].

Subjects

Volunteers were recruited by different announcements in press, university campus, and web pages of Madrid. The study was also verbally promoted at public events.

The principal variable for the calculation of the sample size was ferritin, with a mean value for the deficient population of 26 ± 16 ng/mL. It was calculated that a minimum of 54 subjects with low Fe stores would be required in each group to demonstrate a difference of 10 units in serum ferritin between two treatments with 90% statistical power and confidence level at 95%. This was calculated considering the condition that leads to the highest sample size, objective 2, comparison between groups, and covers both objectives.

Women aged 18–35 years, who were nonsmokers, not pregnant, not breast-feeding, with low iron stores (serum ferritin < 30 ng/mL) and hemoglobin ≥ 11 g/dL, were included in this study. The cutoff variable for serum ferritin was selected because a normal or elevated ferritin value does not exclude the presence of iron deficiency, and cutoff ranges between 25 and 50 ng/mL are usually considered in studies dealing with predisposition to anemia [20,21]. Subjects were excluded from the study if they had amenorrhea, were menopausal, or had any known health problems likely to influence iron status including iron metabolism-related diseases (iron deficiency anemia, thalassemia, hemochromatosis), chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn's disease, gastric ulcers, celiac disease, hemorrhagic diseases, *Helicobacter pylori*), renal disease, or allergy to some of the components of the assay dairy product. Other exclusion criteria included those who were blood donors or had regularly consumed iron supplements within the 4 months prior to participating in the intervention.

A group of 584 women contacted the research group to receive information and 289 underwent the screening. Women who did not meet the inclusion criteria or declined to participate were excluded ($n = 160$). Finally, a total of 129 women agreed to participate in the nutritional intervention and were randomly distributed into 2 groups (Fe or Fe + D). During the study, 16 women abandoned the intervention and 4 were excluded due to lack of compliance. Therefore, 109 women completed the study and were analyzed (Fig. 1).

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures

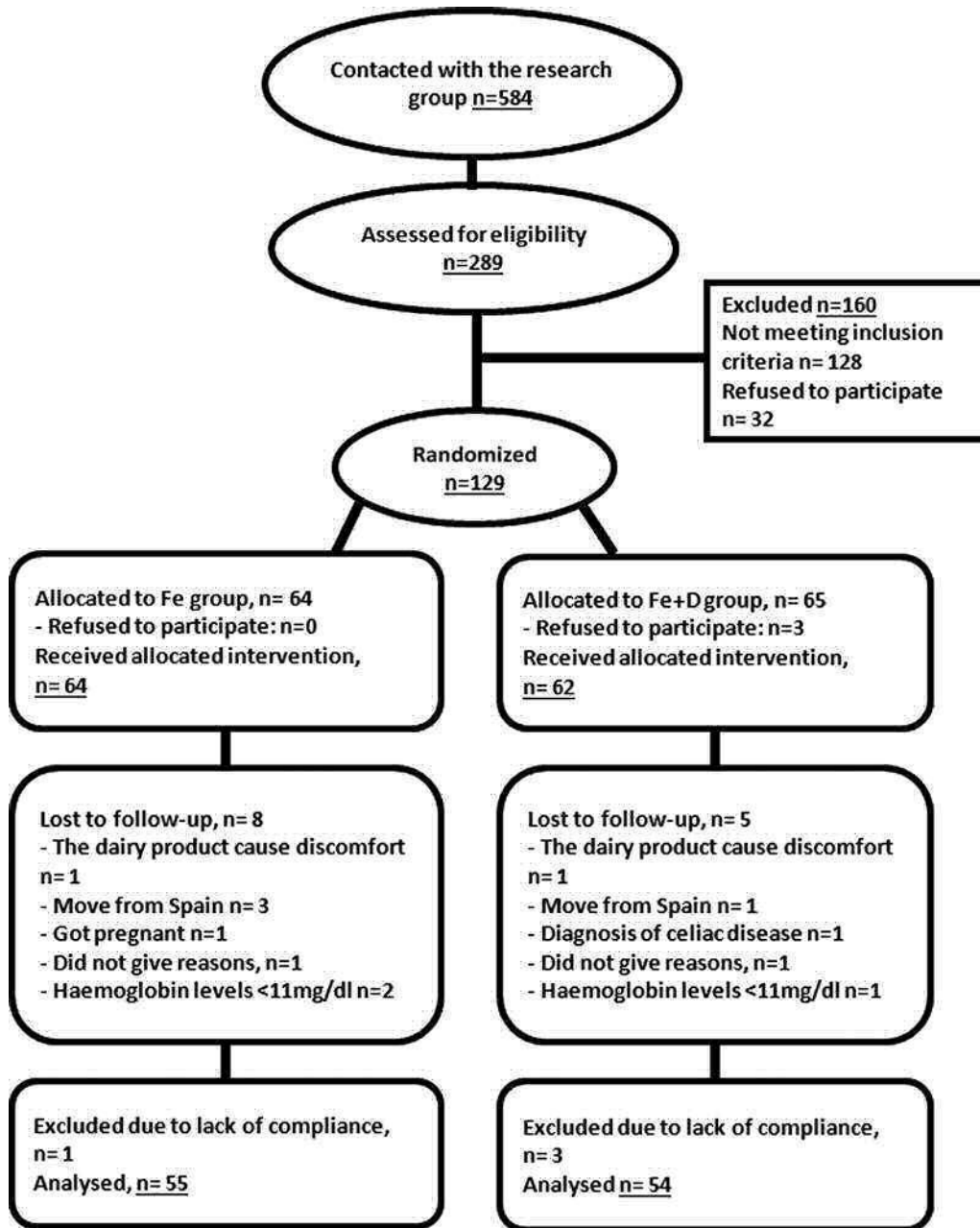


Fig. 1. Diagram of the Consolidated Standards of Reporting Trials.

Involving human subjects/patients were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Madrid. Written informed consent was obtained from all subjects. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01739907.

Study Design

The study consisted of a randomized, controlled, double-blind, parallel design trial of 16 weeks' duration.

The participants in the nutritional intervention were randomly distributed into 2 groups using the RAND function in Excel. One group consumed, as part of their usual diet, 500 mL/day of the iron-fortified dairy product (Fe group, $n = 54$) and the other consumed 500 mL/day of the iron + vitamin D–fortified dairy product (Fe + D group, $n = 55$). Participating women were instructed not to deviate from their regular habits and to maintain their normal diet and exercise level during the 4 months.

The Fe and Fe + D fortified dairy products were manufactured from flavored skim milk in 500-mL cartons in vanilla flavor. Both dairy products supplied 15 mg Fe/500 mL carton in

the form of microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin, equivalent to 83.3% of the RDA/day [4,22]. The Fe + D-fortified dairy product provided 5 μg of vitamin D/500 mL carton, equivalent to 100% of the RDA/day. Both products provided (per 100 mL) 37 kcal (156 kJ), 3.1 g of protein, 5.4 g of carbohydrates, 0.3 g of fat, 120 mg of calcium (data provided by the manufacturer, CAPSA, Granda-Siero, Spain). Analytical concentrations of iron (by atomic absorption spectrometry, Perkin-Elmer 5100PC, Waltham, MA, USA) were 3.1 and 2.94 mg/100 mL for the Fe and Fe + D products, respectively, and vitamin D₃ (by mass spectrometry, Agilent LC QQQ 6460, Englewood, CA, USA) was 0.99 μg /100 mL.

Participants were instructed to consume one 500-mL carton every day, all at once separately from meals (by at least 2 hours) and shaken before consumption. Volunteers who could not drink the dairy product one day were instructed to take 2 dairy products the following day.

Dietary Control and Compliance

Each subject's dietary intake was evaluated at baseline and at 8 and 16 weeks to control any possible changes in energy and nutrient intake. All subjects completed a 72-hour detailed dietary intake report specifying the types of food consumed and serving portions. Daily food, energy intake, nutrient intake, and energy provided by macronutrients were calculated by a computer application using the Spanish Food Composition Database (DIAL, Alce Ingeniería, Madrid, Spain). The compliance of the study was assessed monthly by questionnaires and a personal interview when volunteers underwent blood sampling.

Anthropometric Determinations

Once a month, body weight was measured with a Seca scale (to a precision of 100 g, model 877, Hamburg, Germany) and height was measured at baseline with a stadiometer incorporated into the scale. Body mass index (BMI) was calculated.

In addition, every 4 weeks women completed a questionnaire about health problems, medication use, and changes in their normal routine.

Blood Sampling and Biochemical Assays

Volunteers attended the laboratory facilities at baseline and at 4, 8, 12, and 16 weeks. Blood samples were collected by venipuncture after a 12-hour fasting period. Serum and plasma were obtained after centrifugation at 1000 g for 15 minutes and stored at -80°C .

Total red blood cells, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), red blood cell distribution width (RDW), and hemoglobin were determined in whole blood following standard laboratory techniques using the Symex NE 9100 automated hematology analyzer (Symex, Kobe, Japan). Serum iron, serum ferritin, and serum transferrin were determined by the Modular

Analytics Serum Work Area analyzer (Roche, Basel, Switzerland). Mean corpuscular hemoglobin (MCH), total iron binding capacity (TIBC), and transferrin saturation were calculated as follows: MCH (pg) = Hemoglobin (g/dL) \times 10/Total erythrocytes ($\times 10^{-12}/\text{L}$); TIBC ($\mu\text{mol}/\text{L}$) = 25.1 \times Transferrin (g/L); Transferrin saturation = Serum iron ($\mu\text{mol}/\text{L}$)/TIBC \times 100. Serum transferrin receptor (sTfR) concentration was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay technique (Human sTfR, Biovendor, Heidelberg, Germany). Serum 25-hydroxyvitamin D concentration was determined by a commercial kit (25-hydroxyvitamin D EIA, Immunodiagnostic Systems, Boldon Colliery, UK). All determinations were subjected to the quality management systems requirements (ISO 9001: 2008).

Statistical Analysis

Data are presented as means with their standard deviations. A normal distribution of variables was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. Serum ferritin values were log transformed for statistical testing. Repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used to study time and Time \times Group interaction effects. The post hoc Bonferroni test was used to compare values of the different time points. When a significant Time \times Group interaction was found, data were separated into the 2 groups Fe and Fe + D and were analyzed by ANOVA for comparisons between the groups at each time point and by repeated measures ANOVA for time effects within groups followed by the Bonferroni test. A *p* value of ≤ 0.05 was considered significant. SPSS for Windows (version 20.0, IBM, Armonk, NY, USA) was used to analyze the data.

RESULTS

A total of 109 volunteers completed the study. Ages of the volunteers were 24.8 ± 4.1 and 24.7 ± 4.6 years for the Fe and Fe + D groups, respectively. No significant differences between groups were found in BMI, dietary intake, and biochemical parameters at baseline (Tables 1 and 2). BMI and energy and nutrient intakes at baseline and weeks 8 and 16 are shown in Table 1. Both groups showed similar evolution without a significant Time \times Group interaction except for vitamin D intake. Vitamin D intake increased in the Fe + D group compared to baseline ($p < 0.001$) and the Fe group ($p < 0.001$). Serum 25-hydroxyvitamin D significantly increased in the Fe + D group during the assay ($p < 0.001$) and at the end of the assay it was higher compared to the Fe group (71.1 ± 21.1 nmol/L and 63.2 ± 18.3 nmol/L, $p < 0.05$). BMI showed an increase from baseline to week 8 ($p < 0.001$) and remained stable and within normal limits until the end of the intervention in both groups. Although energy intake did not show changes, an increase in energy percentage from protein ($p < 0.001$) and a decrease in energy percentage from lipids ($p < 0.01$) were observed

Table 1. BMI and Nutrient Intake Changes in Iron-Deficient Women Consuming Fe or Fe + D Dairy Products^a

| Groups | Baseline | Week 8 | Week 16 | Time <i>p</i> | Time × Group <i>p</i> |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|-----------------------|
| Body mass index (kg/m ²) | | | | | |
| Fe | 21.9 ± 3.0 | 22.1 ± 3.2 | 22.2 ± 3.3 | <0.001 | NS |
| Fe + D | 21.4 ± 3.0 | 21.6 ± 2.9 | 21.7 ± 2.9 | | |
| Energy (kcal) | | | | | |
| Fe | 2057 ± 515 | 2072 ± 472 | 2034 ± 441 | NS | NS |
| Fe + D | 2095 ± 528 | 2090 ± 569 | 1922 ± 417 | | |
| Protein (% energy) | | | | | |
| Fe | 16.9 ± 3.5 | 19.0 ± 2.8 | 18.6 ± 3.5 | <0.001 | NS |
| Fe + D | 16.3 ± 3.7 | 18.3 ± 3.1 | 18.6 ± 3.0 | | |
| Carbohydrate (% energy) | | | | | |
| Fe | 40.3 ± 6.4 | 40.9 ± 6.5 | 39.9 ± 5.7 | NS | NS |
| Fe + D | 38.7 ± 6.4 | 40.8 ± 5.5 | 39.6 ± 6.5 | | |
| Lipid (% energy) | | | | | |
| Fe | 39.4 ± 6.4 | 36.9 ± 6.1 | 38.0 ± 6.1 | <0.001 | NS |
| Fe + D | 41.4 ± 5.8 | 37.4 ± 6.0 | 37.7 ± 6.7 | | |
| Calcium (mg) | | | | | |
| Fe | 910 ± 319 | 1376 ± 241 | 1395 ± 233 | <0.001 | NS |
| Fe + D | 945 ± 362 | 1392 ± 298 | 1355 ± 227 | | |
| Iron (mg) | | | | | |
| Fe | 13.5 ± 5.3 | 27.6 ± 4.7 | 27.5 ± 4.3 | <0.001 | NS |
| Fe + D | 12.9 ± 5.2 | 26.7 ± 4.5 | 26.1 ± 3.5 | | |
| Vitamin D (μg) | | | | | |
| Fe | 3.2 ± 2.4 | 2.8 ± 2.5 | 3.5 ± 2.5 | <0.001 | <0.001 |
| Fe + D | 2.8 ± 3.1 ^a | 7.3 ± 3.2 ^{b*} | 7.6 ± 2.0 ^{b*} | | |

BMI = body mass index, NS = nonsignificant, ANOVA = analysis of variance.

^aValues are mean ± SD. When a significant Time × Group interaction is observed, values within a row not sharing a common letter were significantly different (repeated measures ANOVA followed by Bonferroni test).

^{b*}*p* < 0.001 indicates differences from the Fe group at each time point (ANOVA).

from week 8 to the end of the intervention without significant changes in the energy percentage from carbohydrates (Table 1). Calcium and iron intakes increased during the intervention (both *p* < 0.001 at weeks 8 and 12 compared to baseline) due to the consumption of the iron-fortified milk products.

Total erythrocytes, hematocrit, and hemoglobin presented a time effect and a Time × Group interaction (Table 2). Total erythrocytes and hematocrit tended to decrease but at the end of the intervention the values recovered baseline levels. The Fe + D group showed higher values of erythrocytes (*p* = 0.01) and hematocrit (*p* = 0.05) at week 8 compared to the Fe group. Hemoglobin significantly decreased during the first 8 weeks and remained unchanged within normal ranges until week 16 in the Fe group. In Fe + D significant differences throughout the assay were also observed, but at the end of the assay values did not differ compared to baseline, and at week 8 they were higher compared to the Fe group (*p* = 0.03). MCV, RDW, MCH, serum ferritin, serum transferrin, and TIBC showed a significant time effect but no Time × Group interaction, as follows. MCV showed a tendency to decline and recover baseline values with lower levels at week 12 compared to weeks 4, 8, and 16 (*p* < 0.05). RDW slightly increased from baseline to week 4 (*p* = 0.02) and decreased between weeks 8 and 12 (*p* = 0.01) to reach values similar to those to baseline at week 16. MCH fluctuated significantly throughout the assay with significant differences

between weeks 4 and 8 (*p* = 0.03) and weeks 4 and 16 (*p* = 0.008). Serum ferritin displayed a significant increase during the first 4 weeks (*p* = 0.043) and recovered baseline values at week 16. Serum transferrin and TIBC showed an increase from week 8 to week 16 (*p* < 0.05). Serum iron, transferrin saturation, and sTfR did not show changes throughout the intervention.

DISCUSSION

The dairy products used in the present study supplied 83% of the RDA of iron (15 mg/portion/day) provided in the form of micronized encapsulated ferric pyrophosphate, which has been demonstrated to be highly bioavailable [11,23], and were consumed by iron-deficient menstruating women as part of their usual diet. The fact that levels of serum 25-hydroxyvitamin D increased during the assay in the Fe + D group indicates good compliance. However, the consumption of this dairy product during 4 months did not improve iron status.

It has been reported that microencapsulation of iron reduces the interference with other components of the diet that could inhibit iron absorption [9]. However, our research group observed that the bioavailability of this source of iron depends on the inhibitors or enhancers contained in the food matrix. In one study,

Table 2. Changes in Hematological and Iron Biomarkers of Iron-Deficient Women Consuming Fe or Fe + D Dairy Products^a

| Groups | Baseline | Week 4 | Week 8 | Week 12 | Week 16 | Time <i>p</i> | Time × Group <i>p</i> |
|--|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|
| Total erythrocytes (× 10 ¹² /L) | | | | | | | |
| Fe | 4.35 ± 0.34 ^a | 4.31 ± 0.31 ^{ab} | 4.28 ± 0.29 ^b | 4.26 ± 0.32 ^b | 4.29 ± 0.34 ^{ab} | <0.001 | 0.01 |
| Fe + D | 4.42 ± 0.30 ^a | 4.33 ± 0.28 ^{bc} | 4.41 ± 0.28 ^{***} | 4.31 ± 0.27 ^b | 4.38 ± 0.30 ^{ac} | | |
| Hematocrit (%) | | | | | | | |
| Fe | 39.4 ± 2.6 ^a | 39.0 ± 2.2 ^{ab} | 38.7 ± 2.2 ^{ab} | 38.4 ± 2.3 ^b | 38.9 ± 2.7 ^{ab} | <0.001 | 0.04 |
| Fe + D | 39.7 ± 2.4 ^a | 38.9 ± 2.3 ^{bc} | 39.5 ± 2.3 ^{***} | 38.5 ± 2.1 ^b | 39.3 ± 2.6 ^{ac} | | |
| Mean corpuscular volume (fL) | | | | | | | |
| Fe | 90.6 ± 3.4 | 90.7 ± 3.6 | 90.8 ± 3.8 | 90.4 ± 3.8 | 90.7 ± 3.6 | <0.001 | NS |
| Fe + D | 89.8 ± 4.4 | 89.9 ± 4.4 | 89.9 ± 4.7 | 89.5 ± 4.8 | 90.0 ± 4.8 | | |
| Red blood cell distribution width (%) | | | | | | | |
| Fe | 13.7 ± 0.7 | 14.0 ± 0.9 | 14.0 ± 0.9 | 13.9 ± 1.0 | 13.9 ± 0.9 | 0.002 | NS |
| Fe + D | 13.8 ± 0.8 | 13.9 ± 0.9 | 13.9 ± 0.8 | 13.8 ± 0.7 | 13.9 ± 0.8 | | |
| Hemoglobin (g/dL) | | | | | | | |
| Fe | 13.3 ± 0.8 ^a | 13.2 ± 0.7 ^{ab} | 13.0 ± 0.7 ^b | 13.0 ± 0.7 ^b | 13.0 ± 0.9 ^b | <0.001 | 0.04 |
| Fe + D | 13.4 ± 0.7 ^a | 13.2 ± 0.8 ^{ab} | 13.3 ± 0.8 ^{***} | 13.0 ± 0.7 ^b | 13.2 ± 0.9 ^{ab} | | |
| Mean corpuscular hemoglobin (pg) | | | | | | | |
| Fe | 30.6 ± 1.4 | 30.6 ± 1.4 | 30.5 ± 1.4 | 30.6 ± 1.4 | 30.4 ± 1.4 | <0.001 | NS |
| Fe + D | 30.2 ± 1.6 | 30.3 ± 1.6 | 30.2 ± 1.7 | 30.5 ± 2.2 | 30.1 ± 1.8 | | |
| Serum Fe (μg/dL) | | | | | | | |
| Fe | 82.9 ± 31.9 | 78.5 ± 31.9 | 83.9 ± 41.0 | 80.0 ± 33.7 | 74.0 ± 31.2 | NS | NS |
| Fe + D | 88.1 ± 36.8 | 96.8 ± 39.4 | 90.0 ± 48.5 | 93.6 ± 37.9 | 84.3 ± 47.7 | | |
| Serum ferritin (ng/mL) | | | | | | | |
| Fe | 26.1 ± 13.7 | 27.5 ± 13.8 | 26.6 ± 13.6 | 27.9 ± 14.5 | 24.3 ± 12.0 | 0.001 | NS |
| Fe + D | 22.8 ± 11.3 | 25.1 ± 12.5 | 23.2 ± 10.9 | 25.9 ± 13.9 | 23.8 ± 11.3 | | |
| Serum transferrin (mg/dL) | | | | | | | |
| Fe | 292.5 ± 50.7 | 297.9 ± 56.3 | 302.3 ± 53.8 | 306.3 ± 50.9 | 305.3 ± 51.9 | 0.001 | NS |
| Fe + D | 301.5 ± 65.4 | 307.2 ± 61.2 | 316.0 ± 64.1 | 306.6 ± 60.3 | 308.2 ± 62.1 | | |
| Transferrin saturation (%) | | | | | | | |
| Fe | 20.6 ± 8.0 | 19.5 ± 8.7 | 20.6 ± 11.5 | 19.2 ± 8.9 | 17.9 ± 8.1 | NS | NS |
| Fe + D | 22.5 ± 13.4 | 23.7 ± 11.2 | 21.4 ± 12.8 | 22.4 ± 9.8 | 20.5 ± 12.5 | | |
| Total iron binding capacity (μmol/L) | | | | | | | |
| Fe | 73.4 ± 12.7 | 74.8 ± 14.1 | 75.9 ± 13.5 | 76.9 ± 12.8 | 76.6 ± 13.0 | 0.001 | NS |
| Fe + D | 75.7 ± 16.4 | 77.1 ± 15.4 | 79.3 ± 16.1 | 77.0 ± 15.1 | 77.4 ± 15.6 | | |
| Soluble transferrin receptor (mg/L) | | | | | | | |
| Fe | 1.51 ± 0.68 | — | 1.48 ± 0.66 | — | 1.50 ± 0.63 | NS | NS |
| Fe + D | 1.72 ± 0.65 | — | 1.55 ± 0.58 | — | 1.50 ± 0.53 | | |

NS = nonsignificant, ANOVA = analysis of variance.

^aValues are mean ± SD. When a significant Time × Group interaction is observed, values within a row not sharing a common letter were significantly different (repeated measures ANOVA followed by Bonferroni test).

p* ≤ 0.05 and *p* = 0.01 indicate differences from the Fe group at each time point (ANOVA).

rats were fed cocoa powder fortified with microencapsulated ferric pyrophosphate or with ferrous fumarate compared to a control diet containing ferrous sulfate. Iron absorption was significantly lower in the 2 iron-enriched cocoa groups compared to the control group, without significant differences due to the iron salt. Liver iron was lower in the group that consumed ferric pyrophosphate compared to the other 2 groups, and hemoglobin and TIBC values showed a deficient iron status in rats consuming the ferric pyrophosphate cocoa [24]. However, other results obtained in rats and humans [25,26] indicate that when ferric pyrophosphate is added to a meat pâté, iron bioavailability is similar to that from ferrous gluconate and ferrous sulfate. Recently, with similar experimental conditions as in the present study, we demonstrated the efficacy of the microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin added to a fruit juice rich in vitamin C (iron content 18 mg/portion). It was demon-

strated that after only 1 month, iron status improved and this fortified fruit juice was able to increase serum ferritin by 80% compared to the placebo fruit juice [11].

Several studies have investigated the efficacy of iron-fortified dairy products in infants. Iron-supplemented infant formulas or dairy products for infants that contain ferrous sulfate and vitamins A, C, D, and E have been proved to be effective in maintaining or improving iron nutritional status [27–29]. Another recent study found that ferric pyrophosphate from an instant whole-fat milk was poorly absorbed (measured by stable iron isotopes) compared to ferrous sulfate and ferrous ammonium phosphate [30]. Unfortunately, the compounds were not micronized, and thus the results may be partly attributed to the food matrix and to the particle size of the iron salt. There is very limited information concerning the effects of consuming cow's milk with added iron in adults, and to the best of our knowledge

no information is available on the effects of consuming milk fortified with microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin in women with iron deficiency.

Components in dairy products that could influence iron absorption are calcium and milk proteins. Epidemiological data suggest an inverse association between calcium intake and iron status [31–33]; however, there are many contradictory results on this issue. The results from interventional assays vary depending on various methodological aspects, such as short-term or long-term experimental period, single meals, or whole diet. Moreover, the same research group has sometimes reported conflicting results. For example, one group found an inhibition of iron absorption by calcium in 2 studies [34,35] but no effect in another [36]. Zijp et al. [37] suggested that 100 mg of calcium inhibits 50% of iron absorption, but Minihane and Fairweather-Tait [38] did not observe changes in iron status when a group of healthy women received 1200 mg of calcium (400 mg/meal) during 6 months compared to women who did not receive supplementation. An adaptive response, possibly involving an upregulation in the efficiency of iron absorption, has been suggested as a possible explanation for the disparity between the results from short- and long-term studies [39,40].

In the present study, the portion of the flavored skim milk supplied 15 mg of iron and contained 600 mg of calcium and was ingested separately 2 hours before or after main meals. This supports the possible inhibitory effect of calcium that was ingested always simultaneously with iron. In this regard, recent studies carried out in Caco-2 cells demonstrated that calcium could modify the expression and functionality of the divalent metal transporter protein 1 and ferroportin, affecting iron uptake at the apical membrane and inhibiting the iron transfer into circulation [40–42].

Serum ferritin, the principal variable in this study, exhibited levels very similar to those of a group of iron-deficient women consuming a placebo fruit juice, without added iron, during the same experimental period as in the present study [11] (Table 2). This suggests that iron absorption was very poor and that the long-term adaptation mechanism mentioned above did not occur in our assay because the overall changes in iron stores during the 16 experimental weeks were negligible.

Other components in cow's milk that could cause inhibition of iron absorption include casein and whey proteins [43,44]. The major protein in milk is casein; this protein binds cations, including iron, by clusters of phosphoserine. However, reports on the casein phosphopeptides that are released by casein digestion give conflicting results. Binding of iron to β -casein or to hydrolyzed β -casein improves iron absorption, but casein phosphopeptides derived from the hydrolysis of whole casein or fractions enriched with α_s -casein inhibits iron absorption [45]. Regarding whey proteins, Miglioranza et al. [46] reported the effectiveness of a whey cheese drink fortified with ferrous bisglycinate on iron status in children and adolescents. This drink did not contain casein. Moreover, it is known that human milk,

which contains about 4 times less calcium than cow's milk and does not contain α_s -casein [44,47], favors iron bioavailability. This could explain the difference in iron bioavailability in both milks. Hallberg et al. [47] tested whether adding calcium to human milk to reach the same level as cow's milk modified iron bioavailability and found that the concentration of calcium explained about 70% of the difference in iron bioavailability between human and cow's milk. Therefore, in the present study, both the casein and the calcium content of the dairy product appeared to cause poor iron absorption. Moreover, this product did not contain any iron enhancer.

In this assay, addition of vitamin D to the iron skim milk produced a slight improvement in several hematological parameters. Total erythrocytes, hematocrit, and hemoglobin showed higher values in the Fe + D group compared to the Fe group at week 8. These results have to be attributed to vitamin D because iron absorption from the dairy product, as explained above, was very poor.

It is known that in addition to its effects on bone metabolism, vitamin D exerts a variety of pleiotropic effects [48]. It has been implicated in a wide range of cellular functions including cell development, differentiation, and growth. It has been reported that local production of 1,25-dihydroxyvitamin D occurs in different tissues besides kidney and regulates up to 200 genes, which helps to control cell growth and cellular differentiation [12]. The relationship between iron and vitamin D has been observed in studies where the supplementation with vitamin D [49] or the inclusion of its active metabolite 1,25-dihydroxycholecalciferol in stem cellular culture [50] exerted a beneficial effect on increasing erythropoiesis. The mechanism could be via increased erythropoietin–receptor expression and increased membrane permeability of calcium [49,50]. Further studies are needed to explore in depth the actions of vitamin D metabolites and the possible synergy of iron and vitamin D fortification.

CONCLUSION

The microencapsulated iron pyrophosphate-fortified flavored skim milk did not improve the iron status in iron-deficient menstruating women. However, vitamin D fortification slightly enhances erythropoiesis and iron status. The possible action of vitamin D on erythropoiesis, iron metabolism, and prevention of anemia deserves further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by Project AGL2009-11437. L.T. and R.B.R. were supported by a JAE-predoc grant from the Spanish National Research Council (CSIC) and European Social

Fund. The authors are grateful to Sara Lorigados and Jorge Parra for the lab assistance, Leticia Calera for helping with dietary calculation, and the volunteers who participated in the study. CAPSA, Spain, is acknowledged for providing the dairy products.

REFERENCES

- Benoist B, McLean E, Egli I, Cogswell M: “Worldwide Prevalence of Anaemia 1993–2005. WHO Global Database on Anaemia.” Geneva: World Health Organization, 2008.
- Zimmermann MB, Hurrell RF: Nutritional iron deficiency. *Lancet* 370:511–520, 2007.
- McArthur JO, Petocz P, Caterson ID, Samman S: A randomized controlled trial in young women of the effects of consuming pork meat or iron supplements on nutritional status and feeling of well-being. *J Am Coll Nutr* 31:175–184, 2012.
- Institute of Medicine: Iron. In Institute of Medicine (ed): “Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.” Washington, DC: National Academic Press, pp 290–393, 2001.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Carbajal A, Pedrosa MM, Roe MA, Fairweather-Tait SJ, Vaquero MP: Oily fish increases iron bioavailability of a phytate rich meal in young iron deficient women. *J Am Coll Nutr* 27:96–101, 2008.
- Mimura EC, Bregano JW, Dichi JB, Gregorio EP, Dichi I: Comparison of ferrous sulfate and ferrous glycinate chelate for the treatment of iron deficiency anemia in gastrectomized patients. *Nutrition* 24:663–668, 2008.
- McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B: Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutr* 12:444–454, 2009.
- Commission Regulation (EU) No 1161/2011 of 14 November 2011 amending Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council, Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 953/2009 as regards the lists of mineral substances that can be added to foods. *Official Journal of the European Union*. L296. 29–34, 2011.
- Hurrell RF: Fortification: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr* 132:806S–812S, 2002.
- Moretti D, Zimmermann MB, Wegmuller R, Walczyk T, Zeder C, Hurrell RF: Iron status and food matrix strongly affect the relative bioavailability of ferric pyrophosphate in humans. *Am J Clin Nutr* 83:632–638, 2006.
- Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP: Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr* 105:1652–1659, 2011.
- Holick MF, Chen TC: Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87:1080S–1086S, 2008.
- Lips P: Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:297–300, 2010.
- Lips P: Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92:4–8, 2006.
- Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, Rasgon SA: Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 89:447–452, 2010.
- McGillivray G, Skull SA, Davie G, Kofoed SE, Frydenberg A, Rice J, Cooke R, Carapetis JR: High prevalence of asymptomatic vitamin D and iron deficiency in East African immigrant children and adolescents living in a temperate climate. *Arch Dis Child* 92:1088–1093, 2007.
- Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Zazo P, de la Piedra C, Vaquero MP: Relationship between vitamin D deficiency, bone remodelling and iron status in iron-deficient young women consuming an iron-fortified food. *Eur J Nutr* 52:695–703, 2013.
- Toxqui L, Perez-Granados AM, Blanco-Rojo R, Wright I, De la Piedra C, Vaquero MP: Low iron status as a factor of increased bone resorption and effects of an iron and vitamin D–fortified skimmed milk on bone remodelling in young Spanish women. *Eur J Nutr* 2013. DOI: 10.1007/s00394-013-0544-4.
- Moher D, Schulz KF, Altman DG: The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. *Ann Intern Med* 134:657–662, 2001.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP: Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem* 65:165–174, 2009.
- Koulaouzidis A, Cottier R, Bhat S, Said E, Linaker BD, Saeed AA: A ferritin level >50 microg/L is frequently consistent with iron deficiency. *Eur J Intern Med* 20:168–170, 2009.
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C: Recommended intakes of energy and nutrients for the Spanish population [Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española]. In Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (eds): *Food Composition Tables [Tablas de Composición de Alimentos]* 13th ed. Madrid: Pirámide, pp 227–230, 2009.
- Roe MA, Collings R, Hoogewerff J, Fairweather-Tait SJ: Relative bioavailability of micronized, dispersible ferric pyrophosphate added to an apple juice drink. *Eur J Nutr* 48:115–119, 2009.
- Navas-Carretero S, Sarria B, Perez-Granados AM, Schoppen S, Izquierdo-Pulido M, Vaquero MP: A comparative study of iron bioavailability from cocoa supplemented with ferric pyrophosphate or ferrous fumarate in rats. *Ann Nutr Metab* 51:204–207, 2007.
- Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Sarriá B, Schoppen S, Vaquero MP: Iron bioavailability from pate enriched with encapsulated ferric pyrophosphate or ferrous gluconate in rats. *Food Sci Tech Int* 13:159–163, 2007.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Vaquero MP: Iron absorption from meat pate fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. *Nutrition* 25:20–24, 2009.
- Maldonado Lozano J, Baro L, Ramirez-Tortosa MC, Gil F, Linde J, Lopez-Huertas E, Boza JJ, Gil A: Intake of an iron-supplemented milk formula as a preventive measure to avoid low iron status in 1–3 year-olds. *An Pediatr (Barc)* 66:591–596, 2007.
- Stekel A, Olivares M, Cayazzo M, Chadud P, Llaguno S, Pizarro F: Prevention of iron deficiency by milk fortification. II. A field

- trial with a full-fat acidified milk. *Am J Clin Nutr* 47:265–269, 1988.
29. Szymlek-Gay EA, Ferguson EL, Heath AL, Gray AR, Gibson RS: Food-based strategies improve iron status in toddlers: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 90:1541–1551, 2009.
 30. Walczyk T, Kastenmayer P, Storcksdieck Genannt Bonsmann S, Zeder C, Grathwohl D, Hurrell RF: Ferrous ammonium phosphate (FeNH₄PO₄) as a new food fortificant: iron bioavailability compared to ferrous sulfate and ferric pyrophosphate from an instant milk drink. *Eur J Nutr* 52:1361–1368, 2012.
 31. Galan P, Hercberg S, Soustre Y, Dop MC, Dupin H: Factors affecting iron stores in French female students. *Hum Nutr Clin Nutr* 39:279–287, 1985.
 32. Kenney MA: Factors related to iron nutrition of adolescent females. *Nutr Res* 5:157–166, 1985.
 33. Preziosi P, Hercberg S, Galan P, Devanlay M, Cherouvrier F, Dupin H: Iron status of a healthy French population: factors determining biochemical markers. *Ann Nutr Metab* 38:192–202, 1994.
 34. Monsen ER, Cook JD: Food iron absorption in human subjects. IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. *Am J Clin Nutr* 29:1142–1148, 1976.
 35. Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P: Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am J Clin Nutr* 53:106–111, 1991.
 36. Reddy MB, Cook JD: Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr* 65:1820–1825, 1997.
 37. Zijp IM, Korver O, Tijburg LB: Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40:371–398, 2000.
 38. Miniñane AM, Fairweather-Tait SJ: Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. *Am J Clin Nutr* 68:96–102, 1998.
 39. Bendich A: Calcium supplementation and iron status of females. *Nutrition* 17:46–51, 2001.
 40. Lonnerdal B: Calcium and iron absorption—mechanisms and public health relevance. *Int J Vitam Nutr Res* 80:293–299, 2010.
 41. Shawk A, Mackenzie B: Interaction of calcium with the human divalent metal-ion transporter-1. *Biochem Biophys Res Commun* 393:471–475, 2010.
 42. Thompson BA, Sharp PA, Elliott R, Fairweather-Tait SJ: Inhibitory effect of calcium on non-heme iron absorption may be related to translocation of DMT-1 at the apical membrane of enterocytes. *J Agric Food Chem* 58:8414–8417, 2010.
 43. Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD: Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr* 49:546–552, 1989.
 44. Ziegler EE: Consumption of cow's milk as a cause of iron deficiency in infants and toddlers. *Nutr Rev* 69(suppl 1):S37–S42, 2011.
 45. Kibangou IB, Bouhallab S, Henry G, Bureau F, Allouche S, Blais A, Guerin P, Arhan P, Bougle DL: Milk proteins and iron absorption: contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatr Res* 58:731–734, 2005.
 46. Miglioranza LH, Matsuo T, Caballero-Cordoba GM, Dichi JB, Cyrino ES, Oliveira IB, Martins MS, Polezer NM, Dichi I: Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia prevalence in children and adolescents from deprived areas in Londrina, Parana, Brazil. *Nutrition* 19:419–421, 2003.
 47. Hallberg L, Rossander-Hulten L, Brune M, Gleerup A: Bioavailability of iron in human milk and cow's milk in relation to their calcium contents. *Pediatr Res* 31:524–527, 1992.
 48. Bikle D: Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 94:26–34, 2009.
 49. Aucella F, Scalzulli RP, Gatta G, Vigilante M, Carella AM, Stallone C: Calcitriol increases burst-forming unit-erythroid proliferation in chronic renal failure. A synergistic effect with r-HuEpo. *Nephron Clin Pract* 95:c121–c127, 2003.
 50. Alon DB, Chaimovitz C, Dvilansky A, Lugassy G, Douvdevani A, Shany S, Nathan I: Novel role of 1,25(OH)₂D₃ in induction of erythroid progenitor cell proliferation. *Exp Hematol* 30:403–409, 2002.

Cambios en la presión arterial y en los niveles de lípidos en mujeres jóvenes que consumen un lácteo desnatado fortificado con vitamina d: estudio aleatorizado controlado

Nutrients (2013) DOI:10.3390/nu50x000x

La vitamina D ejerce diversas funciones además de las relacionadas con el hueso. **Objetivo:** Conocer los efectos del consumo de un lácteo desnatado fortificado con vitamina D sobre los niveles de glucosa, lípidos y sobre la presión arterial en mujeres jóvenes. **Métodos:** Se llevó a cabo un estudio aleatorizado controlado por placebo, doble ciego de grupos paralelos de 16 semanas de duración, en mujeres jóvenes con bajas reservas de hierro, las cuales consumieron un lácteo desnatado fortificada con hierro y con 200 UI/día (5µg) de vitamina D (grupo D-fortificado, n=55), o un lácteo placebo sin vitamina D (grupo D-placebo, n=54). También participó un grupo de mujeres de referencia con niveles adecuados de hierro (grupo referencia, n= 56). **Resultados:** Los niveles basales de 25-hidroxivitamina D se correlacionaron negativamente con los niveles de colesterol total ($r=-0.176$, $p=0.023$) y con los de LDL-colesterol ($r= -0.176$, $p=0.024$). Durante el ensayo, los niveles de LDL-colesterol aumentaron en el grupo D-placebo ($p=0.005$), mientras que tendieron a disminuir en el grupo D-fortificado ($p=0.07$). Ningún grupo mostró cambios en los niveles de colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos o glucosa. La presión arterial sistólica ($p=0.017$) y diastólica ($p=0.010$) disminuyeron durante el estudio en el grupo D-fortificado sin mostrar diferencias significativas al compararlo con el grupo D-placebo. **Conclusión:** El consumo de un producto lácteo fortificado con vitamina D reduce la presión arterial sistólica y diastólica, pero no produce cambios en los niveles de lípidos séricos en mujeres jóvenes.

Palabras claves: vitamina D; fortificación de alimentos; presión arterial; colesterol; estudio aleatorizado controlado; mujeres; producto lácteo.

Article

Changes in Blood Pressure and Lipid Levels in Young Women Consuming a Vitamin D-Fortified Skimmed Milk: A Randomised Controlled Trial

Laura Toxqui, Ruth Blanco-Rojo, Ione Wright, Ana M. Pérez-Granados and M. Pilar Vaquero *

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain; E-Mails: laura.toxqui@ictan.csic.es (L.T.); ruth.blanco@ictan.csic.es (R.B.-R.); ione.wright@ictan.csic.es (I.W.); granados@ictan.csic.es (A.M.P.-G.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mpvaquero@ictan.csic.es; Tel.: +34-915-492-300; Fax: +34-915-493-627.

Received: 15 October 2013; in revised form: 12 November 2013 / Accepted: 27 November 2013 / Published: 5 December 2013

Abstract: Vitamin D exerts a variety of extra-skeletal functions. Aim: to know the effects of the consumption of a vitamin D-fortified skimmed milk on glucose, lipid profile, and blood pressure in young women. Methods: a randomised, placebo-controlled, double-blind parallel-group trial of 16 weeks duration was conducted in young women with low iron stores who consumed a skimmed milk fortified with iron and 200 IU/day (5 µg) of vitamin D (D-fortified group, $n = 55$), or a placebo without vitamin D (D-placebo group, $n = 54$). A reference group ($n = 56$) of iron-sufficient women was also recruited. Results: baseline serum 25-hydroxyvitamin D was inversely correlated with total-cholesterol ($r = -0.176$, $p = 0.023$) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-chol) ($r = -0.176$, $p = 0.024$). During the assay, LDL-cholesterol increased in the D-placebo group ($p = 0.005$) while it tended to decrease in the D-fortified group ($p = 0.07$). Neither group displayed changes in total-cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-chol), triglycerides or glucose levels. Systolic ($p = 0.017$) and diastolic ($p = 0.010$) blood pressure decreased during the assay in the D-fortified group without significant differences compared to the D-placebo. Conclusion: consumption of a dairy product fortified with vitamin D reduces systolic and diastolic blood pressure but does not change lipid levels in young women.

Keywords: vitamin D; food fortification; blood pressure; cholesterol; randomised controlled trial; women; dairy product

1. Introduction

It is well known that vitamin D is essential for calcium absorption and bone health. Moreover, a number of extra-skeletal effects have been attributed to this vitamin since the vitamin D receptor and the enzyme 1α -hydroxylase, which converts 25-hydroxyvitamin D (25OHD) to its active form 1,25-dihydroxyvitamin D, are present in most body tissues [1,2]. Therefore, research on the role of vitamin D in chronic illnesses including cancer, diabetes, and cardiovascular and autoimmune diseases is an emerging field [3].

Low vitamin D status, assessed by 25OHD levels, has been associated with increased risk of major cardiovascular events, cardiovascular mortality, and all-cause mortality [4–6]. However, the associations observed with specific cardiovascular risk markers are not consistent or are contradictory [1,7,8]. Vitamin D may influence cardiovascular disease risk by regulating blood pressure through the rennin-angiotensin system [9], by modulating serum lipids levels [1], or by stimulating insulin secretion [10]. Moreover, reports on the cardiovascular effects of vitamin D in healthy people, including young women, are scarce. However, randomised clinical trials are scarce and further research is needed to clarify this relationship [1,7,11].

Recently, a relationship between vitamin D and iron deficiencies has been suggested [12]. Intervention studies in menstruating women show that iron plays a role in bone remodelling and that vitamin D enhances erythropoiesis [13,14]. Therefore, the metabolic pathways of both micronutrients may be interrelated.

There is variability in the Recommended Dietary Allowances (RDA) for different countries. The Spanish RDA for adults are established at 200 IU (5 μ g) per day [15,16] while the United States and Canada RDA are set at 600 IU (15 μ g) per day [17]. In spite of being a sunny Mediterranean country, Spain presents high prevalence of vitamin D deficiency [18]. Therefore, food fortification can be useful to prevent vitamin D deficiency, achieve peak bone mass and maintain bone health [19]. There are different fortification practices in the world; countries such as Canada and the United States of America have developed mandatory fortification in several staple food items, however fortification with vitamin D is optional in the European countries [20].

The aim of the present study was to know: (1) whether there is an association between vitamin D status and lipid levels; and (2) whether consumption of a vitamin D-fortified dairy product, compared to a placebo, modified the lipid profile, blood pressure, or glucose levels in young women.

2. Experimental Section

2.1. Subjects

Healthy, 18–35 years old, non-smoking, non-pregnant, and non-breast-feeding Caucasian women were recruited. Those with low iron stores (serum ferritin \leq 30 ng/mL, haemoglobin \geq 11 g/dL) were

assigned to one of the nutritional intervention groups, while those with normal iron stores (serum ferritin > 30 ng/mL, haemoglobin > 11 g/dL) were allocated to the reference group.

Exclusion criteria for all subjects were as follows: amenorrhea (lack of menstruation in the 3 months prior to the study), menopause, iron-metabolism-related diseases, chronic gastric diseases, renal disease, or blood donor status. For the nutritional intervention groups, an additional exclusion criterion was allergy to any of the dairy components used in the assay.

The variable used to calculate the sample size of the nutritional intervention groups was ferritin. Sample size was based on 90% power to detect a minimum difference of 10 units of ferritin between groups with a confidence level of 95%, using a reference mean value of 26 ± 16 ng/mL, previously obtained by our research group in iron-deficient women. It was determined that a minimum of 54 subjects was required in each group.

A total of 584 women contacted the research group to receive information, and 289 underwent the screening process. Women who did not meet the inclusion criteria or declined to participate were excluded ($n = 104$). Finally, a total of 129 iron-deficient women agreed to participate in the nutritional intervention and were randomly distributed into two groups (D-placebo or D-fortified), while 56 iron-sufficient women were included in the reference group. During the study, 16 women abandoned the nutritional intervention and 4 were excluded due to lack of compliance. The results of the 109 women who completed the nutritional intervention (D-placebo, $n = 54$ and D-fortified, $n = 55$) were analysed.

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain (#266, 23 May 2011). All subjects signed informed consent.

2.2. Nutritional Intervention Design

The study was performed in Madrid, Spain (latitude: 40.24°N). The intervention in the iron-deficient women consisted of a 16-week long, randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-design trial. The assay was performed all at once starting all volunteers in January. As part of their usual diet, one group consumed 500 mL/day of a dairy product fortified with iron but without vitamin D (D-placebo, $n = 54$) whereas the other consumed 500 mL/day of the product fortified with iron and vitamin D (D-fortified, $n = 55$). This trial followed the CONSORT guidelines [21], details of the flow chart have been previously reported [14]. The study is registered at clinicaltrials.gov as NCT01739907.

The dairy products were manufactured from vanilla-flavoured skimmed milk and supplied 15 mg of iron per unit, in the form of microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin, equivalent to the 83.3% of Recommended Dietary Allowance (RDA) [15,16,22] and were provided in 500 mL cartons. In addition, the vitamin D-fortified dairy product provided 200 IU (5 µg) of vitamin D₃ per carton, equivalent to 100% of the daily Spanish RDA [15,16]. Composition of the products is shown on Table 1 (products and data provided by CAPSA, Granda-Siero, Spain). Vitamin D₃ content in the vitamin D-fortified product was determined by Mass Spectrometer (LC QQQ 6460, Agilent Technologies, Englewood, CA, USA).

Participants were instructed to consume one 500 mL carton, shaken, in one sitting, every day, at least 2 h before or after a meal. Volunteers who could not drink the dairy product one day were instructed to consume two cartons the following day.

Table 1. Composition of the dairy products (per 100 mL). Ingredients: skimmed milk, sugar, sucralose, stabilizers (E-452, E-412, E-407, E-339), carotens (E-160a), vanilla flavouring, microencapsulated ferric pyrophosphate, and cholecalciferol (D-fortified product).

| Component | D-Placebo Dairy Product | D-Fortified Dairy Product |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Energy (kcal) | 37 (156 kJ) | 37 (156 kJ) |
| Proteins (g) | 3.1 | 3.1 |
| Carbohydrates (g) | 5.4 | 5.4 |
| Fat (g) | 0.3 | 0.3 |
| Of which saturated (g) | 0.2 | 0.2 |
| Calcium (mg) | 120 | 120 |
| Phosphorous (mg) | 97 | 97 |
| Iron (mg) | 3.1 | 2.9 |
| Vitamin D (μg) | 0 | 0.99 |

2.3. Dietary Control, Health Questionnaires, and Anthropometric Determinations

Dietary intake was evaluated at baseline; subjects completed a 72 h detailed dietary intake report specifying the type and/or brand of the product and serving weights of food consumed. Daily food, energy and nutrient intake, and energy provided by macronutrients were calculated by a computer application (DIAL, Alce Ingeniería, Madrid, Spain).

Participants of the intervention groups were instructed not to deviate from their regular lifestyle and to maintain their normal diet and exercise habits. In addition, volunteers completed questionnaires every month in order to monitor possible health problems, menstruation changes, medication use (including hormonal contraceptives and type), diet changes, and changes in their normal routine, including holidays, extra sun exposure or use of tanning beds. The compliance of the study was assessed monthly by questionnaires and a personal interview when the volunteers underwent blood sampling. The volunteer was excluded of the data analysis if more than 4 cartons were left at the end of the assay.

At baseline and at 8 and 16 weeks, body weight was measured with a scale (to a precision of 100 g; Seca, Hamburg, Germany), height was measured with a stadiometer incorporated into the scale, and body mass index (BMI) was calculated. Systolic and diastolic blood pressure was measured with a validated digital automated blood pressure monitor (OMROM M6; Omrom Health Care Co., Kyoto, Japan). To avoid inter-examiner variability, one trained member of the research team did all anthropometric and blood pressure determinations, always under the same conditions.

2.4. Blood Sampling and Biochemical Analyses

This article presents secondary outcomes of a wider study. Iron and bone determinations were reported previously [14,23]. Blood samples were collected at baseline and at weeks 8 and 16 after a 12 h fasting period. Haemoglobin was determined in whole blood following standard laboratory

techniques using the Symex NE 9100 automated haematology analyser (Symex, Kobe, Japan). Serum ferritin was determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyser (Roche, Basel, Switzerland). Serum 25OHD was analysed by an ELISA commercial kit (25-hydroxyvitamin D EIA, Immunodiagnostic Systems, IDS, Boldon Colliery, UK), with intra- and inter-assay coefficients of variation of 5.6% and 6.4%, respectively. All determinations of each person were carried out in the same run to avoid interassay variation. Serum total-cholesterol (T-chol), HDL-cholesterol (HDL-chol), LDL-cholesterol (LDL-chol), triglycerides and glucose were determined by an automatic analyser (RA 2000; Technicon, Tarrytown, NY, USA). The cardiovascular risk index was calculated as the T-chol/HDL-chol ratio.

All determinations were subject to the ISO-9001-2000 requirements.

2.5. Statistical Analyses

Data are presented as means with their standard deviations. A normal distribution of variables was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. Triglyceride values were log-transformed for statistical testing. Pearson's linear correlation tests between parameters were performed at baseline for all volunteers ($n = 165$). Repeated measures analysis of variance (ANOVA) was carried out for time and time \times group effects for the nutritional intervention groups ($n = 109$). When a significant effect was observed, the post hoc Bonferroni test was used. A p value of <0.05 was considered significant. The SPSS statistical package for Windows (version 20.0, IBM, Armonk, NY, USA) was used to analyse the data.

3. Results

A total of 165 women completed the study with a compliance rate $>96\%$. Ages of the volunteers were 24.7 ± 4.3 and 26.5 ± 3.8 years for the intervention and reference groups, respectively, without significant differences between groups. Mean baseline haemoglobin value was 13.4 ± 0.8 mg/dL for all women, without significant differences between groups. Ferritin levels were 72.1 ± 29.5 ng/mL for the reference group and 24.7 ± 12.5 ng/dL for the intervention groups ($p < 0.001$). No differences were found in energy, macronutrient intake, or dietary lipid profile at baseline (Table 2).

The reference group did not show significant differences compared to the nutritional intervention groups at baseline in 25OHD (51.7 ± 17.8 nmol/L) or the rest of parameters. Serum 25OHD and T-chol ($r = -0.176$, $p = 0.023$), and serum 25OHD and LDL-chol ($r = -0.176$, $p = 0.024$) were inversely correlated. No other significant correlations were found ($n = 165$).

Body weight presented significant time effects in the D-placebo and D-fortified groups ($p < 0.001$ and $p = 0.003$ respectively), with higher values at weeks 8 and 16 compared to baseline (Table 3). Body mass index was within normal limits throughout the study in all volunteers (<25 kg/m²).

Table 2. Baseline energy, nutrient and cholesterol intakes of the three groups.

| Component | Experimental groups | | |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| | D-placebo (n = 54) | D-fortified (n = 55) | Reference (n = 56) |
| Energy (kcal/day) | 2057 ± 515 | 2095 ± 528 | 2122 ± 487 |
| Protein (% energy/day) | 16.9 ± 3.5 | 16.3 ± 3.7 | 15.4 ± 3.1 |
| Carbohydrate (% energy/day) | 40.3 ± 6.4 | 38.7 ± 6.4 | 40.9 ± 6.7 |
| Lipid (% energy/day) | 39.4 ± 6.4 | 41.4 ± 5.8 | 40.0 ± 6.7 |
| SFA (% energy/day) | 13.2 ± 3.1 | 14.0 ± 3.2 | 13.0 ± 3.0 |
| MUFA (% energy/day) | 17.0 ± 3.5 | 17.4 ± 3.4 | 17.4 ± 4.0 |
| PUFA (% energy/day) | 5.4 ± 1.4 | 5.5 ± 1.8 | 5.4 ± 1.8 |
| Cholesterol (mg/day) | 316.8 ± 131.4 | 344.1 ± 190.3 | 305.5 ± 113.3 |
| Calcium (mg) | 910 ± 319 | 945 ± 362 | 909 ± 313 |
| Vitamin D (µg) | 3.2 ± 2.4 | 2.8 ± 3.1 | 4.0 ± 5.0 |
| Iron (mg) | 13.5 ± 5.3 | 12.9 ± 5.2 | 13.0 ± 5.0 |

D-placebo, women assigned to the iron-fortified skimmed milk; D-fortified, women assigned to the iron and vitamin D-fortified skimmed milk. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids. Values are means ± SD. No differences were found between groups (ANOVA).

Table 3. Body weight, glucose, lipids and blood pressure of the intervention groups.

| Groups | Baseline | Week 8 | Week 16 | Time effect (p) |
|-----------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|-----------------|
| <i>Body Weight (kg)</i> | | | | |
| D-placebo | 59.9 ± 8.3 | 60.5 ± 8.6 * | 60.8 ± 9.0 * | <0.001 |
| D-fortified | 59.1 ± 9.4 | 59.7 ± 9.1 * | 59.8 ± 9.1 * | 0.003 |
| <i>Serum 25OHD (nmol/L)</i> | | | | |
| D-placebo | 62.9 ± 20.8 | 59.4 ± 19.6* | 63.2 ± 18.3 | 0.010 |
| D-fortified | 62.3 ± 20.8 | 67.1 ± 19.8* | 71.2 ± 21.1 * [#] | <0.001 |
| <i>Glucose (mg/dL)</i> | | | | |
| D-placebo | 83.40 ± 5.85 | 83.25 ± 5.42 | 83.68 ± 5.08 | NS |
| D-fortified | 83.77 ± 6.32 | 84.02 ± 6.28 | 83.14 ± 6.34 | NS |
| <i>T-Chol (mg/dL)</i> | | | | |
| D-placebo | 176.81 ± 34.04 | 179.53 ± 35.66 | 182.64 ± 37.21 | NS |
| D-fortified | 176.51 ± 40.64 | 177.98 ± 39.93 | 175.57 ± 29.73 | NS |
| <i>LDL-Chol (mg/dL)</i> | | | | |
| D-placebo | 103.27 ± 29.61 | 101.34 ± 29.43 | 107.36 ± 32.80 * [#] | 0.005 |
| D-fortified | 101.16 ± 29.32 | 99.09 ± 28.15 | 96.95 ± 26.82 | NS (0.07) |
| <i>HDL-Chol (mg/dL)</i> | | | | |
| D-placebo | 66.40 ± 14.04 | 66.25 ± 12.71 | 66.42 ± 11.97 | NS |
| D-fortified | 69.79 ± 14.23 | 69.51 ± 15.12 | 69.30 ± 11.91 | NS |
| <i>Triglyceride (mg/dL)</i> | | | | |
| D-placebo | 72.04 ± 29.65 | 76.68 ± 30.26 | 75.13 ± 26.33 | NS |
| D-fortified | 74.06 ± 31.92 | 79.41 ± 41.44 | 77.86 ± 32.95 | NS |
| <i>T-Chol/HDL-Chol</i> | | | | |
| D-placebo | 2.73 ± 0.54 | 2.78 ± 0.62 | 2.80 ± 0.63 | NS |
| D-fortified | 2.54 ± 0.55 | 2.59 ± 0.63 | 2.59 ± 0.55 | NS |

Table 3. *Cont.*

| | | <i>Systolic BP(mmHg)</i> | | | |
|-------------|--------------|----------------------------|--------------------------|-------|--|
| D-placebo | 107.7 ± 11.7 | 108.4 ± 9.9 | 108.3 ± 9.4 | NS | |
| D-fortified | 109.3 ± 10.4 | 108.6 ± 8.2 | 105.9 ± 9.1 [#] | 0.017 | |
| | | <i>Diastolic BP (mmHg)</i> | | | |
| D-placebo | 67.1 ± 8.3 | 66.3 ± 6.9 | 66.7 ± 7.5 | NS | |
| D-fortified | 69.2 ± 9.4 | 66.0 ± 7.0 * | 66.6 ± 7.3 * | 0.010 | |

D-placebo, women assigned to the iron-fortified skimmed milk; D-fortified, women assigned to the iron and vitamin D-fortified skimmed milk; BP, blood pressure. Values are means ± SD. Time × group interaction was not significant except for LDL-chol ($p = 0.001$). * $p < 0.05$ compared to baseline; [#] $p < 0.05$ compared to week 8.

Serum 25OHD levels increased from baseline to week 16 in the D-fortified group but not in the D-placebo group which showed a decrease at week 8. Serum glucose and lipid levels were within normal limits, with no differences between groups at baseline (Table 3). No changes over time or group were found for glucose or lipids, except for LDL-chol (time × group, $p = 0.001$), which increased in the D-placebo group ($p = 0.005$) but tended to decrease in the D-fortified group ($p = 0.07$) without significant differences between groups at week 16 ($p = 0.07$). Systolic and diastolic blood pressure did not present time × group interactions; both values decreased significantly ($p = 0.017$ and $p = 0.010$, respectively) in the D-fortified group whereas in the D-placebo group no changes were observed (Table 3).

4. Discussion

This study was carried out in healthy women whose lipid and glucose levels and blood pressure were within normal limits. The nutritional intervention was performed in women with low iron stores who, on average, presented vitamin D insufficiency (25OHD levels between 51 and 74 nmol/L), and those who consumed the vitamin D-fortified product nearly reached sufficiency (25OHD, 71 ± 21 nmol/L) at the end of the study. However, although both dairy products contained added iron, we previously demonstrated that the iron salt used to fortify the food (microencapsulated ferric pyrophosphate) was not effective at improving iron status, due to poor absorption [14]. Therefore, present results are attributed to vitamin D.

The slight increase in body weight seen in both intervention groups indicates high compliance, as both skimmed milks added an additional 185 kcal per day to the habitual diet that did not change throughout the study [14]. Nevertheless, an adaptation to the extra calories may occur, as body weight remained stable from week 8 to the end of the study and none of the women were or became overweight.

Some studies suggest a potential benefit of vitamin D in glucose homeostasis, most of them obtained in observational studies and in type 2 diabetes patients [10,24]. A recent systematic review [25] concluded that there is a weak effect of vitamin D supplementation in reducing fasting glucose and improving insulin resistance in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance, but not in subjects with normal glucose tolerance. This is in agreement with our findings as the volunteers were healthy young women with glucose and lipid parameters within normal limits.

The negative association between 25OHD and T-chol and LDL-chol values found in the present study concurs with several reports in different population groups [26,27]. During the intervention

a non-significant decrease in LDL-chol was observed in the D-fortified group while in the D-placebo group it increased. These changes may be attributed to the hypercholesterolaemic effect of milk casein [28,29], as the dairy product was skimmed, and to a counteracting effect of vitamin D. In this regard, there were no confounding dietary factors; the consumption of the dairy products increased the percentage of energy from proteins and reduced that from fat in both groups; and there were no differences in macro and micronutrient intake, other than vitamin D, between groups [14]. Some studies, however, reported a positive relationship between vitamin D status and serum lipids [7,30,31], and Ponda *et al.* [32] observed that correcting vitamin D deficiency by administering 50,000 IU of vitamin D weekly during 8 weeks significantly increased LDL-cholesterol in vitamin D-deficient high cardiovascular-risk adults. The discrepancy between this finding and ours can be interpreted considering the much higher dose given, compared to 200 IU/day in the present study, and suggests that the relationship between the vitamin D dose and LDL-cholesterol levels follows a U trend.

To the best of our knowledge, no other randomised controlled trial with a vitamin D-fortified food has observed a significant decrease in blood pressure. It has been suggested that components of milk such as calcium, potassium, magnesium, casein, and whey protein, protect against hypertension [33], and Wang *et al.* [34] found that intakes of low-fat dairy products, calcium, and vitamin D were each inversely associated with risk of hypertension in a cohort of women (age ≥ 45 years). Similarly, in another prospective study conducted in Spain, low-fat (but not whole-fat) dairy product consumption was associated with a lower risk of hypertension [35]. The possible effect of calcium and milk proteins on blood pressure was not observed in the present study, as blood pressure values did not vary in the D-placebo group. One explanation for this is the fact that calcium intake was adequate and reached 100% of the Spanish RDA (900 mg/day) at baseline [15,16]. Additionally, the quantity of milk proteins provided by these dairy products was lower than in other studies. Researchers who found a beneficial effect of whey and casein supplementation on blood pressure administered 40–50 g/day of protein [36,37] while in our intervention the extra consumption of milk protein was of only 15 g/day.

Therefore, we attribute the beneficial effects of this iron and vitamin D-fortified dairy product on blood pressure to vitamin D. Increasing evidence associates this vitamin with the renin-angiotensin-aldosterone system, as the vitamin D-receptor is expressed in the juxtaglomerular apparatus and its activation decreases renin gene expression [38]. Along these same lines, in a cohort of coronary syndrome patients, Tomaschitz *et al.* [39] found that serum 25OHD and 1,25-dihydroxyvitamin D levels were related to lower plasma renin concentrations and angiotensin 2 levels. Another mechanism by which vitamin D may affect blood pressure is secondary to parathormone changes [38], however parathormone levels in the present intervention were stable [23]. Consequently, the results of this randomised placebo-controlled trial show that consumption of a daily physiological dose of cholecalciferol (*i.e.*, the Spanish RDA) in a fortified food was able to significantly decrease blood pressure, and support a direct effect of vitamin D metabolites on the renin-angiotensin-aldosterone system and blood pressure.

There is controversy on the dietary recommendations on vitamin D. For the United States of America and Canada, the Institute of Medicine has established in 2010 a RDA of 600 IU (15 μg) per day for adults and an Estimated Average Requirement of 400 IU (10 μg) per day [17]. In Spain, RDA is currently set at 200 IU (5 μg) per day [15,16], however European reference values are under revision. Present data show that mean vitamin D intake was lower than 5 μg (Table 2) and that the consumption

of the D-fortified dairy product improved vitamin D status. The amount of vitamin D added to the product was in line with the recent European Food Safety Authority report regarding claims of vitamin D on bone health maintenance [40]. Therefore, the promotion of this type of product may have beneficial health effects, as the Spanish population is not aware of the need for extra intake of this vitamin, even in the winter season.

It is notable that this slight but significant result is observed in healthy women. According to the Framingham Heart Study [41], the Adult Treatment Panel-III (ATP-III) [42], and the European Society of Cardiology [43] score charts, our volunteers were at very low coronary heart disease risk, as determined by a combination of the following parameters: blood pressure <120/<80 mmHg, T-chol <199 mg/dL and HDL-chol \geq 55 mg/dL, in addition to being non-smokers and non-diabetics.

Factors that could have affected the results were monitored. Thirty percent of the participants were using hormonal contraceptives during the study. Moller *et al.* [44] found, in a relative small sample of Danish women, that hormonal contraception was associated with higher concentrations of vitamin D metabolites. However, in the present study differences in 25OHD between users and non-users of hormonal contraceptives were not significant (data not shown), and participants did not change their use throughout the study; therefore this cannot be seen as a confounding factor.

The limitations of the study are the fact that women were healthy and all parameters were within normal limits, that only one level of fortification was studied and that the effects of fortified food was not compared to that of supplements. Further studies regarding the effects of pharmacological *versus* nutritional doses of vitamin D on cardiovascular risk are needed. Moreover, investigations should be performed on the metabolic effects of the consumption of vitamin D-fortified foods by vitamin D-deficient individuals, as well as by hypertensive, cardiovascular, and metabolic syndrome patients.

5. Conclusions

In conclusion, 25OHD is negatively associated with T-chol and LDL-chol in young menstruating women. Consumption of a dairy product fortified with vitamin D (5 μ g, 200 IU per day) did not change lipid levels, however, reduced slightly—but significantly—systolic and diastolic blood pressure in normotensive women with low iron stores.

Acknowledgments

This study was financed by Project AGL2009-11437. L. Toxqui and R. Blanco-Rojo received JAE pre-doctoral grants from the Spanish National Research Council (CSIC) and the European Social Fund. The authors are grateful to Jorge Parra for the lab assistance and to the volunteers who participated in the study.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jorde, R.; Grimnes, G. Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 303–312.
2. Bikle, D. Nonclassic actions of vitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 26–34.
3. Zhang, R.; Naughton, D.P. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr. J.* **2010**, *9*, 65.
4. Leu, M.; Giovannucci, E. Vitamin D: Epidemiology of cardiovascular risks and events. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *25*, 633–646.
5. Wang, T.J.; Pencina, M.J.; Booth, S.L.; Jacques, P.F.; Ingelsson, E.; Lanier, K.; Benjamin, E.J.; D'Agostino, R.B.; Wolf, M.; Vasan, R.S. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* **2008**, *117*, 503–511.
6. Saliba, W.; Barnett, O.; Rennert, H.S.; Rennert, G. The risk of all-cause mortality is inversely related to serum 25(OH)D levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 2792–2798.
7. Jorde, R.; Figenschau, Y.; Hutchinson, M.; Emaus, N.; Grimnes, G. High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, 1457–1464.
8. Melamed, M.L.; Michos, E.D.; Post, W.; Astor, B. 25-Hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch. Intern. Med.* **2008**, *168*, 1629–1637.
9. Vaidya, A.; Forman, J.P. Vitamin D and hypertension: Current evidence and future directions. *Hypertension* **2010**, *56*, 774–779.
10. Pittas, A.G.; Lau, J.; Hu, F.B.; Dawson-Hughes, B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 2017–2029.
11. Wang, H.; Xia, N.; Yang, Y.; Peng, D.Q. Influence of vitamin D supplementation on plasma lipid profiles: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis.* **2012**, *11*, 42.
12. Sim, J.J.; Lac, P.T.; Liu, I.L.; Meguerditchian, S.O.; Kumar, V.A.; Kujubu, D.A.; Rasgon, S.A. Vitamin D deficiency and anemia: A cross-sectional study. *Ann. Hematol.* **2010**, *89*, 447–452.
13. Wright, I.; Blanco-Rojo, R.; Fernandez, M.C.; Toxqui, L.; Moreno, G.; Perez-Granados, A.M.; de la Piedra, C.; Remacha, A.F.; Vaquero, M.P. Bone remodelling is reduced by recovery from iron-deficiency anaemia in premenopausal women. *J. Physiol. Biochem.* **2013**, *69*, 889–896.
14. Toxqui, L.; Perez-Granados, A.M.; Blanco-Rojo, R.; Wright, I.; Gonzalez-Vizcayno, C.; Vaquero, M.P. Effects of an iron or iron-vitamin D fortified flavored skimmed milk on iron metabolism: A randomized controlled double-blind trial in iron-deficient women. *J. Am. Coll. Nutr.* **2013**, *32*, 312–320.
15. FESNAD. Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la Población Española. *Act. Diet.* **2010**, *14*, 196–197 (in Spanish).
16. Cuervo, M.; Corbalan, M.; Baladia, E.; Cabrerizo, L.; Formiguera, X.; Iglesias, C.; Lorenzo, H.; Polanco, I.; Quiles, J.; Romero de Avila, M.D.; *et al.* Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr. Hosp.* **2009**, *24*, 384–414 (in Spanish).
17. Ross, A.C.; Taylor, C.L.; Yaktine, A.L.; Del Valle, H.B. *Dietary Reference Intakes for Calcium Vitamin D*; The National Academic Press: Washington, DC, USA, 2011.

18. González-Molero, I.; Morcillo, S.; Valdés, S.; Pérez-Valero, V.; Botas, P.; Delgado, E.; Hernández, D.; Oliveira, G.; Rojo, G.; Gutierrez-Repiso, C.; *et al.* Vitamin D deficiency in Spain: A population-based cohort study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2011**, *65*, 321–328.
19. Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 266–281.
20. Calvo, M.S.; Whiting, S.J. Survey of current vitamin D food fortification practices in the United States and Canada. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *136*, 211–213.
21. Schulz, K.F.; Altman, D.G.; Moher, D. CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Ann. Intern. Med.* **2010**, *152*, 726–732.
22. Institute of Medicine. Iron. In *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*; Institute of Medicine's Food and Nutrition Board, Ed.; National Academic Press: Washington, DC, USA, 2001; pp. 290–393.
23. Toxqui, L.; Perez-Granados, A.M.; Blanco-Rojo, R.; Wright, I.; de la Piedra, C.; Vaquero, M.P. Low iron status as a factor of increased bone resorption and effects of an iron and vitamin D-fortified skimmed milk on bone remodelling in young Spanish women. *Eur. J. Nutr.* 2013, in press.
24. Christakos, S.; Hewison, M.; Gardner, D.G.; Wagner, C.L.; Sergeev, I.N.; Rutten, E.; Pittas, A.G.; Boland, R.; Ferrucci, L.; Bikle, D.D. Vitamin D: Beyond bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1287*, 45–58.
25. George, P.S.; Pearson, E.R.; Witham, M.D. Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: A systematic review and meta-analysis. *Diabet. Med.* **2012**, *29*, e142–e150.
26. Gaddipati, V.C.; Bailey, B.A.; Kuriacose, R.; Copeland, R.J.; Manning, T.; Peiris, A.N. The relationship of vitamin D status to cardiovascular risk factors and amputation risk in veterans with peripheral arterial disease. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2011**, *12*, 58–61.
27. Karhapaa, P.; Pihlajamaki, J.; Porsti, I.; Kastarinen, M.; Mustonen, J.; Niemela, O.; Kuusisto, J. Diverse associations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D with dyslipidaemias. *J. Intern. Med.* **2010**, *268*, 604–610.
28. McLachlan, C.N. β -Casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med. Hypotheses* **2001**, *56*, 262–272.
29. Tailford, K.A.; Berry, C.L.; Thomas, A.C.; Campbell, J.H. A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis* **2003**, *170*, 13–19.
30. Giovannucci, E.; Liu, Y.; Hollis, B.W.; Rimm, E.B. 25-Hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: A prospective study. *Arch. Intern. Med.* **2008**, *168*, 1174–1180.
31. Delvin, E.E.; Lambert, M.; Levy, E.; O'Loughlin, J.; Mark, S.; Gray-Donald, K.; Paradis, G. Vitamin D status is modestly associated with glycemia and indicators of lipid metabolism in French-Canadian children and adolescents. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 987–991.
32. Ponda, M.P.; Dowd, K.; Finkelstein, D.; Holt, P.R.; Breslow, J.L. The short-term effects of vitamin D repletion on cholesterol: A randomized, placebo-controlled trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2510–2515.
33. Rice, B.H.; Cifelli, C.J.; Pikosky, M.A.; Miller, G.D. Dairy components and risk factors for cardiometabolic syndrome: Recent evidence and opportunities for future research. *Adv. Nutr.* **2011**, *2*, 396–407.

34. Wang, L.; Manson, J.E.; Buring, J.E.; Lee, I.M.; Sesso, H.D. Dietary intake of dairy products, calcium, and vitamin D and the risk of hypertension in middle-aged and older women. *Hypertension* **2008**, *51*, 1073–1079.
35. Alonso, A.; Beunza, J.J.; Delgado-Rodriguez, M.; Martinez, J.A.; Martinez-Gonzalez, M.A. Low-fat dairy consumption and reduced risk of hypertension: The Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 972–979.
36. He, J.; Wofford, M.R.; Reynolds, K.; Chen, J.; Chen, C.S.; Myers, L.; Minor, D.L.; Elmer, P.J.; Jones, D.W.; Whelton, P.K. Effect of dietary protein supplementation on blood pressure: A randomized, controlled trial. *Circulation* **2011**, *124*, 589–595.
37. Pal, S.; Ellis, V. The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals. *Obesity* **2010**, *18*, 1354–1359.
38. Li, Y.C. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 327–331.
39. Tomaschitz, A.; Pilz, S.; Ritz, E.; Grammer, T.; Drechsler, C.; Boehm, B.O.; Marz, W. Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 1354–1360.
40. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to vitamin D and maintenance of bone and teeth (ID 150, 151, 158), absorption and utilisation of calcium and phosphorus and maintenance of normal blood calcium concentrations (ID 152, 157), cell division (ID 153), and thyroid function (ID 156) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* **2009**, *7*, 1227.
41. Wilson, P.W.; D’Agostino, R.B.; Levy, D.; Belanger, A.M.; Silbershatz, H.; Kannel, W.B. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **1998**, *97*, 1837–1847.
42. National Heart Lung and Blood Institute. *Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*; National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA, 2002.
43. Perk, J.; de Backer, G.; Gohlke, H.; Graham, I.; Reiner, Z.; Verschuren, M.; Albus, C.; Benlian, P.; Boysen, G.; Cifkova, R.; *et al.* European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The fifth joint task force of the european society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 1635–1701.
44. Moller, U.K.; Streym, S.V.; Jensen, L.T.; Mosekilde, L.; Schoenmakers, I.; Nigdikar, S.; Rejnmark, L. Increased plasma concentrations of vitamin D metabolites and vitamin D binding protein in women using hormonal contraceptives: A cross-sectional study. *Nutrients* **2013**, *5*, 3470–3480.

Un cuestionario sencillo y práctico para estimar las pérdidas menstruales: relación con parámetros hematológicos y ginecológicos en mujeres jóvenes

BMC Women's Health (enviado)

Antecedentes: Las pérdidas menstruales han demostrado ser un factor importante que determina el estado de hierro, el rendimiento laboral y el bienestar general de las mujeres. Se han desarrollado varios métodos para estimar las pérdidas menstruales, sin embargo, el método estándar, tiene una aplicación limitada en la práctica clínica, por ser caro y porque requiere que las mujeres recolecten, almacenen y aporten los productos sanitarios empleados para su análisis. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un score para estimar las pérdidas menstruales (MBL-score) basado en un cuestionario, y validarlo a través de varios parámetros hematológicos y bioquímicos en mujeres en edad fértil. **Métodos:** Se reclutó un total de 164 mujeres jóvenes. Se analizaron parámetros hematológicos (hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, leucocitos y número de plaquetas) y bioquímicos (hierro, ferritina y transferrina séricos, y capacidad total del hierro para unirse a proteínas plasmáticas, TIBC). Se les pidió a las mujeres que completaran dos cuestionarios: el primero, para conocer sus características ginecológicas generales; y el segundo, diseñado para estimar las pérdidas menstruales, el cual, tenía que ser completado durante todos los períodos menstruales consecutivos de las mujeres en 16 semanas y daba información acerca de la duración de la menstruación, número de días de pérdidas de mayor intensidad y número y tipo de compresas y/o tampones usados en el día de mayor intensidad. Se calculó el MBL-score para cada período y mujer, y se estimó su reproducibilidad mediante el coeficiente de alpha de Cronbach. Se realizaron correlaciones lineales de Pearson entre los parámetros sanguíneos y el MBL-score. Además, se formaron dos grupos de acuerdo al MBL-score (grupo 1: bajas pérdidas menstruales y grupo 2: elevadas pérdidas menstruales). **Resultados:** Se observó un MBL-score significativamente mayor en las mujeres que dijeron tener antecedentes de anemia ($p=0.015$), manchar la cama por la noche durante la menstruación ($p<0.001$) y tener pérdidas intermenstruales ($p=0.044$) en comparación con aquellas que no mostraron dichas características. Las mujeres que empleaban anticonceptivos hormonales, presentaron también un menor MBL-score en comparación con las que no los empleaban ($p=0.004$). El MBL-score se asoció negativamente con el log-ferritina ($p=0.006$) y el número de plaquetas ($p=0.001$). Las mujeres del grupo 1 presentaron mayores concentraciones de ferritina y número de plaquetas

en comparación con las mujeres del grupo 2 ($p=0.002$ y $p=0.022$, respectivamente). **Conclusión:** Hemos desarrollado un método sencillo y práctico para estimar las pérdidas menstruales basado en un score calculado a partir de un cuestionario, en mujeres en edad fértil. El MBL-score, que es altamente reproducible y refleja las pérdidas menstruales, se validó con los parámetros hematológicos y bioquímicos.

Palabras clave: estimación de pérdidas menstruales; score; cuestionario ginecológico; mujeres jóvenes sanas; anemia ferropénica.

A simple and feasible questionnaire to estimate menstrual blood loss: relationship with hematological and gynecological parameters in young women

Laura Toxqui, Ana M Pérez-Granados, Ruth Blanco-Rojo, Ione Wright, M Pilar Vaquero*

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/José Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain.

laura.toxqui@ictan.csic.es

granados@ictan.csic.es

ruth.blanco@ictan.csic.es

ione.wright@ictan.csic.es

mpvaquero@ictan.csic.es

*Corresponding author: mpvaquero@ictan.csic.es

Abstract

Background: Menstrual blood loss (MBL) has been shown to be an important determinant in iron status, work performance and well being. Several methods have been developed to estimate MBL, the standard method however, has limited application in clinical practice as it is expensive and it requires women to collect, store and submit their entire sanitary products for analysis. We therefore aimed to develop a MBL-score based on a questionnaire, and to validate it by several hematological and biochemical parameters in women at childbearing age. **Methods:** A total of 164 healthy young women were recruited. Hematological (hematocrit, hemoglobin, erythrocyte, leucocyte and platelet counts) and iron status (serum iron, serum ferritin, serum transferrin, and total iron binding capacity) parameters were analyzed at screening. Women were asked to fulfill two gynecological questionnaires: general questionnaire, to inform about the volunteer's general menstrual characteristics; and MBL questionnaire, to inform on the duration of menstruation, number of heavy blood loss days, and number and type of pads and/or tampons used during the heaviest bleeding day, for all consecutive menstrual periods during 16 weeks. A MBL-score was calculated for each period and women, and its reliability determined by the Cronbach's alpha coefficient. Pearson's linear correlation tests were performed between blood parameters and the MBL-score. Two clusters were formed according the MBL-score (cluster 1: low MBL and cluster 2: high MBL). **Results:** Significant higher MBL-score was observed in women who reported to have history of anemia ($p=0.015$), to stain the bed at night during menstruation ($p<0.001$) and to have inter-menstrual blood loss ($p=0.044$), compared to those who did not. Women who used hormonal contraceptives presented lower MBL-score than the other ($p=0.004$). The MBL-score

was negatively associated with log-ferritin ($p=0.006$) and platelet count ($p=0.011$). Women in cluster 1 present higher ferritin and platelet count than women in cluster 2 ($p=0.002$ and $p=0.022$, respectively). **Conclusions:** We developed an easy and practical method for estimating menstrual blood loss based on a score calculated from a questionnaire in healthy women at childbearing age. The MBL-score is highly reliable and reflects menstrual blood loss validated by haematological and biochemical parameters.

Keywords: Menstrual blood loss estimation; score; gynecological questionnaire; healthy young women; iron deficiency anemia.

Background

During women's reproductive years, time between menarche and menopause, menstruation is a natural and physiological monthly process. However, abnormal changes in bleeding intensity, menorrhagia or intracycling bleeding, substantially decrease women's quality of life [1-3]. Menorrhagia, which is defined as an excessive uterine bleeding (<80 mL of blood loss per cycle) occurring at regular intervals, or prolonged uterine bleeding lasting more than seven days [4], is a common clinical problem among women of reproductive age and frequently results in anemia, impairing women's daily activities, and often managed by hysterectomy [5].

Iron deficiency anemia, the most common form of anemia all over the world [6], has complex etiology and is associated with many factors. Women at childbearing age constitute an important group of risk due to the additional iron demands of menstruation and pregnancy. It often occurs with the combination of low dietary iron intake or low bioavailability [7, 8].

As menstrual blood loss (MBL) has been shown to be an important determinant in iron status, work performance and well being [3, 9], it is important to find a precise and practical method for its measurement. Several methods for menstrual blood loss quantification have been developed: woman's self-estimate of menstrual loss, counting the number of days of menstruation, counting the number of sanitary products, weighing sanitary products, full blood count (based in hemoglobin levels), pictorial blood loss assessment, menstrual pictogram, and chemical analysis of the blood content of used sanitary products, also known as alkaline hematin method [2, 10, 11]. This method, considered the standard gold, was developed by Hallberg and Nilsson in 1964 and consists of extracting the heme from the used tampons and pads by sodium hydroxide and to convert it to alkaline hematine, which is later determined spectrophotometrically [12]. However, it has limited application in clinical practice as it is expensive and requires women to collect, store and submit their entire sanitary products for analysis, which may be burdensome and even unacceptable for some women [10]. Moreover, it has been suggested that up to 12% of menstrual blood could be loss extraneously and non-quantified [13].

Our research group has experience in studies with iron-deficient women and described that MBL, together with diet and genetics, is an important factor on iron deficiency etiology [14-16]. We therefore aimed to develop an easy and practical method for estimating menstrual blood loss based on a score calculated from a questionnaire and to validated it by several hematological and biochemical parameters in women at childbearing age.

Methods

Subjects

Volunteers were recruited by different announcements in press, university campus and web pages of Madrid. The study was also verbally promoted at public events.

Healthy women aged 18-35 years, Caucasian, non-smoker, non-pregnant, non-breastfeeding and non-anemic were recruited. Exclusion criteria were as follows: amenorrhea (lack of menstruation in the 3 months prior to the study), menopause, iron-metabolism-related diseases (iron deficiency anemia, thalassemia, hemochromatosis), chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn disease, gastric ulcers, celiac disease, hemorrhagic diseases, helicobacter pylori), renal disease or blood donor status.

This is part of a wider study comprising health questionnaires, genetic study and nutritional intervention. A total of 584 women contacted the research group to receive information and 289 underwent the screening. Women who did not meet the inclusion criteria or declined to participate were excluded and a total of 164 women agreed to participate, completed the study and were analyzed.

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain (#266, 23 May 2011). All subjects signed informed consent.

Gynecological questionnaires

Two questionnaires were used. The first one consisted of the volunteer's general menstrual characteristics: age at menarche, history of anemia, if they ever stain the bed at night during menstruation, if they ever had inter-menstrual blood loss and the use of any contraceptive method (type, duration and possible change of method in the previous 3 months and during the assay). Women completed this questionnaire at baseline and after 16 weeks in order to know possible changes on the general characteristics of the menstruation.

The second questionnaire was designed to estimate MBL, women were asked the exact date of beginning of menstruation, the duration of menstruation, as well as the number of heavy blood loss days. They were also asked the number and type of pads and/or tampons used during the day and night at the heaviest bleeding day (Figure 1). Women were instructed to fill out this questionnaire for all consecutive menstrual periods during 16 weeks and to do it immediately after using the sanitary products, never from memory.

To estimate the MBL of the volunteers, each kind of pads and tampons were assigned a relative absorbance number according to the manufacturers reported absorbency levels, and multiplied by the number of units used reported by each subject. The absorbance numbers were for pads: mini 1, normal, 1.5, super 2, night/superplus 3; and for tampons: mini 0.5, regular 1, super 1.5, superplus 3.

A score was then calculated taking into account the duration of menstruation, the number of heavy days and the estimated MBL, as follows: (number of heavy days / days of menstruation) x MBL. The score was calculated for each women and menstrual period.

Anthropometric determinations

All participants were instructed not to deviate from their regular habits and to maintain them during the assay. At baseline body weight was measured with a Seca scale (to a precision of 100g) and height was measured with a stadiometer incorporated into the scale. Body mass index (BMI) was calculated. In addition,

volunteers completed a general questionnaire every month in order to monitor possible health problems, medication use and changes in their normal routine.

2.4 Blood sampling and hematological and biochemical determinations

All volunteers attended the laboratory facilities at baseline. Blood samples were collected by venipuncture after a 12-h fasting period. Serum was obtained after centrifugation at 1000g for 15 minutes. Hematocrit, hemoglobin, and erythrocyte, leucocyte and platelet counts were determined using the Symex NE 9100 automated hematology analyzer (Symex, Kobe, Japan). Serum iron, serum ferritin and serum transferrin were determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyzer (Roche, Basel, Switzerland). Total iron binding capacity (TIBC) and transferrin saturation were calculated as follows: $TIBC (\mu\text{mol/L}) = 25,1 \times \text{transferrin (g/L)}$; $\text{transferrin saturation} = \text{serum iron } (\mu\text{mol/L}) / TIBC \times 100$.

All determinations were subjected to the ISO-9001-2000 requirements.

2.5 Statistical analysis

Data are presented as means with their standard deviations. A normal distribution of variables was determined by the Kolmogorov-Smirnov test and serum ferritin values were log transformed for statistical testing. Reliability of the MBL score was analyzed by the Cronbach's alpha coefficient. A value >0.70 is usually regarded as satisfactory and the nearest this coefficient is to 1 the more reliable it is [17]. ANOVA was applied to the mean MBL-score, in order to compare women who report history of anemia, to stain the bed at night during menstruation, inter-menstrual blood loss and the use of contraceptive method, with those women who did not. Pearson's linear correlation tests between MBL-score and hematological and biochemical parameters were performed. Women were grouped according to their MBL-score by means of k-means cluster analysis. Two clusters were formed and the independent sample t-test was used to determine any significant differences in blood parameters between the calculated clusters. A p value of <0.05 was considered significant. The IBM SPSS statistical package for Windows (version 20.0) was used to analyse the data.

Results

Baseline characteristics of the participating women are shown on Table 1. The Cronbach's alpha coefficient for the calculated MBL-score was 0.83.

A significantly higher MBL-score was observed in women who reported to have history of anemia ($p=0.015$), to stain the bed at night during menstruation ($p<0.001$) and to have inter-menstrual blood loss ($p=0.044$), compared to those who did not (Table 2).

None of the volunteers used intrauterine device as a contraceptive method and 30.5% of them were using hormonal contraceptives (24.4% contraceptive pills and 6.1% vaginal ring) during the study. It was observed that women who used hormonal contraceptive methods presented lower MBL-score than those who did not ($p=0.004$) (Table 2).

The MBL-score was negatively associated with log-ferritin ($p=0.006$) and platelet count ($p=0.011$). The correlations with the other hematological and biochemical parameters were not significant.

Cluster analysis of the MBL-score formed two different groups: cluster 1 (women with low MBL) and cluster 2 (women with high MBL). Serum ferritin and platelet count were significantly lower ($p=0.002$ and $p=0.022$, respectively) and mean platelet volume significantly higher ($p=0.006$) in cluster 2 respect to cluster 1. The other blood parameters were not significantly different between clusters.

Discussion

This study presents an easy and feasible method for estimating menstrual blood losses, based on a score calculated from a questionnaire which is clearly related to history of anemia, several gynecological parameters, hormonal contraceptive use, serum ferritin and platelets, in healthy young women.

The MBL-score is based on three items of the woman's menstrual period that are obtained from a questionnaire that is filled out during menstruation and not from memory. Moreover, the questionnaire was simple and women declared it was easy to complete. Methods based on questionnaires for assessing MBL are reported to be in agreement with the gold standard alkaline hematin method [11, 18]. Reliability of the MBL-score was good, according to the scale of Cronbach's alpha coefficients provided

by George and Mallery (2003)[19]:> 0.9, excellent; 0.8, good; > 0.7, acceptable, > 0.6, questionable; > 0.5, poor; and < 0.5, unacceptable.

Women who reported to have history of anemia, to stain the bed at night during menstruation or to have inter-menstrual blood loss, presented higher scores compared to women who reported not to have such problems. On the contrary, women who used hormonal contraceptives presented lower MBL-score than those who did not use them. These results support the reasonable accuracy of our score and are in agreement with the literature [20-22]. It was also obtained that the higher the MBL-score the lower the serum ferritin levels which confirms that menstrual bleeding is an important determinant of iron status in women at childbearing age[9]. In this regard, identifying women with high menstrual blood loss could be a key for strategies to prevent iron deficiency anemia[7].

Moreover, higher MBL-score was associated with lower platelet count and, according to cluster analysis, women in the high MBL cluster had higher platelet volume compared to those of the low MBL cluster. This is in agreement with few studies that have reported the combination of thrombocytopenia, heavy menstrual losses and iron deficiency [23, 24]. In contrast, iron deficiency anemia has been associated with high platelet count that recovers after managing iron deficiency [25, 26], this cannot be related to the present study since volunteers were healthy, non-anemic and all hematological and biochemical values including platelets were within normal ranges.

Therefore, we suggest that the MBL-scores of the present study should be considered as reference values of healthy young menstruating women. Range was between 0.5 and 10.6 and mean values were 2.4 and 6.0, for women with low and high MBL respectively, thus these results could be a starting point in the application of a MBL-score as a marker of risk of anemia or other related gynecological disorders associated to menses.

According to Munro [27], our group of women could be classified at normal limits of regularity, duration and frequency of menstrual periods when the 5th to 95th centiles are utilized. Menorrhagia was only observed in 6 women who reported a length of period >7 days. Because the classic definition of menorrhagia (<80 mL of blood loss per cycle) is rarely used clinically due to the difficult to measure menstrual blood loss [4], it could be of interest to apply our questionnaire in women with menorrhagia or other

health problems that could affect menstruation, such as malnutrition, anorexia or excessive exercise.

Conclusions

We developed an easy and practical method for estimating menstrual blood loss based on a score calculated from a questionnaire in healthy women at childbearing age. It is highly reliable and reflects menstrual blood loss validated by biochemical parameters.

Abbreviations

MBL: Menstrual Blood Loss; MCH: mean corpuscular hemoglobin; TIBC: total iron binding capacity.

Competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Authors' contributions

The authors' responsibilities were as follows: LT, RB-R, AMP-G and MPV contributed to the study design; and; LT, AMP-G and IW implemented the recruitment and contributed to the analytical determinations and data collection; LT and MPV contributed to the manuscript preparation; and MPV was the principal investigator of the study. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was financed by Project AGL2009-11437. L. Toxqui and R. Blanco-Rojo received JAE pre-doctoral grants from the CSIC and the European Social Fund. The authors are grateful to Laura Barrios for the statistical support and the volunteers who participated in the study.

References

1. Dasharathy SS, Mumford SL, Pollack AZ, Perkins NJ, Mattison DR, Wactawski-Wende J, Schisterman EF: **Menstrual bleeding patterns among regularly menstruating women.** *Am J Epidemiol* 2012, **175**(6):536-545.
2. Schumacher U, Schumacher J, Mellinger U, Gerlinger C, Wienke A, Endrikat J: **Estimation of menstrual blood loss volume based on menstrual diary and laboratory data.** *BMC Womens Health* 2012, **12**:24.
3. Copher R, Le Nestour E, Zampaglione E, Prezioso AN, Pocoski J, Law AW: **Heavy menstrual bleeding treatment patterns and associated health care utilization and costs.** *Journal of clinical outcomes management* 2012, **19**(9):402-413.
4. Apgar BS, Kaufman AH, George-Nwogu U, Kittendorf A: **Treatment of menorrhagia.** *Am Fam Physician* 2007, **75**(12):1813-1819.
5. Philipp CS, Dilley A, Miller CH, Evatt B, Baranwal A, Schwartz R, Bachmann G, Saidi P: **Platelet functional defects in women with unexplained menorrhagia.** *J Thromb Haemost* 2003, **1**(3):477-484.
6. World Health Organization (WHO): **Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005.** . Geneva, Switzerland: World Health Organization 2008.
7. Harvey LJ, Armah CN, Dainty JR, Foxall RJ, John Lewis D, Langford NJ, Fairweather-Tait SJ: **Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK.** *Br J Nutr* 2005, **94**(4):557-564.
8. Heath AL, Skeaff CM, Williams S, Gibson RS: **The role of blood loss and diet in the aetiology of mild iron deficiency in premenopausal adult New Zealand women.** *Public Health Nutr* 2001, **4**(2):197-206.
9. Hallberg L, Hulthen L, Bengtsson C, Lapidus L, Lindstedt G: **Iron balance in menstruating women.** *Eur J Clin Nutr* 1995, **49**(3):200-207.
10. The menorrhagia research group: **Quantification of menstrual blood loss.** *The obstetrician & gynaecologist* 2004, **6**:88-92.
11. Wyatt KM, Dimmock PW, Walker TJ, O'Brien PM: **Determination of total menstrual blood loss.** *Fertil Steril* 2001, **76**(1):125-131.
12. Hallberg L, Nilsson L: **Determination of Menstrual Blood Loss.** *Scand J Clin Lab Invest* 1964, **16**:244-248.
13. Hurskainen R, Teperi J, Turpeinen U, Grenman S, Kivela A, Kujansuu E, Vihko K, Yliskoski M, Paavonen J: **Combined laboratory and diary method for objective assessment of menstrual blood loss.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998, **77**(2):201-204.
14. Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, Buil A, Arroyo-Pardo E, Soria JM, Vaquero MP: **Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women.** *Nutr Metab (Lond)* 2011, **8**:69.
15. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP: **Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet.** *Journal of physiology and biochemistry* 2009, **65**(2):165-174.
16. Toxqui L, Perez-Granados AM, Blanco-Rojo R, Wright I, Gonzalez-Vizcayno C, Vaquero MP: **Effects of an iron or iron and vitamin d-fortified flavored skim milk on iron metabolism: a randomized controlled double-blind trial in iron-deficient women.** *Journal of the American College of Nutrition* 2013, **32**(5):312-320.
17. Streiner DL, Norman GR: **Health Measurement Scales: A practical guide to their development and use**, 4th. edn. New York: Oxford University Press; 2008.
18. Higham JM, O'Brien PM, Shaw RW: **Assessment of menstrual blood loss using a pictorial chart.** *Br J Obstet Gynaecol* 1990, **97**(8):734-739.

19. George D, Mallery P: **SPSS for Windows step by step: A simple guide and reference**, 4th. edn. Boston: Allyn & Bacon; 2003.
20. Callard GV, Litofsky FS, DeMerre LJ: **Menstruation in women with normal or artificially controlled cycles**. *Fertil Steril* 1966, **17**(5):684-688.
21. Greig AJ, Palmer MA, Chepulis LM: **Hormonal contraceptive practices in young Australian women (<= 25 years) and their possible impact on menstrual frequency and iron requirements**. *Sex Reprod Healthc* 2010, **1**(3):99-103.
22. Milman N, Clausen J, Byg KE: **Iron status in 268 Danish women aged 18-30 years: influence of menstruation, contraceptive method, and iron supplementation**. *Ann Hematol* 1998, **77**(1-2):13-19.
23. Berger M, Brass LF: **Severe thrombocytopenia in iron deficiency anemia**. *American journal of hematology* 1987, **24**(4):425-428.
24. Ibrahim R, Khan A, Raza S, Kafeel M, Dabas R, Haynes E, Gandhi A, Majumder OL, Zaman M: **Triad of iron deficiency anemia, severe thrombocytopenia and menorrhagia-a case report and literature review**. *Clin Med Insights Case Rep* 2012, **5**:23-27.
25. Alexander MB: **Iron deficiency anemia, thrombocytosis, and cerebrovascular accident**: *South Med J*. 1983, **76**(5):662-663.
26. Voudoukis E, Karmiris K, Oustamanolakis P, Theodoropoulou A, Sfiridaki A, Paspatis GA, Koutroubakis IE: **Association between thrombocytosis and iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease**. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013, **25**(10):1212-1216.
27. Munro MG: **Classification of menstrual bleeding disorders**. *Rev Endocr Metab Disord* 2012, **13**(4):225-234.

Figure 1. Gynecological questionnaire

Complete each time you have your period:

-Date of onset of menstruation (day/month/year): _____

-Days of menstruation: _____ days

-Number of heavy blood loss days during menstruation: _____ days

- Indicate the number and type of pads and/or tampons used at heaviest blood loss day of menstruation, both during the day and night:

| | Number of pads | | | | Number of tampons | | | |
|-------|----------------|--------|-------|----------------------|-------------------|--------|-------|----------------------|
| | Mini/salvaslip | Normal | Super | Night / superplus | Mini/salvaslip | Normal | Super | Night / superplus |
| Day | | | | | | | | |
| Night | | | | | | | | |

Table 1. Baseline characteristics of the women

| | Mean \pm SD (n=164) |
|--|--------------------------|
| Age (years) | 25.3 \pm 4.3 |
| Body Mass Index (kg/m ²) | 21.6 \pm 3.0 |
| Age at menarche (years) | 12.7 \pm 1.5 |
| Cycle length (days) | 30.2 \pm 5.0 |
| Length of period (days) | 5.0 \pm 1.2 |
| Number of heavy days | 1.9 \pm 0.8 |
| Menstrual blood loss (heavy days) | 8.6 \pm 3.5 |
| Total erythrocytes (x10 ⁻¹² /L) | 4.4 \pm 0.3 |
| Hematocrit (%) | 39.3 \pm 2.6 |
| Mean corpuscular volume (fL) | 90.4 \pm 4.3 |
| Red blood cell distribution width (%) | 13.8 \pm 0.9 |
| Hemoglobin (g/dL) | 13.3 \pm 0.8 |
| MCH (pg) | 30.5 \pm 1.7 |
| Serum iron (μ g/dL) | 90.0 \pm 41.3 |
| Serum ferritin (ng/mL) | 35.2 \pm 27.0 |
| Serum transferrin (mg/dL) | 291.1 \pm 57.0 |
| Transferrin saturation (%) | 23.1 \pm 12.1 |
| TIBC (μ mol/L) | 73.1 \pm 14.3 |
| Platelets (x10 ⁹ /L) | 221.0 \pm 44.2 |
| Mean platelet volume (fL) | 8.8 \pm 1.0 |
| Platelet distribution width (%) | 16.2 \pm 0.5 |
| Leucocytes (x10 ⁹ /L) | 6.6 \pm 1.5 |

MCH, mean corpuscular hemoglobin; TIBC, total iron binding capacity

Table 2. Menstrual blood loss score according gynecological parameters

| | MBL- score | <i>p</i> |
|--|---------------|----------|
| History of anemia | | |
| Yes (34%, n=56) | 4.0±2.0 | 0.015 |
| No | 3.2±1.9 | |
| Stain the bed at night during menstruation | | |
| Yes (29%, n=48) | 4.6±1.9 | <0.001 |
| No | 3.0±1.8 | |
| Inter-menstrual blood loss | | |
| Yes (8.5%, n=14) | 4.5±1.9 | 0.044 |
| No | 3.3±1.9 | |
| Hormonal contraceptive use | | |
| Yes (30.5%, n=50) | 2.8±1.7 | 0.004 |
| No | 3.7±2.0 | |

MBL, menstrual blood loss.

Percentage of women and n are indicated in parenthesis.

Values are expressed as mean ± SD. Significant differences between groups by ANOVA.

Table 3. Iron biomarkers according to cluster score

| | Cluster SCORE | | <i>p</i> |
|--|---------------------------|---------------------------|----------|
| | Low blood loss (n=117) | High blood loss (n=48) | |
| MBL-score | 2.4±0.9 (0.5 - 4.2) | 6.0±1.4 (4.3 - 10.6) | - |
| Total erythrocytes (x10 ⁻¹² /L) | 4,4±0,3 | 4,3±0,3 | NS |
| Hematocrit (%) | 39,4±2,6 | 39,0±2,4 | NS |
| Mean corpuscular volume (fL) | 90,6±4,2 | 90,0±4,6 | NS |
| Red blood cell distribution width (%) | 13,8±1,0 | 14,0±0,8 | NS |
| Hemoglobin (g/dL) | 13,3±0,9 | 13,1±0,8 | NS |
| MCH (pg) | 30,6±1,6 | 30,3±1,7 | NS |
| Serum iron (µg/dL) | 91,6±39,9 | 86,1±44,9 | NS |
| Serum ferritin (ng/mL) | 38,8±27,5 | 26,2±23,4 | 0.002 |
| Serum transferrin (mg/dL) | 291,6±57,9 | 289,8±55,1 | NS |
| Transferrin saturation (%) | 23,6±12,2 | 21,7±11,9 | NS |
| TIBC (µmol/L) | 73,2±14,5 | 72,8±13,9 | NS |
| Platelets (x10 ⁹ /L) | 226.0±44,8 | 208,5±40,6 | 0.022 |
| Mean platelet volume (fL) | 8.7±0.1 | 9.2±0.9 | 0.006 |
| Platelet distribution width (%) | 16.2±.4935 | 16.3±.5118 | NS |
| Leucocytes (x10 ⁹ /L) | 6.7±1.6 | 6.3±1.4 | NS |

Values are expressed as mean ± SD (range). Significant differences by independent t-test.

MCH, mean corpuscular hemoglobin; TIBC, total iron binding capacity

RESULTADOS NO PUBLICADOS

RESULTADOS NO PUBLICADOS

Estudio 5.

Relación entre la ingesta de determinados alimentos implicados en la biodisponibilidad del hierro y los almacenes férricos en mujeres en edad fértil.

Este estudio tuvo como objetivo valorar mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos la dieta habitual de un grupo de mujeres jóvenes, y la posible relación con el estado de hierro.

Se diseñó un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos para valorar el consumo de alimentos ricos en hierro, y de alimentos inhibidores y estimuladores de su absorción. En la Figura 1 se muestra el cuestionario de frecuencia de consumo empleado. Las voluntarias debían marcar una casilla de acuerdo a la frecuencia con la que consumían dichos alimentos únicamente en las comidas principales, excluyendo los consumidos entre horas, merienda y después de cenar, especificando en algunos casos si se consumían con el desayuno y/o la comida. Las opciones de frecuencia de consumo para marcar eran: nunca, menos de una vez a la semana, una vez a la semana, dos-tres veces a la semana, cuatro-seis veces a la semana, diariamente y más de una vez al día.

Para valorar la reproducibilidad de este cuestionario, se pidió a las voluntarias que lo completaran en 3 ocasiones, tiempos 0, 8 y 16 semanas.

Un total de 179 mujeres del grupo de intervención nutricional y del grupo de referencia, con criterios de inclusión y exclusión previamente descritos en el apartado 2.2 de la sección *Resumen de los estudios realizados y metodología empleada*, completaron el cuestionario.

Figura 1. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos empleado

Nombre: Fecha: Código:

*Referido al último mes. Sólo comidas principales (no entre horas ni merienda). Punto:

| ¿Con qué frecuencia consume...? | Nunca | Menos de 1 vez por semana | 1 vez por semana | 2-3 veces por semana | 4-6 veces por semana | 1 vez al día | Más de una vez al día |
|--|-----------------|---------------------------|------------------|----------------------|----------------------|--------------|-----------------------|
| Carnes rojas | | | | | | | |
| Carnes de pollo y aves | | | | | | | |
| Legumbres | | | | | | | |
| Pescados | | | | | | | |
| Ensaladas (lechuga, tomate etc.) | | | | | | | |
| Verduras y hortalizas (excepto patatas) | | | | | | | |
| Bebidas alcohólicas (vino, cerveza, licores) | | | | | | | |
| Refrescos | | | | | | | |
| Alimentos enriquecidos en fibra (cereales con fibra, galletas, etc.) | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Pan integral | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Frutas cítricas (naranja, mandarina etc.), kiwi y/o fresa | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Otras frutas (diferentes de las anteriores) | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Zumos de frutas | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Leche | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Otros lácteos (queso, yogur, postres lácteos, etc.) | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Embutidos, fiambre, morcilla | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Frutos secos | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |
| Té y/o café | Desayuno | | | | | | |
| | Comida y/o Cena | | | | | | |

Los valores de frecuencia obtenidos en el cuestionario se convirtieron en valores numéricos asociados al consumo de los alimentos por semana, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Conversión de frecuencias de consumo a valores numéricos

| Frecuencia | Valor numérico |
|---------------------------|----------------|
| Nunca | 0 |
| Menos de 1 vez por semana | 0.5 |
| 1 vez por semana | 1 |
| 2-3 veces por semana | 2.5 |
| 4-6 veces por semana | 5 |
| Diariamente | 7 |
| Más de una vez al día | 10 |

Se realizó inicialmente un estudio de normalidad de las distintas variables y se observó que no seguían una distribución normal. Por tanto, los análisis estadísticos se realizaron mediante pruebas no paramétricas: correlaciones de Spearman y test de comparaciones para muestras independientes (Kruskal Wallis).

La Tabla 2 muestra la media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo de la frecuencia de consumo de alimentos de las voluntarias de acuerdo a los valores numéricos obtenidos en el cuestionario.

Tabla 2. Valores numéricos de la frecuencia de consumo de alimentos (n=179).

| | Media | Mediana | SD | Mínimo | Máximo |
|--------------------------------|-------|---------|-----|--------|--------|
| Carnes rojas | 1.5 | 1.0 | 1.2 | 0 | 7 |
| Pollo y aves | 2.4 | 2.5 | 1.4 | 0 | 7 |
| Legumbres | 1.7 | 1.0 | 1.3 | 0 | 10 |
| Pescados | 1.8 | 1.0 | 1.4 | 0 | 7 |
| Ensaladas | 4.1 | 5.0 | 2.3 | 0 | 10 |
| Verduras y hortalizas | 4.0 | 2.5 | 2.6 | 0 | 10 |
| Bebidas alcohólicas | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 0 | 5 |
| Refrescos | 2.0 | 1.0 | 2.1 | 0 | 10 |
| Alim enriquecidos en fibra-D | 3.8 | 5.0 | 2.9 | 0 | 7 |
| Alim enriquecidos en fibra -CC | 1.3 | 0.5 | 2.2 | 0 | 10 |
| Pan integral - D | 1.6 | 0.0 | 2.6 | 0 | 7 |
| Pan integral - CC | 1.6 | 0.0 | 2.7 | 0 | 10 |
| Frutas cítricas etc - D | 1.8 | 0.5 | 2.6 | 0 | 7 |
| Frutas cítricas etc - CC | 2.9 | 2.5 | 2.6 | 0 | 10 |
| Otras frutas - D | 1.0 | 0.0 | 1.9 | 0 | 7 |
| Otras frutas - CC | 3.4 | 2.5 | 2.8 | 0 | 10 |
| Zumos de frutas - D | 2.0 | 0.5 | 2.5 | 0 | 7 |
| Zumos de frutas - CC | 0.9 | 0.0 | 1.9 | 0 | 10 |
| Leche - D | 5.9 | 7.0 | 2.2 | 0 | 7 |
| Leche - CC | 2.4 | 0.5 | 3.1 | 0 | 10 |
| Otros lácteos - D | 1.4 | 0.0 | 2.3 | 0 | 7 |
| Otros lácteos - CC | 4.6 | 5.0 | 2.9 | 0 | 10 |
| Embutidos - D | 0.5 | 0.0 | 1.4 | 0 | 7 |
| Embutidos - CC | 1.8 | 1.0 | 1.7 | 0 | 7 |
| Frutos secos - D | 0.4 | 0.0 | 1.1 | 0 | 7 |
| Frutos secos - CC | 1.0 | 0.5 | 1.4 | 0 | 10 |
| Te y o café - D | 3.8 | 5.0 | 3.3 | 0 | 7 |
| Te y o café - CC | 3.0 | 1.0 | 3.5 | 0 | 10 |

0, nunca; 0.5 menos de una vez por semana; 1, una vez por semana; 2.5, dos a tres veces por semana; 5, cuatro a seis veces por semana; 7, diario; 10, más de una vez al día; CC, comida y/o cena; D, desayuno; SD, desviación estándar.

Se realizó el test de correlación de Spearman entre la ferritina sérica y el índice de masa corporal y la frecuencia con la que las voluntarias consumían los alimentos (Tabla 3)

Tabla 3. Correlaciones entre la ferritina sérica y el IMC y las frecuencias de los alimentos consumidos (n=179)

| | Coefficiente de correlación | <i>p</i> |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------|
| IMC | .190 | 0.011 |
| Carnes rojas | .189* | .011 |
| Pollo y aves | .062 | NS |
| Legumbres | -.006 | NS |
| Pescados | .081 | NS |
| Ensaladas | -.058 | NS |
| Verduras y hortalizas | .011 | NS |
| Bebidas alcohólicas | .166 | .026 |
| Refrescos | .038 | NS |
| Alimentos enriquecidos en fibra - D | .036 | NS |
| Alimentos enriquecidos en fibra - CC | -.028 | NS |
| Pan integral - D | -.080 | NS |
| Pan integral - CC | -.136 | NS (0.070) |
| Frutas cítricas etc - D | -.031 | NS |
| Frutas cítricas etc - CC | -.148* | .049 |
| Otras frutas - D | -.030 | NS |
| Otras frutas - CC | -.081 | NS |
| Zumos de frutas - D | .105 | NS |
| Zumos de frutas - CC | -.025 | NS |
| Leche - D | .026 | NS |
| Leche - CC | -.070 | NS |
| Otros lácteos - D | -.118 | NS |
| Otros lácteos - CC | .001 | NS |
| Embutidos - D | -.010 | NS |
| Embutidos - CC | .088 | NS |
| Frutos secos - D | -.078 | NS |
| Frutos secos - CC | -.167* | .026 |
| Te y o café - D | .075 | NS |
| Te y o café - CC | -.025 | NS |

D, desayuno; CC, comida y/o cena.

Para conocer la posible relación entre el consumo de los alimentos y el estado de hierro, se formaron 3 grupos de acuerdo a los niveles de ferritina (principal biomarcador del estado de hierro) de las voluntarias: grupo 1, <15 ng/mL; grupo 2, 15.1-30 ng/mL; grupo 3, >30.1. Se utilizó el test estadístico de Kruskal Wallis para

comparar los tres grupos. Estos puntos se tomaron de las directrices de la OMS, las mujeres del grupo 1, estarían en una situación de deficiencia de hierro eritropoyética; las del grupo 2 en situación de deficiencia de hierro, con bajos almacenes férricos; mientras que las del grupo 3 tendrían suficientes reservas de hierro (Tabla 4).

Tabla 4. Características de las voluntarias de acuerdo a su estado de hierro

| | Grupo 1 n=37 | Grupo 2 n= 54 | Grupo 3 n= 88 | p |
|---|-----------------|------------------|------------------|--------|
| IMC | 20.9 ± 2.8 | 21.9 ± 3.3 | 22.0 ± 2.9 | NS |
| Ferritina (ng/ml)_BASAL | 10.2 ± 3.5 | 21.7 ± 4.5* | 60.7 ± 28.4*¶ | <0.001 |
| Hierro (mg/dl)_BASAL | 64.2 ± 36.3 | 92.8 ± 43.7* | 99.2 ± 34.2* | <0.001 |
| Transferrina (mg/dl)_BASAL | 337.9 ± 60.9 | 287.8 ± 47.7* | 267.9 ± 45.8* | <0.001 |
| Hemoglobina (g/dl)_BASAL | 12.7 ± 1.0 | 13.3 ± 0.8* | 13.5 ± 0.7* | <0.001 |
| Hematocrito (%)_BASAL | 37.8 ± 2.7 | 39.4 ± 2.5* | 40.0 ± 2.3* | <0.001 |
| VCM (fl.)_BASAL | 86.9 ± 4.9 | 90.8 ± 3.0* | 91.9 ± 3.6* | <0.001 |
| TIBC (mcmol/L)_BASAL | 84.8 ± 15.3 | 72.2 ± 12.0* | 67.2 ± 11.5* | <0.001 |
| Saturación de la transferrina (%)_BASAL | 14.0 ± 8.8 | 23.9 ± 13.5* | 26.8 ± 9.3* | <0.001 |

* diferente respecto a G1; ¶, diferente respecto a G2

Finalmente se aplicó un test de Kruskal Wallis para comprobar si existían diferencias significativas respecto a los grupos formados, que se muestra en la siguiente tabla (Tabla 5)

Tabla 5. Estudio comparativo del consumo de alimentos en los tres grupos

| | G1 (n=37) | | | G2 (n=54) | | | G3 (n=88) | | | |
|--------------------------------------|-----------|---------|-----|-----------|---------|------|-----------|---------|-----|-------|
| | Media | mediana | SD | Media | mediana | SD | Media | mediana | SD | |
| Carnes rojas | 1.2 | 1.0 | 1.0 | 1.4 | 1.0 | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.3 | 0.050 |
| Pollo y aves | 2.1 | 2.5 | 1.2 | 2.3 | 2.5 | 1.2 | 2.5 | 2.5 | 1.5 | |
| Legumbres | 1.6 | 1.0 | 0.9 | 1.7 | 1.0 | 1.2 | 1.8 | 1.0 | 1.5 | |
| Pescados | 1.6 | 1.0 | 1.2 | 1.7 | 1.0 | 1.4 | 2.0 | 1.0 | 1.5 | |
| Ensaladas | 4.3 | 5.0 | 2.6 | 4.0 | 5.0 | 2.3 | 4.1 | 5.0 | 2.2 | |
| Verduras y hortalizas | 3.9 | 2.5 | 2.6 | 4.1 | 2.5 | 2.8 | 4.1 | 5.0 | 2.6 | |
| Bebidas alcohólicas | 0.7 | 0.5 | 0.6 | 1.2 | 1.0 | 1.0 | 1.2 | 1.0 | 1.3 | 0.045 |
| Refrescos | 2.1 | 1.0 | 2.6 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.9 | 1.0 | 2.0 | |
| Alimentos enriquecidos en fibra - D | 3.7 | 5.0 | 2.9 | 3.7 | 5.0 | 3.1 | 3.9 | 5.0 | 2.9 | |
| Alimentos enriquecidos en fibra - CC | 1.9 | 0.5 | 2.8 | 1.1 | 0.5 | 2.0 | 1.2 | 0.5 | 1.9 | |
| Pan integral - D | 2.4 | 0.0 | 3.0 | 0.9 | 0.0 | 2.1 | 1.6 | 0.0 | 2.6 | |
| Pan integral - CC | 2.1 | 0.0 | 2.9 | 1.7 | 0.0 | 2.9 | 1.3 | 0.0 | 2.5 | |
| Frutas cítricas etc - D | 2.4 | 0.5 | 2.8 | 1.8 | 0.0 | 2.6 | 1.7 | 0.5 | 2.5 | |
| Frutas cítricas etc - CC | 3.4 | 2.5 | 2.8 | 2.6 | 2.5 | 2.1 | 3.0 | 2.5 | 2.9 | |
| Otras frutas - D | 1.3 | 0.0 | 2.2 | 0.8 | 0.0 | 1.6 | 1.0 | 0.0 | 1.9 | |
| Otras frutas - CC | 3.6 | 2.5 | 3.0 | 3.5 | 2.5 | 2.8 | 3.2 | 2.5 | 2.8 | |
| Zumos de frutas - D | 1.6 | 0.5 | 2.6 | 2.2 | 1.0 | 2.5* | 2.1 | 0.8 | 2.5 | 0.043 |
| Zumos de frutas - CC | 1.0 | 0.0 | 2.1 | 0.8 | 0.0 | 1.6 | 0.9 | 0.0 | 2.1 | |
| Leche - D | 5.5 | 7.0 | 2.5 | 6.0 | 7.0 | 2.2 | 5.9 | 7.0 | 2.2 | |
| Leche - CC | 2.6 | 0.5 | 3.5 | 2.5 | 0.5 | 3.1 | 2.2 | 0.5 | 3.0 | |
| Otros lácteos - D | 2.0 | 0.5 | 2.8 | 1.1 | 0.0 | 2.1 | 1.3 | 0.0 | 2.2 | |
| Otros lácteos - CC | 4.6 | 5.0 | 3.4 | 4.6 | 5.0 | 3.0 | 4.6 | 5.0 | 2.7 | |
| Embutidos - D | 0.4 | 0.0 | 1.4 | 0.5 | 0.0 | 1.4 | 0.5 | 0.0 | 1.4 | |
| Embutidos - CC | 1.5 | 1.0 | 1.7 | 2.1 | 2.5 | 1.9 | 1.8 | 1.0 | 1.7 | |
| Frutos secos - D | 0.4 | 0.0 | 1.3 | 0.4 | 0.0 | 1.1 | 0.3 | 0.0 | 1.1 | |
| Frutos secos - CC | 1.1 | 0.5 | 1.3 | 1.2 | 0.5 | 1.9 | 0.8 | 0.5 | 1.1 | |
| Te y o café - D | 3.6 | 5.0 | 3.2 | 3.4 | 2.5 | 3.3 | 4.0 | 7.0 | 3.3 | |
| Te y o café - CC | 3.4 | 2.5 | 3.4 | 2.5 | 0.5 | 3.1 | 3.1 | 1.0 | 3.7 | |

* p<0,05 respecto a G1. SD, desviación estándar.

Se observó que la reproducibilidad del cuestionario de frecuencia de consumo fue muy alta (correlación de Spearman, $p < 0.001$ para todas las variables), lo que indicaría una estabilidad en los hábitos alimentarios de estas voluntarias.

La Tabla 3 muestra la ingesta de los alimentos seleccionados en el cuestionario de frecuencia de consumo. El análisis de las correlaciones entre los valores de ferritina y el IMC y las frecuencias de los alimentos consumidos (tabla 4), revela que existe una asociación positiva entre el índice de masa corporal y los almacenes corporales de hierro. El IMC medio de estas mujeres jóvenes se encontraba en el rango normal, sin embargo 54 voluntarias presentaban $IMC < 20$, valor que corresponde al 30.1% de las participantes. Hay que tener en cuenta que este estudio se realizó fijando criterios de inclusión y exclusión relacionados con los parámetros del hierro, sin excluir personas por su IMC. En este sentido, es importante la promoción de estilos de vida saludable, incluyendo un adecuado peso corporal en lugar de incentivar el adelgazamiento, en esta población vulnerable.

Con respecto a los alimentos, existieron correlaciones positivas entre la ferritina y las carnes rojas y las bebidas alcohólicas. Estos resultados coinciden con la literatura, ya que la carne roja es una buena fuente de hierro total y hemo de alta biodisponibilidad (Navas-Carretero et al., 2009c). Por su parte, el alcohol consumido con las comidas principales, podría estar asociado a un incremento en la absorción del hierro, o bien, dicho consumo podría influir en el metabolismo hepático, incrementando la expresión de hepcidina y elevando la ferritina hepática, aunque esto no implica necesariamente que mejore el estado de hierro (Mazzanti et al., 1987; Harrison-Findik, 2007). Por otro lado, el consumo de frutas cítricas y frutos secos con la comida y/o cena se asoció negativamente con la ferritina. Es bien sabido que la fibra insoluble es un inhibidor de la biodisponibilidad del hierro, principalmente por su contenido en fitato, por lo que este componente en los frutos secos pudo haber jugado un papel determinante. En contra de lo esperado, el consumo de frutas cítricas, ricas en ácido ascórbico, con las comidas principales se relacionó negativamente con la ferritina. Para que el ácido ascórbico ejerza su acción estimuladora de la absorción del hierro debe ser consumido junto con alimentos ricos en hierro. Este resultado es difícil de interpretar; cuando se

estudió la posible asociación entre el consumo de los distintos alimentos, se encontró que la ingesta de frutas cítricas con la comida y/o cena se asoció positivamente con la ingesta en dichas comidas de legumbres, pescado, ensaladas, verduras y hortalizas, alimentos enriquecidos en fibra, otras frutas, (todos $p < 0.01$) y pan integral ($p < 0.05$). También se asoció este consumo positivamente con los frutos secos y la leche consumidos en el desayuno (ambos $p < 0.05$). También se observó que el consumo de frutas cítricas con las comidas principales se asoció negativamente con el de carnes rojas ($p < 0.05$). Sin embargo, cuando se comparó este consumo en los tres grupos de voluntarias clasificadas según su ferritina, no se encontraron diferencias significativas, como se muestra en la Tabla 3, que se describe a continuación.

En la Tabla 3 se muestran las características los tres grupos de jóvenes en función de su ferritina sérica. Como puede observarse, las voluntarias que presentaron niveles de ferritina inferiores a 15 ng/ml (Grupo 1), también mostraron valores inferiores de todos los demás parámetros del estado del hierro, significativamente respecto a los otros dos grupos. Aunque estas voluntarias no eran anémicas (hemoglobina > 12 g/dL), los valores de ferritina y saturación de la transferrina ($< 15\%$) indican una insuficiencia de para la eritropoyesis. Por su parte, los grupos 2 y 3 no mostraron diferencias significativas en ningún parámetro (salvo la ferritina). El estudio comparativo del consumo de alimentos de estos tres grupos, muestra diferencias significativas en las carnes rojas ($p = 0.05$), las bebidas alcohólicas (0.045) y los zumos de frutas consumidos en el desayuno (0.043). Para este último parámetro, los valores del grupo 2 fueron significativamente más altos que los del grupo 1 ($p < 0.05$).

De este estudio se puede concluir que el consumo de carne roja, rica en hierro de alta biodisponibilidad, es el principal factor dietético favorecedor de un mejor estado de hierro en este grupo de mujeres en jóvenes mientras que la ingesta de otros alimentos de origen animal, como carne blanca, embutidos, o pescados, no parece asociarse con el estado de hierro. Las bebidas alcohólicas, consumidas en las comidas principales parecen también constituir un factor de protección frente a la deficiencia de hierro. Sin embargo, en relación a las frutas cítricas y los zumos de frutas los resultados son contradictorios. Por lo tanto, este cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

específicamente diseñado para estimar la biodisponibilidad del hierro de la dieta, parece capaz de detectar los factores más determinantes pero podría optimizarse para recoger más precisamente la combinación habitual de alimentos en la misma comida.

Todo ello corrobora la complejidad de estudio de la dieta y que en la biodisponibilidad del hierro intervienen numerosos factores. Las pautas dietéticas para prevenir la deficiencia de hierro deben incluir indicaciones para conseguir una ingesta de suficiente cantidad de hierro, cierto aporte de hierro hemo, como el de la carne roja, y una adecuada combinación de alimentos, primando el consumo de estimulantes de la absorción junto con los alimentos que aportan una cantidad importante de hierro, y el consumo de inhibidores separado de las comidas principales.

DISCUSIÓN GENERAL

La deficiencia de hierro, que conduce a anemia ferropénica, es un problema de salud pública de dimensión mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y su prevención es una prioridad de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2008). Se trata de un problema multifactorial, y ocurre cuando la ingesta es insuficiente y/o de mala calidad o las pérdidas de hierro exceden a su aporte (Pasricha et al., 2010). Entre los grupos de riesgo destacan los niños y las mujeres en edad fértil, en los que claramente tiene un impacto en la calidad de vida y en el desarrollo de otras alteraciones metabólicas.

Otra deficiencia nutricional de alta prevalencia en el mundo es la de vitamina D (Holick, 2007), si bien esta deficiencia se minusvalora en España, probablemente porque se asume que tenemos una suficiente síntesis cutánea por la exposición solar. Diferentes datos apuntan a que existe una relación entre el metabolismo del hierro y el de la vitamina D. Por un lado, se han observado asociaciones positivas entre el marcador de estado de vitamina D (25OHD) y diversos marcadores hematológicos y bioquímicos del estado del hierro (Sim et al., 2010; Blanco-Rojo et al., 2013); y por otro, el hierro está implicado en la síntesis del colágeno, además de jugar un papel importante en su maduración (Tuderman et al., 1977), por lo que es imprescindible para la salud ósea.

La presente Tesis Doctoral se centra en estas dos deficiencias nutricionales, en su posible relación y en los efectos de una intervención nutricional con un alimento fortificado con hierro y vitamina D en un grupo de mujeres jóvenes.

En primer lugar, estudiamos las posibles asociaciones entre los biomarcadores del estado del hierro y los del metabolismo óseo. Hemos encontrado asociaciones negativas entre la ferritina sérica, principal marcador de los almacenes de hierro, y el marcador de resorción ósea (NTx); y entre la transferrina, transportador de hierro que aumenta en situaciones de deficiencia, y el marcador de formación ósea (P1NP). Además, respecto a mujeres de las mismas características sin deficiencia de hierro, el NTx era casi tres veces superior.

Estos resultados apoyan los obtenidos en un grupo de mujeres postmenopáusicas con osteoporosis, en las que se observó una asociación negativa entre la transferrina y la

densidad mineral ósea (D'Amelio et al., 2008). En la misma línea, nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente que la recuperación de la anemia ferropénica mediante tratamiento farmacológico en un grupo de mujeres en edad fértil, se acompañaba de disminución del remodelado óseo (Wright et al 2012). Por tanto, hemos postulado que un bajo estado de hierro es un factor que incrementa el remodelado óseo en mujeres jóvenes, lo que podría tener repercusiones a largo plazo y afectar su salud ósea.

Por otro lado, se ha estudiado la ingesta habitual de energía, nutrientes y alimentos de las mujeres participantes en función de su estado de hierro. Las voluntarias, que se reclutaron por tener unos almacenes bajos de hierro (ferritina sérica <30 ng/mL), presentaron una ingesta de hierro similar a las de edad equivalente pero con suficiencia de hierro. El análisis pormenorizado de la dieta indica que la ingesta de energía, macronutrientes y micronutrientes también era similar entre ambos grupos. Sin embargo, el consumo de carne roja resultó más alto en las mujeres con mejor estado de hierro, y existió una correlación positiva entre la frecuencia con que consumían este alimento y la ferritina sérica. En contra de lo esperado, el consumo de frutas cítricas, ricas en ácido ascórbico, con las comidas principales se relacionó negativamente con la ferritina, mientras que el de zumos de frutas en el desayuno se relacionó positivamente, siendo más alto en las mujeres con ferritina >15 ng/mL, lo que demuestra la complejidad de la dieta habitual y la dificultad en la valoración de la influencia de la combinación de alimentos en el estado del hierro. Por tanto, en las estrategias dietéticas que se empleen para prevenir la deficiencia de hierro deben incluirse pautas respecto a las cantidades y a la adecuada combinación de alimentos, además de recomendar tipos de alimentos que contienen hierro de alta biodisponibilidad.

En relación a la detección de riesgo de deficiencia de hierro y anemia ferropénica, a través de la evaluación de las pérdidas corporales de hierro en este grupo poblacional, se diseñó un cuestionario para estimar las pérdidas menstruales, a partir del cual se calculó un *score* (score de pérdidas menstruales, MBL-score). Se demostró la alta reproducibilidad del MBL-score y que reflejaba adecuadamente los parámetros

ginecológicos, antecedentes de anemia y marcadores del estado del hierro de las voluntarias. El MBL-score fue superior en aquellas mujeres que presentaban mayores pérdidas menstruales e inferiores almacenes corporales de hierro, medidos a través de la ferritina. Este cuestionario y el cálculo del MBL-score se proponen como un método objetivo estandarizado para su uso en clínica e investigación, ya que aporta rangos de normalidad, y podría utilizarse para identificar situaciones de riesgo de anemia por pérdidas menstruales excesivas y alertar sobre problemas ginecológicos.

Por otra parte, diversos autores han descrito que, mediante la dieta habitual, difícilmente se logran alcanzar los 18 mg/día de hierro de las ingestas recomendadas para este grupo de población (Navas Carretero 2009b; Tetens et al. 2007) y se propone el uso de alimentos fortificados como una estrategia más para prevenir la deficiencia de hierro. En esta línea, en la presente Tesis Doctoral, se realizó ensayo controlado aleatorizado para conocer la influencia del consumo, como parte de la dieta habitual, de un alimento fortificado con hierro y vitamina D o sólo con hierro, sobre el remodelado óseo, el estado del hierro, y saber si su consumo además, modificaba los lípidos séricos, la presión arterial y la glucosa. El alimento empleado fue una bebida láctea desnatada fortificada con pirofosfato férrico microencapsulado en liposomas (15 mg/día equivalente a 83.3 % IR); o también con vitamina D₃ (200 UI, 5 µg; 100% IR) y el diseño fue aleatorizado doble ciego en grupos paralelos de 16 semanas de duración. La sal de hierro elegida aparece en el listado de fortificantes minerales autorizados para su inclusión en alimentos, según reglamentación europea (Commission Regulation (EU) No 1161/2011). Además, se eligió la forma microencapsulada, porque se ha descrito que protege al hierro de posibles interferencias con otros componentes de la dieta que pueden inhibir su absorción a la vez de enmascarar el sabor metálico y proteger al alimento de la oxidación (Hurrell, 2002). A pesar de ello, se obtuvo que el consumo de las bebidas no mejoró el estado de hierro de las voluntarias.

Nuestro grupo de investigación recientemente ha demostrado la eficacia del consumo de un zumo fortificado con esta misma forma de hierro y con vitamina C, en un grupo de mujeres de características muy similares a las del ensayo actual, hallándose un

aumento de la ferritina desde el primer mes y alcanzándose un incremento de un 80 % tras 16 semanas de consumo, en comparación con el zumo placebo (Blanco-Rojo et al., 2011). Otros estudios han investigado la eficacia de productos fortificados en hierro en matrices lácteas. Se ha demostrado que fórmulas infantiles o productos lácteos enriquecidos con sulfato ferroso y vitaminas A, C, D y E, son efectivos en aumentar y mantener el estado de hierro en niños (Stekel et al., 1988; Maldonado Lozano et al., 2007; Szymlek-Gay et al., 2009). Nuestros resultados deben interpretarse teniendo en cuenta que en la matriz láctea no existieron potenciadores de la absorción del hierro, y que algunos componentes de la leche, como la caseína y el calcio, pudieron actuar como inhibidores. Además, este lácteo se consumió separado de otros alimentos, de lo que se deduce que la forma de hierro, aunque fue microencapsulada, no fue biodisponible.

Sin embargo, la fortificación con vitamina D (5 µg, 200 UI/día) condicionó una leve mejora en algunos parámetros hematológicos. El grupo de voluntarias que consumió la bebida fortificada con hierro y vitamina D presentó mayores concentraciones de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina en la semana 8, respecto a las mujeres que consumieron la bebida sólo con hierro. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores, en los que la suplementación con vitamina D (Aucella et al., 2003), o la inclusión del metabolito 1,25OHD, producen un incremento en la eritropoyesis (Alon et al., 2002) y estarían en la línea de los efectos pleiotrópicos de la vitamina D y su acción en el crecimiento y proliferación celular.

Respecto al metabolismo óseo, un hallazgo importante de la presente Tesis Doctoral fue que se encontró que las voluntarias, reclutadas de acuerdo a su estado de hierro, presentaban una alta prevalencia de deficiencia o insuficiencia de vitamina D. En este sentido, aunque concentraciones séricas de 25OHD por encima de 50 nmol/L (20 ng/mL) se consideran suficientes para cubrir los requerimientos del 97.5% de la población (Ross et al., 2011), existe controversia respecto a los valores adecuados para asegurar las funciones extra-esqueléticas de esta vitamina. Así, Holick y Chen (2008), establecieron tres límites para definir los estados de deficiencia (25OHD <50 nmol/L, <20 ng/mL), insuficiencia (51-74 nmol/L, 21-29 ng/mL) y suficiencia (>75 nmol/L, >30

ng/mL) de la vitamina D. De acuerdo con este criterio, aceptado internacionalmente, el 76 % de las voluntarias participantes en nuestro estudio presentaron deficiencia o insuficiencia de vitamina D. Estos valores son superiores a los descritos para población general española (Gonzalez-Molero et al., 2011) e inferiores a los encontrados previamente por nuestro grupo de investigación en mujeres con deficiencia de hierro (Blanco-Rojo et al. 2013), y han de interpretarse por la conjunción de varios factores. Por un lado, el análisis se efectuó en invierno (al inicio de la intervención nutricional) y por otro porque la ingesta dietética de vitamina D fue insuficiente, en parte quizá porque el riesgo de deficiencia se minusvalora en España, al ser un país mediterráneo, con muchas horas de luz solar y, porque la fortificación de los alimentos con vitamina D en España no es obligatoria, como es el caso de otros países, como por ejemplo Estados Unidos y Canadá.

La bebida láctea fortificada aportó 200 UI (5 µg) de colecalciferol, que junto con la ingesta de vitamina D estimada de la dieta habitual, supone un promedio aproximado de 300 UI (8 µg) diarios. Esta cantidad, consumida durante 16 semanas, fue capaz de aumentar el 25OHD hasta niveles cercanos a la concentración óptima (75 nmol/L, 30 ng/mL). En relación a los efectos en el hueso, se constató, de acuerdo con la literatura (Battault et al., 2013), una disminución de los marcadores P1NP y NTx es decir, una reducción del remodelado óseo en las mujeres de grupo que consumió el lácteo fortificado con la vitamina.

Recientemente se han descrito funciones beneficiosas de la vitamina D sobre el sistema cardiovascular, por lo que otro objetivo de la presente Tesis Doctoral fue conocer si existía una relación entre los lípidos séricos, la glucosa y la presión arterial y el estado de la vitamina D. Se encontró que el estado de la vitamina D se relacionaba inversamente con el T-chol y el LDL-chol de las mujeres participantes, lo que coincide con las asociaciones descritas en otros grupos poblacionales (Gaddipati et al., 2011; Karhapaa et al., 2010), pero existe gran controversia en este tema (Melamed et al., 2008; Jorde et al., 2010; Jorde y Grimnes, 2011), y aunque nuestros resultados reflejen que la deficiencia de vitamina D está asociada con mayores concentraciones de lípidos, ello no implica necesariamente causalidad. Por ello, en esta Tesis Doctoral también se

planteó conocer si el consumo de la bebida fortificada con vitamina D causaba cambios en estos marcadores de riesgo cardiovascular. En este sentido, la intervención nutricional con la bebida láctea sin vitamina D implicó una elevación de las concentraciones de LDL-chol, mientras que el consumo de la bebida que contenía la vitamina D tendió a reducirlas. Estos resultados se pueden atribuir, por un lado, a los efectos hipercolesterolémicos de la caseína de la leche, dado que la bebida era desnatada (McLachlan, 2001; Tailford et al., 2003), y también a que la vitamina D pudo haber contrarrestado dicho efecto. Sin embargo, no están de acuerdo con autores como Ponda et al. (2012), quienes al intentar corregir la deficiencia de vitamina D en adultos con alto riesgo cardiovascular, emplearon un suplemento semanal de 50.000 UI de la vitamina durante 8 semanas, obteniendo un incremento de las concentraciones de LDL-colesterol. Esta discrepancia nos hace pensar que la relación vitamina D-lípidos sigue una tendencia en forma de U y que los estudios controlados aleatorizados en los que obtienen resultados favorables con cantidades fisiológicas y alimentos fortificados, como el nuestro, pueden tener una importante aplicabilidad.

La intervención con la vitamina D, frente a su placebo, también ocasionó una disminución de la presión arterial sistólica y diastólica en estas mujeres. Se sabe que algunos nutrientes de la leche, como calcio, potasio, magnesio o determinadas fracciones proteicas, pueden tener un efecto protector contra la hipertensión (Alonso et al., 2005; Rice et al., 2011). Sin embargo, en las mujeres que tomaron la bebida placebo, la presión arterial no varió, por lo que la disminución de la presión sistólica y diastólica observada debe atribuirse exclusivamente a la vitamina D. Es notable que estos cambios se hayan observado en mujeres sanas sin riesgo cardiovascular y apuntan a una acción muy específica de los metabolitos de la vitamina D en el eje renina-angiotensina-aldosterona sobre la que conviene profundizar, realizando nuevas investigaciones en población con riesgo cardiovascular o hipertensión moderada.

Por último hemos de indicar que todos los resultados obtenidos de la presente Tesis Doctoral son de gran interés y aplicabilidad en el campo de la nutrición, de la fortificación de alimentos y de la salud pública. Nuestros resultados demuestran que el alimento en el que se incluye el fortificante de hierro juega un factor fundamental y

que los efectos beneficiosos atribuidos a la vitamina D ocurren también cuando se suplementa a dosis fisiológicas en personas sanas. Por tanto, se abren nuevas perspectivas para que, mediante la nutrición, se logren prevenir enfermedades de gran importancia y prevalencia a nivel mundial como las deficiencias de hierro y de vitamina D, la osteoporosis, la anemia ferropénica y las enfermedades cardiovasculares.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

PRIMERA. El estudio de la asociación entre el metabolismo del hierro y el metabolismo óseo en mujeres jóvenes, muestra que la deficiencia de hierro está relacionada con un remodelado óseo incrementado, y que las mujeres con bajos almacenes de hierro presentan una resorción ósea marcadamente superior a las que tienen un estado de hierro adecuado. Por lo tanto, la deficiencia de hierro constituye un factor que incrementa la resorción ósea, lo que puede tener repercusiones a largo plazo en la salud ósea e incrementar el riesgo de osteoporosis.

SEGUNDA. El consumo de una bebida láctea desnatada fortificada con hierro y vitamina D, respecto a la misma sólo con hierro, incrementa los niveles de 25-hidroxivitamina D y disminuye el remodelado óseo (marcadores de formación, P1NP, y resorción, NTx, ósea) en las mujeres con predisposición a anemia ferropénica.

TERCERA. El consumo de las bebidas fortificadas con pirofosfato férrico microencapsulado en liposomas no mejora el estado del hierro en mujeres con ferropenia moderada, debido a que esta forma de hierro adicionada a una matriz láctea no resulta biodisponible, lo que indica que este fortificante es susceptible a la acción de los inhibidores de la absorción del hierro.

CUARTA. Existe una relación inversa entre las concentraciones séricas de 25-hidroxivitamina D y el colesterol total y el LDL-colesterol en mujeres jóvenes. La intervención con el producto lácteo desnatado incrementa el LDL-colesterol, efecto que se neutraliza por la presencia de vitamina D. Además, aunque la vitamina D no modifica la glucosa ni los lípidos séricos en este colectivo de mujeres sanas, produce una disminución de la presión arterial sistólica y diastólica dentro de los rangos de normalidad.

QUINTA. Se ha obtenido un score de pérdidas menstruales procedente de un cuestionario simple y práctico que se ha validado mediante diversos parámetros ginecológicos (antecedentes de anemia, uso de anticonceptivos hormonales y pérdidas intermenstruales), y también mediante parámetros hematológicos (ferritina, tamaño y concentración de plaquetas), por lo que se propone como referencia para su uso en mujeres en edad fértil.

SEXTA. El estudio de la relación de la ingesta dietética, valorada mediante un cuestionario específico de frecuencia de consumo de alimentos, indica que la carne roja, rica en hierro de alta biodisponibilidad, consumida con las comidas principales, es el principal factor dietético favorecedor del estado de hierro en este grupo de mujeres jóvenes.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, et al. (2010). Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet.* 19(13): 2739-2745.
- Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Meyer MB, Pike JW, Christakos S (2010). Evidence for a role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D(3) 1 α hydroxylase gene by prolactin. *Endocrinology.* 151(7): 2974-2984.
- Alexander D, Ball MJ, Mann J (1994). Nutrient intake and haematological status of vegetarians and age-sex matched omnivores. *Eur J Clin Nutr.* 48(8): 538-546.
- Alon DB, Chaimovitz C, Dvilansky A, Lugassy G, Douvdevani A, Shany S, et al. (2002). Novel role of 1,25(OH)(2)D(3) in induction of erythroid progenitor cell proliferation. *Exp Hematol.* 30(5): 403-409.
- Alonso A, Beunza JJ, Delgado-Rodriguez M, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA (2005). Low-fat dairy consumption and reduced risk of hypertension: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *Am J Clin Nutr.* 82(5):972-979.
- Alvarez L, Peris P, Eds. (2002). *Marcadores bioquímicos del remodelado óseo.* Barcelona, Roche Diagnostics S.L.
- Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM (2007). Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals.* 20(3-4): 665-674.
- Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD (2009). Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol.* 25(2): 129-135.
- Anderson GJ, Vulpe CD (2010). The cellular physiology of iron. Iron deficiency and overload. From basic biology to clinical medicine. S. Yehuda, D. I. Mostofsky, Human press: 3-29.
- Anderson PH, Atkins GJ, Turner AG, Kogawa M, Findlay DM, Morris HA (2011). Vitamin D metabolism within bone cells: effects on bone structure and strength. *Mol Cell Endocrinol.* 347(1-2): 42-47.
- Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA (2004). Determinants of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D3 levels: the role of renal synthesis and catabolism of vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90(1-5): 111-113.
- Antharam V, Collingwood JF, Bullivant JP, Davidson MR, Chandra S, Mikhaylova A, et al. (2012). High field magnetic resonance microscopy of the human hippocampus in Alzheimer's disease: quantitative imaging and correlation with iron. *Neuroimage.* 59(2): 1249-1260.

- Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arija V (2010). Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol.* 89(8): 767-773.
- Armas LA, Hollis BW, Heaney RP (2004). Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(11): 5387-5391.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P (2009). Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta.* 1790(7): 589-599.
- Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, et al. (2007). Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone.* 40(6): 1517-1528.
- Aucella F, Scalzulli RP, Gatta G, Vigilante M, Carella AM, Stallone C (2003). Calcitriol increases burst-forming unit-erythroid proliferation in chronic renal failure. A synergistic effect with r-HuEpo. *Nephron Clin Pract.* 95(4): c121-127.
- Awad MO, Barford AV, Grindulis KA, Montgomery RD, Sammons HG (1982). Factors affecting the serum iron-binding capacity in the elderly. *Gerontology.* 28(2): 125-131.
- Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 38(5): 531-539.
- Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM (2013). Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr.* 52(2): 429-441.
- Benyamin B, McRae AF, Zhu G, Gordon S, Henders AK, Palotie A, et al. (2009). Variants in TF and HFE explain approximately 40% of genetic variation in serum-transferrin levels. *Am J Hum Genet.* 84(1): 60-65.
- Bertoncini S, Blanco-Rojo R, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP, Lopez-Parra AM (2011). A novel SNaPshot assay to detect genetic mutations related to iron metabolism. *Genet Test Mol Biomarkers.* 15(3): 173-179.
- Besarab A, Amin N, Ahsan M, Vogel SE, Zazuwa G, Frinak S, et al. (2000). Optimization of epoetin therapy with intravenous iron therapy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 11(3): 530-538.
- Beutler E, Waalen J (2006). The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood.* 107(5): 1747-1750.
- Bikle D (2009). Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(1): 26-34.
- Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG (1985). Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 61(5): 969-975.

- Black LJ, Seamans KM, Cashman KD, Kiely M (2012). An updated systematic review and meta-analysis of the efficacy of vitamin D food fortification. *J Nutr.* 142(6): 1102-1108.
- Blachier F, Vaugelade P, Robert V, Kibangou B, Canonne-Hergaux F, Delpal S, et al. (2007). Comparative capacities of the pig colon and duodenum for luminal iron absorption. *Can J Physiol Pharmacol.* 85(2): 185-192.
- Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, et al. (2011). Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. *Nutr Metab (Lond).* 8: 69.
- Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP (2011). Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr.* 105(11): 1652-1659.
- Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Zazo P, de la Piedra C, Vaquero MP (2013). Relationship between vitamin D deficiency, bone remodelling and iron status in iron-deficient young women consuming an iron-fortified food. *Eur J Nutr.* 52(2): 695-703.
- Bleackley MR, Wong AY, Hudson DM, Wu CH, Macgillivray RT (2009). Blood iron homeostasis: newly discovered proteins and iron imbalance. *Transfus Med Rev.* 23(2): 103-123.
- Borel MJ, Smith SM, Derr J, Beard JL (1991). Day-to-day variation in iron-status indices in healthy men and women. *Am J Clin Nutr.* 54(4): 729-735.
- Borradale D, Kimlin M (2009). Vitamin D in health and disease: an insight into traditional functions and new roles for the 'sunshine vitamin'. *Nutr Res Rev.* 22(2): 118-136.
- Bothwell TH, Charlton RW (1981). Assessment of the iron nutritional status of a population. *Prog Clin Biol Res.* 77: 311-321.
- Bouvard B, Annweiler C, Salle A, Beauchet O, Chappard D, Audran M, et al. (2011). Extraskeletal effects of vitamin D: facts, uncertainties, and controversies. *Joint Bone Spine.* 78(1): 10-16.
- Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong le T (2012). The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest.* 42(12): 1332-1341.
- Boyce BF, Xing L (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 473(2): 139-146.

- Cade JE, Moreton JA, O'Hara B, Greenwood DC, Moor J, Burley VJ, et al. (2005). Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 82(4): 813-820.
- Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN (2005). Vitamin D intake: a global perspective of current status. *J Nutr.* 135(2): 310-316.
- Callard GV, Litofsky FS, DeMerre LJ (1966). Menstruation in women with normal or artificially controlled cycles. *Fertil Steril.* 17(5): 684-688.
- Carbajal A (2003). Ingestas recomendadas de energía y nutrientes. *Nutrición y dietética*. M. T. García-Arias, M. C. García-Fernández. León, España, Publicaciones y Medios Audiovisuales. Universidad de León: 22-44.
- Centers for Disease Control (1999). Safer and healthier foods. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 48(40): 905-913.
- Centers for Disease Control and Prevention (1989). Adjustments of haemoglobin and haematocrit cutoffs for altitude and smoking. *Morbidity mortality weekly report.* 38: 402-404.
- Centers for Disease Control and Prevention (1998). Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. *MMWR Recomm Rep.* 47(RR-3): 1-29.
- Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF (1982). Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet.* 1(8263): 74-76.
- Collins JF, Anderson G.J (2012). Intestinal iron absorption. *Physiology of the gastrointestinal tract*. L. R. Johnson, F. K. Ghishan, J. D. Kaunitz et al. New York, Elsevier Inc: 1921-2947.
- Commission of the European Communities (1993). *Nutrient and Energy Intakes for the European Community. Reports of the Scientific Committee for Food (Thirty-first series)*. Luxembourg.
- Commission Regulation (EU) No 1161/2011 Commission Regulation (EU) No 1161/2011 of 14 November 2011 amending Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council, Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 953/2009 as regards the lists of mineral substances that can be added to foods. *Official Journal of the European Union.* L296. : 29-34.
- Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium of the Institute of Medicine (2011). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington (DC) The National Academies Press.
- Conrad ME, Umbreit JN (1993). A concise review: iron absorption--the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am J Hematol.* 42(1): 67-73.

- Conrad ME, Umbreit JN (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis.* 29(3): 336-355.
- Cook J (1999). The nutritional assessment of iron status. *Arch Latinoam Nutr.* 49(3 Suppl 2): 11S-14S.
- Cook JD (2005). Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 18(2): 319-332.
- Cook JD, Reddy MB (2001). Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr.* 73(1): 93-98.
- Cook JD, Reddy MB, Hurrell RF (1995). The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 61(4): 800-804.
- Cook JD, Reusser ME (1983). Iron fortification: an update. *Am J Clin Nutr.* 38(4): 648-659.
- Cuervo M, Corbalan M, Baladia E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C, Lorenzo H, Polanco I, Quiles J, Romero de Avila MD, Russolillo G, Villarino A, Martinez JA (2009). Comparativa de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) de los diferentes países de la Unión Europea, de Estados Unidos (EEUU) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS). *Nutr Hosp.* 24(4): 384-414
- Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ (2012). Vitamin D: metabolism. *Rheum Dis Clin North Am.* 38(1): 1-11, vii.
- D'Amelio P, Cristofaro MA, et al. (2008). Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone.* 43(6):1010-1015.
- Davila-Hicks P, Theil EC, Lonnerdal B (2004). Iron in ferritin or in salts (ferrous sulfate) is equally bioavailable in nonanemic women. *Am J Clin Nutr.* 80(4): 936-940.
- De Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, Hautvast JG (1996). Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA Study. *Eur J Clin Nutr.* 50(Suppl 2):S123-4.
- De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal.* 20(4): 292-302.
- DeLuca HF (1976). Metabolism of vitamin D: current status. *Am J Clin Nutr.* 29(11): 1258-1270.
- DeLuca HF (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 80(6 Suppl): 1689S-1696S.
- Diaz-Castro J, Alferez MJ, Lopez-Aliaga I, Nestares T, Granados S, Barrionuevo M, et al. (2008). Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition.* 24(11-12): 1167-1173.

- Diaz-Castro J, Lopez-Frias MR, Campos MS, Lopez-Frias M, Alferez MJ, Nestares T, et al. (2012). Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats. *Eur J Nutr.* 51(2): 241-247.
- Dong Q, Miller WL (2004). Vitamin D 25-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 83(1-2): 197-198.
- Douglas FW, Rainey NH, Wong NP, Edmondson LF, LaCroix DE (1981). Color, Flavor, and Iron Bioavailability in Iron-Fortified Chocolate Milk. *Journal of Dairy Science.* 64(9): 1785-1793.
- Dugdale AE (2006). Predicting iron and folate deficiency anaemias from standard blood testing: the mechanism and implications for clinical medicine and public health in developing countries. *Theor Biol Med Model.* 3: 34.
- Elzik ME, Dirschl DR, Dahners LE (2006). Correlation of transfusion volume to change in hematocrit. *Am J Hematol.* 81(2): 145-146.
- Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB (1992). Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci.* 17(3): 119-123.
- European Food Safety Authority, EFSA (2006). "Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals." Retrieved sept 30, 2013, from <http://www.efsa.europa.eu/en/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf>.
- EFSA Panel on dietetic products, nutrition and allergies (2011). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to vitamin D and risk of falling pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal.* 9(9):2382
- EFSA Panel on dietetic products, nutrition and allergies (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to vitamin D and normal function of the immune system and inflammatory response (ID 154, 159), maintenance of normal muscle function (ID 155) and maintenance of normal cardiovascular function (ID 159) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal.* 8(2):1468
- Fairweather-Tait SJ, Harvey L, Heath AL, Roe M (2007). Effect of SNPs on iron metabolism. *Genes Nutr.* 2(1): 15-19.
- Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). (2010). *Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española.* Ed. EUNSA. Pamplona.
- Fiel MI, Schiano T (2009). A woman with chronic anemia and cholestatic liver disease. *Hepatology.* 49(4): 1390-1391.
- Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ (2012). Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol.* 26(2-3): 115-119.

- Gaddipati VC, Bailey BA, Kuriacose R, Copeland RJ, Manning T, Peiris AN (2011). The relationship of vitamin D status to cardiovascular risk factors and amputation risk in veterans with peripheral arterial disease. *J Am Med Dir Assoc.* 12(1): 58-61.
- Gallagher JC, Sai AJ (2010). Vitamin D insufficiency, deficiency, and bone health. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(6): 2630-2633.
- Ganz T (2005). Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol.* 18(2): 171-182.
- Ganz T (2008). Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab.* 7(4): 288-290.
- Ganz T (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood.* 117(17): 4425-4433.
- Garrick MD, Garrick LM (2009). Cellular iron transport. *Biochim Biophys Acta.* 1790(5): 309-325.
- Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel HD, Bents K, Veltkamp C, et al. (2003). Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood.* 102(1): 371-376.
- Goddard AF, McIntyre AS, Scott BB (2000). Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *British Society of Gastroenterology. Gut.* 46 Suppl 3-4: IV1-IV5.
- González-Molero I, Morcillo S, et al. (2011). Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr.* 65(3): 321-328.
- Grandjean P, Lintrup J (1978). Erythrocyte-Zn-protoporphyrin as an indicator of lead exposure. *Scand J Clin Lab Invest.* 38(7): 669-675.
- Greig AJ, Palmer MA, Chepulis LM (2010). Hormonal contraceptive practices in young Australian women (</= 25 years) and their possible impact on menstrual frequency and iron requirements. *Sex Reprod Healthc.* 1(3): 99-103.
- Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C (1992). Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med.* 7(2): 145-153.
- Haines ST, Park SK (2012). Vitamin D supplementation: what's known, what to do, and what's needed. *Pharmacotherapy.* 32(4): 354-382.
- Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hulten L (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 53(1): 112-119.
- Hallberg L, Brune M, Rossander L (1989). Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am J Clin Nutr.* 49(1): 140-144.
- Hallberg L, Hogdahl AM, Nilsson L, Rybo G (1966). Menstrual blood loss--a population study. Variation at different ages and attempts to define normality. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 45(3): 320-351.

- Han O (2011). Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics*. 3(2): 103-109.
- Hansen TM, Hansen NE (1986). Serum ferritin as indicator of iron responsive anaemia in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 45(7): 596-602.
- Hare D, Ayton S, Bush A, Lei P (2013). A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. *Front Aging Neurosci*. 5: 34.
- Harris MM, Houtkooper LB, Stanford VA, Parkhill C, Weber JL, Flint-Wagner H, et al. (2003). Dietary iron is associated with bone mineral density in healthy postmenopausal women. *J Nutr*. 133(11): 3598-3602.
- Harrison-Findik DD (2007). Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J Gastroenterol*. 13(37):4925-4930.
- Harvey LJ, Berti C, Casgrain A, Cetin I, Collings R, Gurinovic M, et al. (2013). EURRECA- Estimating Iron Requirements for Deriving Dietary Reference Values. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 53(10): 1064-1076.
- Heaney RP (2004). Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr*. 80(6 Suppl): 1706S-1709S.
- Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A (2003). Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr*. 22(2): 142-146.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 117(3): 285-297.
- Holick MF (2006). Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 116(8): 2062-2072.
- Holick MF (2007). Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis. *Drugs Aging*. 24(12): 1017-1029.
- Holick MF (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 357(3): 266-281.
- Holick MF (2010). Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 39(2): 381-400, table of contents.
- Holick MF (2012). The D-lightful vitamin D for child health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 36(1 Suppl): 9S-19S.
- Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. (2008). Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 93(3): 677-681.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 96(7): 1911-1930.

- Holick MF, Chen TC (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 87(4): 1080S-1086S.
- Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E (2007). Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res.* 22 Suppl 2: V28-33.
- Holick MF, DeLuca HF (1974). Vitamin D metabolism. *Annu Rev Med.* 25: 349-367.
- Hurrell F (1984). Bioavailability of different iron compounds to fortify formulas and cereals: technological problems. *Iron nutrition in infancy and childhood.* A. Steckel. New York, Raven Press.
- Hurrell F (1999). Iron. The mineral fortification of foods. F. Hurrell. Surrey, Leatherhead Food RA, Leatherhead Publishing: 54 –93.
- Hurrell R (2002). How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutr Rev.* 60(7 Pt 2): S7-15; discussion S43.
- Hurrell R, Egli I (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr.* 91(5): 1461S-1467S.
- Hurrell RF (2002). Fortification: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr.* 132(4 Suppl): 806S-812S.
- Hurrell RF, Furniss DE, Burri J, Whittaker P, Lynch SR, Cook JD (1989). Iron fortification of infant cereals: a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrous succinate. *Am J Clin Nutr.* 49(6): 1274-1282.
- Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 56(3): 573-578.
- Hurrell RF, Reddy M, Cook JD (1999). Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr.* 81(4): 289-295.
- Hutchinson C, Conway RE, Bomford A, Hider RC, Powell JJ, Geissler CA (2008). Postprandial iron absorption in humans: comparison between HFE genotypes and iron deficiency anaemia. *Clin Nutr.* 27(2): 258-263.
- Institute of Medicine (1997). Vitamin D. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food and Nutrition Board. Washington, National Academy Press.
- Institute of Medicine (2001). Iron. Reference Dietary Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Food and Nutrition Board. Washington, National Academy Press.
- Institute of Medicine (2011). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Washington, National Academy Press.

- International Nutritional Anemia Consultative Group (1993). Iron EDTA for Food Fortification. Washington, DC.
- Johnson-Spear MA, Yip R (1994). Hemoglobin difference between black and white women with comparable iron status: justification for race-specific anemia criteria. *Am J Clin Nutr.* 60(1): 117-121.
- Jones G, Prosser DE, Kaufmann M (2012). 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys.* 523(1): 9-18.
- Jorde R, Figenschau Y, Hutchinson M, Emaus N, Grimnes G (2010). High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile. *Eur J Clin Nutr.* 64(12): 1457-1464.
- Jorde R, Grimnes G (2011). Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog Lipid Res.* 50(4): 303-312.
- Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY, et al. (2013). European Guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 24(1): 399-428.
- Karhapaa P, Pihlajamaki J, Porsti I, Kastarinen M, Mustonen J, Niemela O, Kuusisto J (2010). Diverse associations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D with dyslipidaemias. *J Intern Med.* 268(6): 604-610.
- Kasvosve I, Delanghe J (2002). Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clin Chem Lab Med.* 40(10): 1014-1018.
- Katsumata S, Katsumata-Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2009). Severe iron deficiency decreases both bone formation and bone resorption in rats. *J Nutr.* 139(2): 238-243.
- Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2006). Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(10): 2547-2550.
- Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D (2005). Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood.* 106(5): 1864-1866.
- Kiely M, Black LJ (2012). Dietary strategies to maintain adequacy of circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 243: 14-23.
- Knutson M, Wessling-Resnick M (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 38(1): 61-88.
- Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem.* 45(12): 863-873.
- Lafita J (2003). [Physiology and bone physiopathology]. *An Sist Sanit Navar.* 26 Suppl 3: 7-15.

- Laird E, Ward M, McSorley E, Strain JJ, Wallace J (2010). Vitamin D and bone health: potential mechanisms. *Nutrients*. 2(7): 693-724.
- Lamola AA, Joselow M, Yamane T (1975). Zinc protoporphyrin (ZPP): a simple, sensitive fluorometric screening test for lead poisoning. *Clin Chem*. 21(1): 93-97.
- Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT (2008). Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. *J Nutr*. 138(6): 991-995.
- Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Spoerri L, Ciccotosto GD, Wright DK, et al. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med*. 18(2): 291-295.
- Leu M, Giovannucci E (2011). Vitamin D: epidemiology of cardiovascular risks and events. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 25(4): 633-646.
- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 311(5768): 1770-1773.
- Lonnerdal B (2009). Soybean ferritin: implications for iron status of vegetarians. *Am J Clin Nutr*. 89(5): 1680S-1685S.
- Lonnerdal B, Bryant A, Liu X, Theil EC (2006). Iron absorption from soybean ferritin in nonanemic women. *Am J Clin Nutr*. 83(1): 103-107.
- Mackenzie B, Garrick MD (2005). Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 289(6): G981-986.
- Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA (2007). Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem J*. 403(1): 59-69.
- MacLaughlin J, Holick MF (1985). Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest*. 76(4): 1536-1538.
- Maldonado Lozano J, Baro L, et al. (2007). [Intake of an iron-supplemented milk formula as a preventive measure to avoid low iron status in 1-3 year-olds]. *An Pediatr (Barc)*. 66(6):591-596.
- Manolagas SC (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 21(2): 115-137.
- Marañón E, Omonte J, Alvarez ML, Serra JA (2011). [Vitamin D and fractures in the elderly]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 46(3): 151-162.
- Marquez Ruiz G, Velasco J, Dobarganes MC (2003). Oxidation in dried microencapsulated oils. *Lipid Oxidation Pathways*. Champaign, IL, USA, American Oil Chemists Society: 245-264.

- Martínez Gómez ME, del Campo Balsa MT (1999). Vitamina D. Tratado de Nutrición. M. Hernández Rodríguez, A. Sastre Gallego. Madrid, Ediciones Díaz de Santos, S.A.: 207.
- Mata-Granados JM, Luque de Castro MD, Quesada Gomez JM (2008). Inappropriate serum levels of retinol, alpha-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D3 and 24,25 dihydroxyvitamin D3 levels in healthy Spanish adults: simultaneous assessment by HPLC. *Clin Biochem.* 41(9): 676-680.
- Mazzanti R, Srai KS, Debnam ES, Boss AM, Gentilini P (1987). The effect of chronic ethanol consumption on iron absorption in rats. *Alcohol Alcohol.* 22(1):47-52.
- McLachlan CN (2001). β -Casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med. Hypotheses.* 56(2): 262-272.
- McLaren CE, Garner CP, Constantine CC, McLachlan S, Vulpe CD, Snively BM, et al. (2011). Genome-wide association study identifies genetic loci associated with iron deficiency. *PLoS One.* 6(3): e17390.
- McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B (2009). Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr.* 12(4): 444-454.
- Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B (2008). 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med.* 168(15): 1629-1637.
- Mendel CM (1989). The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev.* 10(3): 232-274.
- Milman N, Clausen J, Byg KE (1998). Iron status in 268 Danish women aged 18-30 years: influence of menstruation, contraceptive method, and iron supplementation. *Ann Hematol.* 77(1-2): 13-19.
- Milman N, Kirchhoff M (1992). Iron stores in 1359, 30- to 60-year-old Danish women: evaluation by serum ferritin and hemoglobin. *Ann Hematol.* 64(1): 22-27.
- Milman N, Kirchhoff M, Jorgensen T (1992). Iron status markers, serum ferritin and hemoglobin in 1359 Danish women in relation to menstruation, hormonal contraception, parity, and postmenopausal hormone treatment. *Ann Hematol.* 65(2): 96-102.
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2011). Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide. 15a edición, Madrid, España.
- Moretti D, Zimmermann MB, Wegmuller R, Walczyk T, Zeder C, Hurrell RF (2006). Iron status and food matrix strongly affect the relative bioavailability of ferric pyrophosphate in humans. *Am J Clin Nutr.* 83(3): 632-638.
- Moss D, Fargion S, Fracanzani AL, Levi S, Cappellini MD, Arosio P, et al. (1992). Functional roles of the ferritin receptors of human liver, hepatoma, lymphoid and erythroid cells. *J Inorg Biochem.* 47(3-4): 219-227.

- Murray-Kolb LE, Welch R, Theil EC, Beard JL (2003). Women with low iron stores absorb iron from soybeans. *Am J Clin Nutr.* 77(1): 180-184.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Carbajal A, Pedrosa MM, Roe MA, et al. (2008). Oily fish increases iron bioavailability of a phytate rich meal in young iron deficient women. *J Am Coll Nutr.* 27(1): 96-101.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Vaquero MP (2009a). Iron absorption from meat pate fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. *Nutrition.* 25(1): 20-24.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Vaquero MP (2009b). An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young iron-deficient women. *Br J Nutr.*102(4):546-53
- Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP (2009c). Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem.* 65(2):165-74.
- Nemeth E, Ganz T (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr.* 26: 323-342.
- Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 101(7): 2461-2463.
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 110(7): 1037-1044.
- Norman AW, Bouillon R (2010). Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med (Maywood).* 235(9): 1034-1045.
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell.* 96(4): 507-515.
- Oakhill JS, Marritt SJ, Gareta EG, Cammack R, McKie AT (2008). Functional characterization of human duodenal cytochrome b (Cybrd1): Redox properties in relation to iron and ascorbate metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1777(3): 260-268.
- Olivares M, Arredondo M, Pizarro F (2010). Hierro. *Tratado de Nutrición.* A. Gil. Madrid, Panamericana. 1: 669-686.
- OMS. (2004). "Prevención y tratamiento de osteoporosis." Retrieved 20 septiembre, 2013, from https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB114/B114_13-sp.pdf.
- Pasricha SR, Flecknoe-Brown SC, Allen KJ, Gibson PR, McMahon LP, Olynyk JK, et al. (2010). Diagnosis and management of iron deficiency anaemia: a clinical update. *Med J Aust.* 193(9): 525-532.

- Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D (2008). Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur J Appl Physiol.* 103(4): 381-391.
- Peñuela OA (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica.* 36(3): 215-225.
- Pérez-Granados AM, Navarro MP, Vaquero MP (2003). The frying process. Influence on the bioavailability of dietary minerals. *Metabolic and Technological aspects.* M. P. Vaquero, T. García-Arias, A. Carbajal, F. J. Sanchez-Muniz, Trivadrum: Research Signpost: 95-104.
- Pérez-Granados AM, Vaquero MP, Navarro MP (1995). Iron metabolism in rats consuming oil from fresh or fried sardines. *Analyst.* 120(3): 899-903.
- Pérez-Llamas F, Martínez C, Carbajal A, Zamora S (2012). Concepto de dieta prudente. *Dieta mediterránea. Objetivos nutricionales. Guías alimentarias. Manual práctico de nutrición y salud Kelloggs.* A. Carbajal, C. Martínez. Madrid, Exlibris ediciones 65-81.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 276(11): 7811-7819.
- Pikuleva IA (2006). Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug Metab Dispos.* 34(4): 513-520.
- Pikuleva IA, Waterman MR (2013). Cytochromes p450: roles in diseases. *J Biol Chem.* 288(24): 17091-17098.
- Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B (2007). The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(6): 2017-2029.
- Ponda MP, Dowd K, Finkelstein D, Holt PR, Breslow JL (2012). The short-term effects of vitamin D repletion on cholesterol: A randomized, placebo-controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(10):2510-2515
- Ponsonby AL, McMichael A, van der Mei I (2002). Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology.* 181-182: 71-78.
- Powe CE, Ricciardi C, Berg AH, Erdenesanaa D, Collerone G, Ankers E, et al. (2011). Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. *J Bone Miner Res.* 26(7): 1609-1616.
- Prosser DE, Kaufmann M, O'Leary B, Byford V, Jones G (2007). Single A326G mutation converts human CYP24A1 from 25-OH-D3-24-hydroxylase into -23-hydroxylase,

- generating 1 α ,25-(OH)₂D₃-26,23-lactone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(31): 12673-12678.
- Rajakumar K, Greenspan SL, Thomas SB, Holick MF (2007). SOLAR ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *Am J Public Health.* 97(10): 1746-1754.
- Ramsay AJ, Reid JC, Velasco G, Quigley JP, Hooper JD (2008). The type II transmembrane serine protease matriptase-2--identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles. *Front Biosci.* 13: 569-579.
- Rao NSB (1985). *Salt. Iron fortification of foods.* F. M. Clydesdale, K. L. Wiemer. Orlando, Academic Press: 155-164.
- Reginster JY, Burlet N (2006). Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone.* 38(2 Suppl 1): S4-9.
- Remacha AF, Sardá MP, Canals C, Queralto JM, Zapico E, Remacha J, et al. (2013). Combined cobalamin and iron deficiency anemia: a diagnostic approach using a model based on age and homocysteine assessment. *Ann Hematol.* 92(4): 527-531.
- Reynaga Montesinos B, Zeni SN (2009). Marcadores bioquímicos del remodelado óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquím Clin Latinoam.* 43(2): 177-193.
- Rice BH, Cifelli CJ, Pikosky MA, Miller GD (2011) Dairy components and risk factors for cardiometabolic syndrome: Recent evidence and opportunities for future research. *Adv Nutr.* 2(5):396-407.
- Ridefelt P, Larsson A, Rehman JU, Axelsson J (2010). Influences of sleep and the circadian rhythm on iron-status indices. *Clin Biochem.* 43(16-17): 1323-1328.
- Rodríguez Sangrador M, Beltran de Miguel B, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuny O (2010). [Influence of sun exposure and diet to the nutritional status of vitamin D in adolescent Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project)]. *Nutr Hosp.* 25(5): 755-762.
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 33(1): 21-22.
- Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D'Erasmo E, et al. (2008). Short and long-term variations in serum calcitropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (vitamin D₂) or cholecalciferol (vitamin D₃) in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(8): 3015-3020.
- Romero Artaza J, Carbia CD, Ceballo MF, Diaz NB (1999). [Red cell distribution width (RDW): its use in the characterization of microcytic and hypochromic anemias]. *Medicina (B Aires).* 59(1): 17-22.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. (2011). The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the

- Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(1): 53-58.
- Ruiz-Arguelles GJ (2009). *Fundamentos de hematología*. Madrid, Panamericana.
- Ryan JW, Anderson PH, Turner AG, Morris HA (2013). Vitamin D activities and metabolic bone disease. *Clin Chim Acta.* 425C: 148-152.
- Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, et al. (1999). Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest.* 103(2): 239-251.
- Saliba W, Barnett O, Rennert HS, Rennert G (2012). The risk of all-cause mortality is inversely related to serum 25(OH)D levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(8): 2792-2798.
- Sarria B, López-Parra AM, Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Baeza C, Arroyo-Pardo E, et al. (2007). Hpcidin, transferrin (exon 7), and hemochromatosis genotyping suggests that haplotype block analysis is the best strategy for predicting iron deficiency phenotype in women. *Nutrition Research.* 27(11): 672-678.
- Sarria B, Navas-Carretero S, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Arroyo-Pardo E, Roe MA, et al. (2007). The G277S transferrin mutation does not affect iron absorption in iron deficient women. *Eur J Nutr.* 46(1): 57-60.
- Seeman E (2009). Bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 19(3): 219-233.
- Serra-Majem L (2001). Vitamin and mineral intakes in European children. Is food fortification needed? *Public Health Nutr.* 4(1A): 101-107.
- Sharp P, Srai SK (2007). Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol.* 13(35): 4716-4724.
- Sharp PA (2010). Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *Int J Vitam Nutr Res.* 80(4-5): 231-242.
- Shawki A, Mackenzie B (2010). Interaction of calcium with the human divalent metal-ion transporter-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 393(3): 471-475.
- Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science.* 320(5880): 1207-1210.
- Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. (2004). Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 113(4): 561-568.
- Sichert-Hellert W, Wenz G, Kersting M (2006). Vitamin intakes from supplements and fortified food in German children and adolescents: results from the DONALD study. *J Nutr.* 136(5): 1329-1333.

- Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C (2008). The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab.* 8(6): 502-511.
- Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, et al. (2010). Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol.* 89(5): 447-452.
- Simmons DA, Casale M, Alcon B, Pham N, Narayan N, Lynch G (2007). Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. *Glia.* 55(10): 1074-1084.
- Stekel A, Olivares M, et al. (1988). Prevention of iron deficiency by milk fortification. II. A field trial with a full-fat acidified milk. *Am J Clin Nutr.* 47(2):265-269.
- Strong J (2010). Hematinic deficiencies. *The Obstetric Hematology Manual.* S. Pavord, B. Hunt. New York, Cambridge University Press: 13-21.
- Subramanian P, Rodrigues AV, Ghimire-Rijal S, Stemmler TL (2011). Iron chaperones for mitochondrial Fe-S cluster biosynthesis and ferritin iron storage. *Curr Opin Chem Biol.* 15(2): 312-318.
- Szymlek-Gay EA, Ferguson EL, et al. (2009). Food-based strategies improve iron status in toddlers: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 90(6):1541-1551.
- Tailford KA, Berry CL, Thomas AC, Campbell JH (2003). A casein variant in cows milk is atherogenic. *Atherosclerosis.* 170(1):13-19
- Takeuchi K, Bjarnason I, Laftah AH, Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT (2005). Expression of iron absorption genes in mouse large intestine. *Scand J Gastroenterol.* 40(2): 169-177.
- Tangpricha V, Turner A, Spina C, Decastro S, Chen TC, Holick MF (2004). Tanning is associated with optimal vitamin D status (serum 25-hydroxyvitamin D concentration) and higher bone mineral density. *Am J Clin Nutr.* 80(6): 1645-1649.
- Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. (2007). Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 5(6): 464-475.
- Tetens I, Bendtsen KM, Henriksen M, Ersboll AK, Milman N (2007). The impact of a meat- versus a vegetable-based diet on iron status in women of childbearing age with small iron stores. *Eur J Nutr.* 46(8):439-445.
- Thankachan P, Walczyk T, Muthayya S, Kurpad AV, Hurrell RF (2008). Iron absorption in young Indian women: the interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.* 87(4): 881-886.
- Theil EC (2001). Ferritin. *Handbook of Metalloproteins.* A. Messerschmidt, H. R. Poulos, K. Weighardt. Chichester, UK, Wiley. 2: 771-781.

- Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I (2013). Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol.* 161(5): 639-648.
- Thompson BA, Sharp PA, Elliott R, Fairweather-Tait SJ (2010). Inhibitory effect of calcium on non-heme iron absorption may be related to translocation of DMT-1 at the apical membrane of enterocytes. *J Agric Food Chem.* 58(14): 8414-8417.
- Tian XQ, Chen TC, Matsuoka LY, Wortsman J, Holick MF (1993). Kinetic and thermodynamic studies of the conversion of previtamin D3 to vitamin D3 in human skin. *J Biol Chem.* 268(20): 14888-14892.
- Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP (2010). [Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health]. *Nutr Hosp.* 25(3): 350-365.
- Troesch B, Egli I, Zeder C, Hurrell RF, de Pee S, Zimmermann MB (2009). Optimization of a phytase-containing micronutrient powder with low amounts of highly bioavailable iron for in-home fortification of complementary foods. *Am J Clin Nutr.* 89(2): 539-544.
- Tuderman L, Myllyla R, Kivirikko KI (1977). Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 1. Role of co-substrates. *Eur J Biochem.* 80(2): 341-348.
- Vaidya A, Forman JP (2010). Vitamin D and hypertension: current evidence and future directions. *Hypertension.* 56(5): 774-779.
- Van Dokkum W (2003). The concept of mineral bioavailability Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. *Metabolic and Technological aspects.* M. P. Vaquero, T. García-Arias, A. Carbajal, Trivandrum, India, Research Signpost: 1-18.
- van Driel M, Pols HA, van Leeuwen JP (2004). Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. *Curr Pharm Des.* 10(21): 2535-2555.
- van Schoor NM, Lips P (2011). Worldwide vitamin D status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25(4): 671-680.
- Vaquero MP (1998). Factores que intervienen en la biodisponibilidad mineral. Prevención de deficiencias. *Revista de Nutrición Práctica.* 2: 15-23.
- Vaquero MP, Blanco-Rojo R, Toxqui L (2012). Nutrición y anemia. *Manual Práctico de Nutrición y Salud de Kelloggs.* A. Carbajal, C. Martínez-Roldán. Madrid, Exlibris ediciones: 367-376.
- Vaquero MP, Navarro MP (2013). Minerales. *Libro Blanco de la Nutrición en España.* G. Varela. Madrid, Fundación Española de Nutrición (FEN): 157-164.
- Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, McClung M, et al. (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and

- monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 22(2): 391-420.
- Vera LF (2010). La hemoglobina: una molécula prodigiosa. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* 104(1): 213-232.
- Viatte L, Vaulont S (2009). Hcpidin, the iron watcher. *Biochimie.* 91(10): 1223-1228.
- Viguria Padilla F, Mijan de la Torre A (2006). [Pica: the portrait of a little known clinical entity]. *Nutr Hosp.* 21(5): 557-566.
- Wahl DA, Cooper C, Ebeling PR, Eggersdorfer M, Hilger J, Hoffmann K, et al. (2012). A global representation of vitamin D status in healthy populations. *Arch Osteoporos.* 7(1-2): 155-172.
- Wang H, Xia N, Yang Y, Peng DQ (2012). Influence of vitamin D supplementation on plasma lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis.* 11: 42.
- Wang S (2009). Epidemiology of vitamin D in health and disease. *Nutr Res Rev.* 22(2): 188-203.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. (2008). Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 117(4): 503-511.
- Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. (2010). Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet.* 376(9736): 180-188.
- Webb AR, Kline L, Holick MF (1988). Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 67(2): 373-378.
- Wegmuller R, Camara F, Zimmermann MB, Adou P, Hurrell RF (2006). Salt dual-fortified with iodine and micronized ground ferric pyrophosphate affects iron status but not hemoglobin in children in Cote d'Ivoire. *J Nutr.* 136(7): 1814-1820.
- Wegmuller R, Zimmermann MB, Moretti D, Arnold M, Langhans W, Hurrell RF (2004). Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. *J Nutr.* 134(12): 3301-3304.
- WHO (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Ginebra, Suiza., World Health Organization.
- WHO. (2004). "Prevención y tratamiento de la osteoporosis." Retrieved septiembre, 2013, from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/21185/1/B114_13-sp.pdf.
- WHO (2007). Assessing the iron status of populations. Ginebra, Suiza., World Health Organization.
- WHO (2008). Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO Global Database on Anaemia. Ginebra, Suiza, World Health Organization.

- WHO. (2011). "Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity." Retrieved agosto, 2013, from <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>.
- WHO. (2011). "Vitamin D supplementation to improve treatment outcomes among children diagnosed with respiratory infections." Retrieved agosto, 2013, from http://www.who.int/elena/titles/bbc/vitamin_d_pneumonia_children/en/.
- WHO / FAO. (2002). "Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation." Retrieved agosto, 2013, from <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2809E/Y2809E00.HTM>.
- WHO / FAO, Ed. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva, World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Wright I, Blanco-Rojo R, Fernández MC, Toxqui L, Moreno G, Pérez-Granados AM, de la Piedra C, Remacha AF, Vaquero MP (2013). Bone remodelling is reduced by recovery from iron-deficiency anaemia in premenopausal women. *J Physiol Biochem.* 69(4):889-896.
- Yoshida N, Yoshida T, Nakamura A, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T (1999). Calcitonin induces 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase mRNA expression via protein kinase C pathway in LLC-PK1 cells. *J Am Soc Nephrol.* 10(12): 2474-2479.
- Zella LA, Shevde NK, Hollis BW, Cooke NE, Pike JW (2008). Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo. *Endocrinology.* 149(7): 3656-3667.
- Zhong Y, Armbrecht HJ, Christakos S (2009). Calcitonin, a regulator of the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene. *J Biol Chem.* 284(17): 11059-11069.
- Zimmermann MB (2004). The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: a review. *Int J Vitam Nutr Res.* 74(6): 453-461.
- Zimmermann MB (2008). Methods to assess iron and iodine status. *Br J Nutr.* 99 Suppl 3: S2-9.
- Zimmermann MB, Hurrell RF (2007). Nutritional iron deficiency. *Lancet.* 370(9586): 511-520.
- Zimmermann MB, Zeder C, Chaouki N, Saad A, Torresani T, Hurrell RF (2003). Dual fortification of salt with iodine and microencapsulated iron: a randomized, double-blind, controlled trial in Moroccan schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 77(2): 425-432.