

Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A.

Mercedes Márquez¹, Carmen E. Yépez¹, Rosalía Súttil-Naranjo¹ y Manuel Rincón².

¹Clínica de Dislipidemias, Departamentos de Farmacología.

²Departamento de Bioquímica. Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Palabras clave: Vitamina E, vitamina A, antioxidante.

Resumen. La vitamina E funciona en general como un antioxidante biológico, previniendo la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de las proteínas, por lo que es considerada como un importante elemento protector en el desarrollo de enfermedades relacionadas con los procesos oxidativos. Más allá de su función antioxidante, también ha sido involucrada en la expresión genética, el metabolismo mitocondrial, en la diferenciación celular y en la regulación del sistema inmunológico. Desde el punto de vista de protección antioxidante, se consideran niveles óptimos en sangre valores $\geq 1200-1300 \mu\text{g}/\text{dL}$ (estandarizados según los lípidos plasmáticos). Con relación a su efecto beneficioso en la prevención primaria o secundaria de enfermedad aterosclerótica, los resultados obtenidos aun no son concluyentes. La vitamina A forma parte de una de las líneas de defensa del organismo ante los radicales libres. El mecanismo de acción antioxidante comprende una acción barredora de radicales simples de oxígeno y radicales thioil y podría estar relacionada con los procesos que involucran expresión genética y diferenciación celular. Se consideran niveles óptimos como antioxidantes valores $\geq 80 \mu\text{g}/\text{dL}$. El mayor riesgo del uso de dicha vitamina es su toxicidad aguda o crónica. La cuantificación de la concentración de vitamina E (alfa-tocoferol) y vitamina A (retinol) sérica se realiza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), método de gran reproducibilidad y precisión, siendo de elección para la determinación de estas vitaminas por su alta sensibilidad.

Basic concepts and determination of antioxidants vitamins E and A.

Invest Clin 2002; 43(3): 191-204.

Key words: Vitamin E, vitamin A, antioxidant.

Abstract. Vitamin E usually works as a biological antioxidant, preventing the oxidation of polyunsaturated fatty acids and proteins, for which it is considered an important protective factor in the development of diseases related

to oxidative processes. Beyond its antioxidant properties, it has been involved also in genetic expression, mitochondrial metabolism, cell differentiation and immune system regulation. From the point of view of its antioxidant protection properties, values ≥ 1200 - $1300 \mu\text{g}/\text{dL}$ are considered optimum levels (standardized according to plasmatic lipid levels). In relation to the beneficial advantage effects of vitamin E on primary or secondary atherosclerotic disease, data are not conclusive. Vitamin A is part of the organism's defense barrier against free radicals. Its antioxidant mechanism of action includes scavenging of singlet oxygen and thiol free radicals, and it also could be related to processes that involve genetic expression and cell differentiation. As an antioxidant, vitamin A plasmatic levels $\geq 80 \mu\text{g}/\text{dL}$ are considered optimal. The highest risk of using this vitamin is related to its acute or chronic toxicity. Quantification of serum vitamin E (alpha tocopherol) and vitamin A (retinol) are made by high performance liquid chromatography (HPLC), method of high precision, sensitivity and reproducibility.

Recibido: 30-07-2001. Aceptado: 10-06-2002.

INTRODUCCIÓN

Existe un amplio interés en la prevención de algunas condiciones y enfermedades crónicas principalmente cáncer y enfermedad cardíaca, por lo que muchos de los esfuerzos están enfocados hacia la efectividad de los componentes de la dieta como agentes importantes en esta prevención (1, 2). En este sentido en el campo de la nutrición se han focalizado investigaciones con el fin de estudiar el efecto antioxidante de diversos nutrientes así como también sus posibles efectos prooxidantes (3, 4).

Es conocido que los radicales libres generan importantes cambios en lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y en carbohidratos, y se han asociado a la generación y progresión de variados procesos degenerativos crónicos como las enfermedades cardiovasculares (coronaria, cerebral, periférica), cáncer, cataratas y degeneración macular, desórdenes neurológicos como el Parkinson, cuadros inflamatorios, enfisema y muchos de los procesos asociados al envejecimiento, entre los que se incluye el estado de deficiencia inmunológica para las infecciones, dada la particular dependencia del balance

oxidativo-antioxidante de este sistema (5, 6).

Debido a que la producción de radicales libres forma parte del metabolismo normal de la célula, el organismo posee un sistema para contrarrestar sus efectos. Dentro de esta defensa antioxidante se encuentran los llamados esenciales o vitaminas antioxidantes por ser dependientes de fuentes exógenas, como las vitaminas E, A, C y los beta-carotenos, y los no esenciales porque pueden ser obtenidos por síntesis endógena, perteneciendo a esta categoría la línea de defensa enzimática.

Se ha desarrollado un especial interés en el tema y numerosas investigaciones sobre el mismo. En tal sentido en el año de 1989 la Organización Mundial de la Salud señaló que "un estado óptimo de los antioxidantes esenciales debería reducir el riesgo de enfermedades degenerativas y ser un pre-requisito de salud óptima" (citado en 2). En consecuencia, se ha acumulado un importante cuerpo de estudios enfocados sobre el efecto protector de las vitaminas antioxidantes. Estudios epidemiológicos relacionados con la dieta, señalan consistentemente la relación entre el consumo de vi-

taminas antioxidantes y la enfermedad cardiovascular (2, 7-9). La eficacia de la terapia con vitaminas antioxidantes ha sido evaluada por estudios o pruebas al azar los cuales mostraron que no existe una clara reducción de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares con la suplementación con dichas vitaminas, aun cuando ésta se prolongue hasta seis años o más (7, 10, 11).

Otros estudios han sido realizados para evaluar los niveles plasmáticos de vitaminas antioxidantes y su relación con enfermedad cardiovascular, en este sentido estudios, epidemiológicos multicéntricos, encontraron que la vitamina E era un fuerte predictor de la mortalidad por enfermedad isquémica cardíaca más que los clásicos factores de colesterol total y presión diastólica, presentando este orden de asociación: vitamina E > colesterol y/o factor genético Finlandia > vitamina C > carotenos = vitamina A (2, 12). Estudios de casos y controles (13, 14) y estudios prospectivos (2,13, 15) concuerdan con la hipótesis de que un elevado estado de vitaminas tiene un potencial efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares y ciertos cánceres (2, 3).

Estudios de predicción de riesgo de tipo retrospectivo y prospectivo apoyan los datos anteriores y establecen un orden de potencial protección para Enfermedad Cardiovascular (ECV): vitamina E > betacaroteno = vitamina C > vitamina A. Los estudios de intervención, teóricamente capaces de revelar una relación causal entre antioxidantes y ECV aún no han sido concluyentes y algunos de ellos están aún en progreso (2, 5).

Sobre la base de las investigaciones realizadas se han sugerido concentraciones sanguíneas de vitaminas antioxidantes E y A que han sido asociadas a una reducción del riesgo de enfermedades crónicas tipo cardiovascular o cáncer y cuyos valores son mayores o más exigentes que los niveles de referencia tradicionales para deficiencia nutricional.

El estado de vitaminas E y A en un individuo forma parte de la evaluación del balance oxidativo debido a que las concentraciones plasmáticas de estas vitaminas han resultado ser un indicador más preciso del estado de antioxidantes en el organismo, que la evaluación del aporte y consumo de estas vitaminas en la dieta de cada individuo (2, 3), por lo que es de interés para los investigadores manejar una metodología que permita determinar de manera confiable los niveles de vitaminas E y A en sangre de individuos y poblaciones. Actualmente la cromatografía líquida de alta eficiencia representa el método más utilizado para su determinación simultánea, por su alta sensibilidad y reproducibilidad, lo cual permite determinar en muestras biológicas pequeñas concentraciones y así lograr un diagnóstico más preciso. En la presente revisión se contemplan detalles importantes en la ejecución de esta valiosa técnica estandarizada en el país, para la difusión y aprovechamiento de los investigadores en el área.

También han sido señaladas las recomendaciones en cuanto a la cantidad de vitaminas antioxidantes E y A que se debe consumir para alcanzar los niveles sanguíneos óptimos, de tal manera que puedan ofrecer, en una población sana, protección contra las enfermedades crónicas (2, 3, 16, 18). Recomendación que podría ser mayor que aquella dada para prevenir las bien conocidas deficiencias vitamínicas desde el punto de vista nutricional (6, 17).

El estado de antioxidantes esenciales como las vitaminas E y A, a diferencia de las otras líneas de defensa, puede ser modificado a través de medidas dietéticas (2) y/o farmacológicas, la indicación adecuada de dichas medidas debe estar basada en el estudio de sus propiedades, funciones y recomendaciones ajustándose a los nuevos criterios de protección antioxidante y adecuándolo a los individuos y a las poblaciones se-

gún su condición médica y al análisis de su estado antioxidante real (19).

De lo antes expuesto deriva la importancia que tiene el conocimiento de los aspectos básicos fundamentales de estas vitaminas antioxidantes esenciales para implementar las recomendaciones adecuadas para cada caso.

VITAMINA E

Aspectos básicos

El término vitamina E es usado para un grupo de compuestos liposolubles derivados del tocol y del tocotrienol, que tienen actividad de vitamina E. (20, 21).

En la naturaleza se dan cuatro tocoles y cuatro tocotrienoles, se les conoce con los nombres de α , β , δ y γ tocoferol y sus correspondientes α , β , δ y γ tocotrienoles. El alfa-tocoferol tiene la mayor actividad biológica y es la forma de vitamina E más ampliamente disponible en los alimentos (20, 22).

Para fines prácticos, 1 mg de la forma sintética de acetato de alfa-tocoferol es equivalente a 1 Unidad Internacional (UI) de vitamina E y 1 mg de la forma natural de alfa-tocoferol equivale a 1,49 UI (20).

Fuentes

Las principales fuentes de vitamina E son los aceites vegetales tales como maíz y de soya, así como el germen de trigo y la margarina. Los productos animales no son buena fuente de vitamina E (23, 20).

Absorción, metabolismo y distribución

La absorción de tocoferoles depende de los mismos factores que la digestión y absorción de lípidos a nivel intestinal, siendo esenciales para este proceso la presencia de sales biliares y enzimas pancreáticas. La vitamina E es transportada a la mucosa intestinal y una vez dentro de la luz intestinal es incorporada a los quilomicrones los cua-

les son transportados en la circulación linfática; sólo una pequeña parte de la vitamina E consumida es transportada directamente a la circulación portal (21).

El promedio del porcentaje de absorción de la vitamina E consumido en la dieta (0,4-1 mg) es entre 50 y 70%. Sin embargo la eficiencia de la absorción, puede disminuir cuando se consumen mayores cantidades de tocoferol (20). Un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta, o la administración conjunta de vitamina E con sales ferrosas o resinas captadoras de ácidos biliares, interfieren con la digestión y absorción de la vitamina E.

Los tocoferoles son distribuidos en el plasma con las lipoproteínas, la mayoría de la vitamina E está presente en el plasma humano en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en las de alta densidad (HDL) (20, 21).

Los compuestos de vitamina E se encuentran concentrados en sitios donde haya abundantes ácidos grasos, especialmente en estructuras de las células que contienen membranas de fosfolípidos. Los tejidos con mayor contenido de lípidos tienden a tener mayor contenido de vitamina E; en la sangre la cantidad de lípidos es determinante de la concentración de vitamina E circulante. La mayoría de los tejidos incorpora vitamina E, pero el hígado es su principal depósito del que se puede movilizar rápidamente. El tejido adiposo también acumula vitamina E continuamente y puede secuestrarla; y aunque este tejido constituya una gran reserva de vitamina E, el tocoferol presente en los adipocitos no está disponible para otros tejidos con facilidad (20).

Recomendaciones

Las recomendaciones de la RDA (24) con relación al consumo adecuado de vitamina E para prevenir la deficiencia nutricional y sus síntomas clínicos son para los hombres y mujeres adultas de 10 y 8 mg

diarios respectivamente. Los requerimientos de vitamina E se incrementan con un alto consumo de ácidos grasos poliinsaturados (AGP), con los cuales debe mantener un índice mayor de 0,4 mg de alfa tocoferol por g de AGP consumido en la dieta. Por lo tanto para definir el consumo ideal de vitamina E en un individuo, debería tomarse en cuenta su consumo total de energía, porcentaje de calorías provenientes de las grasas, y de los ácidos grasos poliinsaturados, el consumo de otros antioxidantes, y aspectos como la edad, actividad física y la exposición a contaminación ambiental (18, 22).

Ahora bien, más allá de los requerimientos para prevenir las deficiencias nutricionales de vitamina E, se ha sugerido que su consumo, para lograr concentraciones séricas óptimas para cumplir su rol antioxidante, esté por encima de lo recomendado por la RDA, teniendo importancia en la modulación de la función inmunológica y en la prevención de desarrollo de patologías que constituyen problemas de salud pública, tales como las ECV y el cáncer (1, 3, 20, 22, 23, 25-27).

Al calcular la actividad de vitamina E de una dieta mixta debe considerarse que existe bastante diferencia entre el contenido total de tocoferoles y la cantidad de alfa-tocoferoles. Por esta razón deben calcularse los equivalentes de alfa tocoferol, ajustando la proporción de beta y gamma tocoferoles (20, 23).

Funciones

La vitamina E funciona en general como un antioxidante biológico, previniendo la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las proteínas ricas en radicales con azufre. Este papel deriva de su estructura molecular, ya que se comporta como una molécula liposoluble capaz de fijar radicales libres del tipo $O_2^{\cdot-}$, O_2^{2-} y OH^{\cdot} debido a su grupo fenólico (20, 21, 22, 25, 28).

La inhibición de la peroxidación lipídica en las membranas por el tocoferol evita la acumulación de hidroperóxidos, porque aquel funciona como un "canal molecular" a través del cual los radicales abandonan la zona hidrocarbonada de las membranas. El tocoferol al ser oxidado, forma radicales hidroquinona estables que no perturban la química celular y que posteriormente son regenerados a vitamina E mediante la aceptación de un electrón proveniente de agentes reductores como la vitamina C (4, 21, 28, 29).

Por esta función antioxidante, la vitamina E se considera como un importante elemento protector en el desarrollo de enfermedades relacionadas con los procesos oxidativos, como enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, cuadros infecciosos, reumáticos y neurológicos, pancreatitis y el envejecimiento (1, 5, 22, 23, 25, 30, 31).

Más allá de su función antioxidante, la vitamina E también ha sido involucrada en la regulación de la síntesis de ADN, la expresión genética, el metabolismo mitocondrial y en la proliferación y diferenciación celular. Asimismo se ha relacionado con la regulación de la agregabilidad plaquetaria inhibiendo la actividad de fosfolipasa A_2 y la ciclooxigenasa plaquetaria, lo cual tiene implicaciones importantes en la prevención de enfermedad vascular periférica. La vitamina E puede también afectar el sistema inmunológico mediante la modulación del metabolismo de prostaglandinas y leucotrienos. Estas funciones de la vitamina E representan nuevas áreas de investigación con relación a la regulación celular con importantes implicaciones en la fisiología del organismo humano (6, 22, 23, 25, 32, 33).

Por otra parte, ha sido bien caracterizado el papel esencial de la vitamina E en la prevención de la hemólisis de los glóbulos rojos, y en otros desordenes hematológicos en niños prematuros y en adultos, así como su importancia en algunas alteraciones genéticas (22).

La vitamina E ha sido usada como parte de la terapéutica farmacológica en algunas patologías sin que se hayan obtenido resultados convincentes y definitivos. Con relación a esto, se ha administrado vitamina E en los casos de claudicación intermitente por enfermedad aterosclerótica vascular periférica, en los casos de enfermedad arterial coronaria, en ataque isquémico transitorio, en el síndrome premenstrual, en Sprue tropical, en hipertensión arterial, en diabetes mellitus y en la reperfusión de tejidos posterior a isquemia de diferentes orígenes (34-40).

El uso profiláctico de la vitamina E ha sido estudiado en diferentes investigaciones a las cuales se ha hecho referencia anteriormente. La suplementación con vitamina E puede reducir el riesgo de sufrir ECV por diferentes vías, especialmente por su función antioxidante inhibiendo la peroxidación de las LDL-c, cuya forma oxidada forma parte de la lesión aterosclerótica inicial. También por medio del efecto inhibitorio de la vitamina E sobre la agregación plaquetaria y el metabolismo de los eicosanoides, que pueden ayudar a retardar la formación del trombo arterial y en la reducción de la generación de trombina. Otro efecto puede ser su posible acción sobre las HDL-c y las arritmias cardíacas, y su acción protectora sobre el óxido nítrico (6, 20, 22, 25, 33).

El mecanismo por el cual la vitamina E puede actuar en la prevención de infecciones, neoplasias, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias, a través de la estimulación del sistema inmunológico no ha sido completamente descrito. Sin embargo se ha señalado que su acción antioxidante, inhibiendo los radicales libres que pueden iniciar cambios en el ADN y su efecto indirecto sobre la mitogénesis de las células T tiene especial importancia en su función inmunoestimuladora (1, 20, 22, 32).

Evaluación del estado de vitamina E

Para la evaluación del estado de vitamina E, no se cuenta con un índice que refleje con exactitud su consumo así como tampoco sus depósitos en el organismo (10, 11). La concentración de tocoferoles totales en suero es el índice más usado para medir el estado nutricional de vitamina E, siendo de mayor precisión la determinación de los isómeros de vitamina E, a través del método de cromatografía líquida de alta eficiencia. Además, conjuntamente puede realizarse el test de hemólisis de eritrocitos en la presencia de 2% de peróxido de hidrógeno, el cual proporciona un índice del potencial antioxidante (22, 23). También se ha sugerido la determinación del metabolito urinario de alfa-tocoferol: 2,5,7,8-tetrametil-2(2-carboxietil)-6-hidroxiromano como un indicador de adecuado consumo de vitamina E (41).

Los niveles séricos tanto de alfa como gamma tocoferoles están altamente correlacionados con el colesterol sérico y la concentración total de lípidos. El índice tocoferol/lípidos es utilizado para prevenir un error al clasificar las deficiencias de vitamina E en pacientes con alteraciones lipídicas (2, 23, 19), no solamente porque existe una bien conocida correlación estadística con los lípidos del plasma, sino porque el grado de deficiencia clínica de vitamina E, el grado de daño a la membrana celular y los indicadores de peroxidación lipídica *in vivo* se correlacionan con el tocoferol plasmático solamente después que los valores absolutos de vitamina E se estandarizan con los lípidos plasmáticos (19, 20, 23).

Concentraciones séricas de tocoferol por debajo de 500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (11,6 $\mu\text{mol}/\text{L}$) se consideran deficientes desde el punto de vista nutricional (23), y como valores bajos de alfa-tocoferol los comprendidos entre 500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (11,6 $\mu\text{mol}/\text{L}$) y 1000 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (23,2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) (42).

Desde el punto de vista de protección antioxidante, se consideran niveles óptimos de vitamina E en sangre, los valores por encima de 1200- 1300 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (28-30 $\mu\text{mol}/\text{L}$) según lo sugerido por Gey (2, 3).

Las deficiencias de vitamina E raramente ocurren como una consecuencia de un aporte inadecuado en la dieta. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia están limitadas a ciertos casos, como a la deficiencia de vitamina E al momento de nacer, también en los casos de niños y adultos con malabsorción intestinal por diferentes causas tales como: abetalipoproteinemia, colestasis hepática, fibrosis quística y malabsorción adquirida posterior a resección intestinal extensa. También puede encontrarse deficiencia de vitamina E, en los casos de desordenes hemolíticos como deficiencias de glucosa-6-fosfato- deshidrogenasa o sintetasa y en la betatalasemia mayor (20, 22, 23).

Debido a los posibles beneficios que significa la suplementación con vitamina E, ha crecido el número de personas que se automedican con dosis altas de vitamina E diariamente. En este sentido el rango usual de 100-800 $\text{mg}/\text{día}$, no ha mostrado evidencias claras de toxicidad, aun cuando ha sido reportado que el alfa tocoferol puede ser tóxico cuando es utilizado a altas dosis *in vitro* (43). Sin embargo se requieren posteriores estudios que permitan definir con más propiedad el rango de seguridad con relación a las dosis de vitamina E (20, 22, 44, 45, 46, 47).

VITAMINA A

Aspectos básicos

El término vitamina A se aplica genéricamente a todos los derivados de la beta-ionona, distintos de las provitaminas A de tipo carotenoide, que exhiben la actividad biológica del *trans* retinol. Los ésteres del *trans*-retinol se denominan comúnmente ésteres de retinilo, como por ejemplo el palmi-

tato de retinilo, el aldehído correspondiente se le denomina retinal o retinaldehído, el ácido retinoico es la forma acídica de la vitamina A, el cual es activo en el crecimiento y diferenciación celular, pero no en la visión ni en la reproducción. La forma biológicamente activa de la vitamina A en el ciclo de la visión es el 11-*cis* retinaldehído. De los cuatrocientos y tantos carotenoides que han sido caracterizados, sólo unos treinta tienen actividad de provitamina A, el carotenoide más activo es el *trans* betacaroteno (36). Un microgramo de all-*trans* retinol es igual a 3,3 Unidades Internacionales de all *trans* vitamina A alcohol. Para convertir todas las fuentes de vitamina A y carotenoides de la dieta en una unidad simple se ha utilizado el término equivalente de retinol (ER). Generalmente 1 μg de retinol equivale a 6 μg de beta caroteno ó 12 μg de carotenoides mixtos.

El betacaroteno y otros carotenoides con carácter de provitamina A son convertidos en retinal en las células de la mucosa intestinal. El retinal y el retinol pueden ser interconvertidos en forma reversible en presencia de enzimas que requieren nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) (49, 50).

Fuentes

Los precursores de la vitamina A se encuentra compartiendo las mismas fuentes que los carotenoides en: vegetales amarillos y anaranjados como la zanahoria, la auyama; vegetales de hojas verdes: espinaca, acelga, berro, brócoli, perejil; frutas: mango bocado, durazno, lechosa, melón y otros como el pimentón rojo, el tomate y el plátano. y como vitamina A preformada en la leche y derivados lácteos, hígado, yema de huevo y pescado. La fuente principal de vitamina A en la dieta del venezolano está constituida por los cereales fortificados (harina de maíz precocida) y secundariamente las frutas y las hortalizas.

Absorción, metabolismo y excreción:

La vitamina A asociada a tejidos animales como los carotenoides de verduras y frutas son liberados de las proteínas mediante la acción de la pepsina y enzimas proteolíticas. En el lumen intestinal la provitamina y la vitamina A se emulsionan con sales biliares formando micelas que facilitan la hidrólisis de los esterios de retinilo. La vitamina A ingerida como tal o transformada en la pared intestinal a partir de la provitamina, se esterifica con ácidos grasos de cadena larga y se incorpora a las lipoproteínas de baja densidad y a los quilomicrones (21, 49).

A través de la linfa y de la sangre llega al hígado, donde el retinol se une a proteínas y es reesterificado, y se almacena en un complejo lipoglicoproteico desde donde se libera a la sangre como retinol sin esterificar hacia los tejidos. Debido a los mecanismos de homeostasis se logra un ajuste de la capacidad de absorción intestinal, de la utilización por los diferentes tejidos y de la excreción de la vitamina A con la finalidad de mantener más o menos constantes sus concentraciones en sangre. En este proceso juega un importante papel la proteína ligadora de retinol (retinol binding protein) la cual forma un complejo con la prealbumina, transportando en el plasma humano la vitamina A y liberándola en los receptores de las células blanco (21, 23, 49).

El retinol puede sufrir beta-glucuronidación y ser eliminado en la bilis; el exceso aparece en la orina o en la bilis. El retinaldehído se puede oxidar irreversiblemente en ácido retinoico y productos sucesivos que son eliminados por diferentes vías (21, 23, 49).

Recomendaciones

Las recomendaciones en los Estados Unidos (RDA) (24) son de 1000 ER/pers./día para el hombre y 800 para la mujer, las cuales deben ser revisadas en

función de su posible utilidad en lograr niveles plasmáticos de vitamina A que puedan cumplir con su papel de protector antioxidante y reducir la incidencia de algunas enfermedades crónicas (51).

Entre los factores de la dieta que afectan la absorción de vitamina A se encuentra el contenido de grasa, proteína y vitamina E de la dieta. Además de los anteriores, también influyen en la absorción de los betacarotenos, la digestibilidad de la matriz del alimento y el tipo y cantidad de fibra consumida. El mayor riesgo del uso de la vitamina A es su toxicidad, presentando mayor riesgo los niños, embarazadas, los desnutridos y las hepatopatías. Existen tres tipos de toxicidad: aquella que produce malformaciones congénitas y resorción fetal, la hipervitaminosis aguda descrita con dosis únicas > 100 mg (330000 UI) en niños y >200 mg (660000 UI) en adultos y la toxicidad crónica con dosis desde 4,2 mg (14000 UI) en niños y 10 mg (33000 UI) en adultos. También ha sido reportado el aumento de colesterol total, fosfatasas alcalinas y triglicéridos, así como la disminución de las HDL con el consumo de megadosis de vitamina A por un período aproximado de 4 años. La administración diaria de 2,4-3,0 mg (8000-10000 UI) de vitamina A puede considerarse segura (51-53).

Funciones

La Vitamina A interviene en los procesos de la visión, la diferenciación celular, metabolismo de aminoácidos, diferenciación de células epiteliales, el funcionamiento del sistema inmunológico, la reproducción, así como interviene en el mecanismo de defensa antioxidante.

La vitamina A forma parte de una de las líneas de defensa del organismo ante los radicales libres (radicales thioil, superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrógeno y oxígeno atómico) que están implicados en la patogenia de muchas enfermedades. El me-

canismo de acción antioxidante de la vitamina A comprende una acción barredora de radicales simples de oxígeno y radicales thioil, y podría estar relacionada con los procesos que involucran expresión genética y diferenciación celular. Algunos estudios han señalado la relación inversa entre el estado de vitamina A y cáncer, estando presente también esta relación con el riesgo de sufrir enfermedad isquémica coronaria. En este sentido se ha sugerido que la concentración sanguínea segura para minimizar el riesgo de enfermedad isquémica coronaria es muy similar a aquella para un bajo riesgo de cáncer ($2,8 \mu\text{mol} / \text{L} = 80 \mu\text{g}/\text{dL}$) (2, 54-57).

El ácido retinoico ha demostrado estimular el rechazo de ciertos tumores inmunogénicos quizás debido a una mejoría en la vigilancia inmunológica (58). Se han identificado en casi todos los tejidos, receptores nucleares para el ácido retinoico lo cual lo involucra de alguna manera con los procesos de regulación y expresión de los genes. Por otro lado, se ha demostrado también que una deficiencia de vitamina A está asociada con una alteración de la resistencia a infecciones y de la inmunidad a través de varios mecanismos: cambios en la linfopoyesis, reducción de citoquinas, alteración de la estructura de la membrana, disminución de la acción fagocítica (23).

Evaluación del estado de vitamina A

La concentración de retinol en suero es el índice más usado para medir el estado nutricional de vitamina A a través del método de cromatografía líquida de alta eficiencia.

Los niveles en sangre considerándolo desde el punto de vista nutricional, se han señalado tres categorías: a) Normales: $\geq 30 \mu\text{g}/\text{dL}$, b) Marginales: $20-29 \mu\text{g}/\text{dL}$ y c) Deficientes: $< 20 \mu\text{g}/\text{dL}$ (4, 56). Se han establecido 3 niveles de retinol sérico cuando los pacientes presentan valores subnormales

($30 \mu\text{g}/\text{dL}$): i) menor de $10 \mu\text{g}/\text{dL}$ ii) menor de $20 \mu\text{g}/\text{dL}$ y iii) $20-29 \mu\text{g}/\text{dL}$. En los tres niveles la concentración de vitamina A puede ser incrementada, si se aumenta el consumo de la misma. En los niveles i) y ii) es bastante probable que haya perjuicio de la función de la vitamina A, y en el nivel iii) sólo algunos individuos pueden exhibir perjuicio de las funciones de la vitamina A. Al hablar de perjuicio, se incluye, alteraciones en la adaptación a la oscuridad, ceguera nocturna, lesiones oculares y posiblemente pérdida o disminución de la función inmune (23).

Los niveles séricos de vitamina A requeridos para ofrecer una protección antioxidante y contribuir a la prevención de enfermedades como el cáncer y la enfermedad isquémica cardíaca son más altos que los necesarios para impedir la aparición de manifestaciones clínicas de deficiencia nutricional. Por tal motivo han sido sugeridos niveles de retinol sérico óptimos para su función como antioxidante, y se consideran dos categorías: a) Niveles óptimos: $\geq 80 \mu\text{g}/\text{dL}$; y b) Niveles subóptimos: $< 80 \mu\text{g}/\text{dL}$ (2).

DETERMINACIÓN BIOQUÍMICA DE ALFA-TOCOFEROL Y RETINOL EN SANGRE

La cuantificación de la concentración de alfa-tocoferol y retinol sérico se realiza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), según el método desarrollado por el International Vitamin A Consultive Group (59) y estandarizado para vitamina A y vitamina E (48). Este método posee gran reproducibilidad, es muy preciso y específico y es de elección para la determinación de estas vitaminas por su alta sensibilidad. Se utiliza la modalidad cromatográfica conocida como cromatografía líquida de fase reversa, la cual consiste en la partición de la muestra entre una fase estacionaria hidrofóbica (frecuentemente cadenas C-18

enlazadas covalentemente a partículas de sílica) y una fase móvil más polar. El tiempo en el cual los compuestos de la muestra eluyen depende de la polaridad: los componentes polares eluyen antes que los componentes menos polares. La detección de los componentes separados por HPLC se realiza espectrofotométricamente, (rango UV para retinol y retinil acetato). La cuantificación de los componentes se logra por comparación de las alturas de los picos con las de los estándares (analítico y estándar interno). La adición de un estándar interno (all trans retinil acetato) ayuda a la corrección por pérdidas durante la extracción y el análisis.

Sistema cromatográfico

El sistema de cromatografía líquida (Cromatógrafo líquido marca Hewlett-Packard modelo 1050) está formado por varias unidades, cada una de las cuales realiza una función propia: a) Bomba distribuidora de solvente, que succiona la fase móvil a partir del depósito y lo envía a través del sistema a flujo constante, b) Columna de fase reversa (25 cm de largo \times 4 mm de diámetro interno), (C 18), tipo Spherisorb OD2, con un tamaño de poro de 80 Å, y un tamaño de partícula de 5 μ m, con un guarda columna del mismo empaque, c) Detector rango UV visible, de longitud de onda programable, d) Integrador automático.

Manejo de la muestra

Las vitaminas E y A son sustancias muy lábiles que requieren de un manejo especial y algunas precauciones deben ser tomadas antes de su análisis para prevenir su degradación (60). Los cuatro factores críticos son:

1. Oxidación: la vitamina A y E y los carotenoides pueden ser destruidos por oxidación en la presencia de aire, el calor y los iones metálicos (hierro y cobre) pueden potenciar este fenómeno.

2. Exposición a la luz: las vitaminas son destruidas por la exposición a la luz solar, que es más destructiva que la artificial, pero debe evitarse su exposición directa en ambos casos.
3. Hemólisis: en diferentes análisis se han obtenido resultados erróneos, por lo cual no deben procesarse muestras hemolizadas.
4. Extracción: la extracción completa de vitaminas E y A en un solvente orgánico ocurrirá sólo después de una precipitación completa de la proteína por la adición de alcohol en una proporción adecuada.

Toma de la muestra

Existen procedimientos óptimos para garantizar en lo posible la calidad de la muestra y evitar su degradación. La muestra debe ser tomada de sangre venosa de la vena antecubital preferiblemente con vacutainer de vidrio envueltos en papel de aluminio para protegerlos de la luz directa, y sin anticoagulante, con la precaución debida de limpieza local, aplicación correcta del torniquete, lo cual minimiza el riesgo de hemólisis y producción de hematomas. Por otra parte es preferible la muestra de un paciente en ayunas, pero el hecho de haber desayunado no varía substancialmente los niveles séricos de retinol o de alfa-tocoferol. La muestra debe ser conservada a -20°C ó -70°C , condiciones en las cuales dura estable durante 6 a 12 meses. El análisis debe hacerse en el laboratorio bajo luz incandescente y no con luz fluorescente para reducir la absorción de la luz ultravioleta. Idealmente los procesos deben ser realizados bajo luz roja o luz filtrada.

Extracción de las vitaminas E y A

1. La muestra de suero (puede ser utilizado plasma) debe ser tratada con etanol o metanol para desnaturalizar las proteínas séricas, y liberar las vita-

minas E y A para ser sometida a extracción con solventes orgánicos. Se toman 100 μL de suero y se agrega la misma cantidad de estándar interno (retinil acetato, concentración 100 $\mu\text{g}/\text{dL}$), en tubo de ensayo cónico, plástico, traslúcido, de Nalgene, se agita brevemente (con un mezclador tipo vortex).

2. Se añaden luego 300 μL hexano y se agita durante 3 minutos,
3. Posteriormente se centrifuga a 5000 r.p.m. por 5 minutos para acelerar la separación.
4. El sobrenadante o capa orgánica es retirado cuidadosamente con una pipeta y colocado en tubo ámbar para ser secado bajo corriente suave de nitrógeno en campana de extracción. Deben repetirse dos o tres veces los pasos seguidos a partir de la adición del hexano
5. Se reconstituye en 100 μL de etanol y se toman 25 o 30 μL de la solución extraída de la muestra para ser inyectado en el cromatógrafo con condiciones estables.

Condiciones cromatográficas

a) Fase móvil: Metanol:Agua 98%:2%.
b) Flujo: 1,5 mL/min, c) se programa el detector para la longitud de onda de 325 λ para retinol, 328 para retinil acetato y 292 para alfa-tocoferol, d) temperatura: ambiente, e) sensibilidad de detección: 0,02 AUF (Absorption Units Full), f) tiempo de corrida: 5-6 minutos, g) Velocidad de carta: 0,6 mm/seg, h) Tiempo de elución: retinol 1,3 min, retinil acetato 1,9 min, alfa-tocoferol 4,09 min.

CONCLUSIÓN

En base a la revisión realizada de las Vitaminas antioxidantes E y A se puede concluir que para lograr y mantener un estado adecuado de antioxidantes y administrar de una forma segura suplementos farmacológi-

cos con el objetivo de ajustar la ingesta de vitaminas antioxidantes y optimizar su estado, deberían conocerse sus concentraciones reales en el organismo, paralelo al conocimiento de las características propias de las vitaminas, sus fuentes, funciones, el estado fisiológico y nutricional del individuo, su patrón de alimentación y las interacciones que surgen entre los nutrientes y ante la presencia de otros fármacos, así como también sus posibles efectos tóxicos. En este sentido cabe destacar lo señalado por Slater de suma importancia para el estudio de los antioxidantes: "el criterio para que los antioxidantes sean exitosos es que deben alcanzar el sitio correcto, al momento correcto y a las concentraciones correctas, más aun deben tener una baja toxicidad intrínseca para su uso en condiciones *in vivo*" (citado en 29).

REFERENCIAS

1. **Meydani S, Wu D, Santos M, Hayek M.** Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (suppl):1462S-1476S.
2. **Gey KF, Moser UK, Jordan P, Stahelin HB, Eichholzer M, Ludin E.** Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(suppl):787S-797S.
3. **Gey KF.** Vitamin E plus C And Interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors* 1998; 7(1-2):113-174.
4. **Azzi A, Boscoboinik D, Mariley D, Ozer NK, Stauble B, Tasinato A.** Vitamin E: a sensor and an information traducer of the cell oxidation state. *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (suppl):1337S-1346S.
5. **Tribble DL.** Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E and beta carotene. *Circulation* 1999; 99:591-595.

6. **Meydani M.** Effect of functional food ingredients: Vitamin E modulation of modulation of cardiovascular disease and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr* 1999; 71(6) 16: 655-672.
7. **Prabhat JHA, Flather M, Lonn E, Farkouh M, Yusuf S.** The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 1995; 123:860-872.
8. **S-Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJ, Blanco I, Gil-Martínez E, Berg H, Corridan B, Rossel AM, Chopra M, Thurnham DI.** Serum concentration of carotenoids and vitamin A, E and C in control subjects from five European countries. *Br J Nutr* 2001; 85(2):227-238.
9. **Stampfer M, Hennekens C, Manson J, Colditzg Rosner B, Willet W.** Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med*.1999; 328:1444-1449.
10. **Rapola J, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen J, Albanes D, Taylor P, Heinonen G.** Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997; 349: 1715-1720
11. **Losonczy K, Harris T, Havlik R.** Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all cause and coronary heart disease mortality in older persons: the established populations for epidemiologic studies of the elderly. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(2):190-196.
12. **Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK.** Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:326S-334S.
13. **Salonen JT, Salonen R, Penttila I.** Serum fatty acids, apolipoproteins selenium and vitamin antioxidants and the risk of death from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1985; 56:226-31
14. **Kok FJ.** Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary atherosclerosis?. *Atherosclerosis* 1991; 31:81-90.
15. **Kok FJ.** Serum selenium, vitamin antioxidants, and cardiovascular mortality: a 9-year follow-up study in The Netherlands. *Am J Clin Nutr* 1987; 45:462-468.
16. **Heseker H, Kubler W.** Vitamins requirements of the elderly. En: *Nutrition of the elderly*, edited by H. Munro and G. Schlierf. Nestlé Nutrition Workshop Series; Vol. 29, Nestle Ltd., Vevey/Raven Press, Ltd., 1992; New York.
17. **Hollman PC, Katan MB.** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 1997; 51:305-310.
18. **Horwitt MK.** Critique of the requirement for vitamin E. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(6):1003-1005.
19. **Traber MG, Jialal I.** Measurement of lipid-soluble vitamins-further adjustment needed?. *Lancet* 2000; 355:2013-2014.
20. **Farrell P.** Vitamin E En: Shils ME, Olson JA & Shike M, Eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
21. **Herrera E.** *Bioquímica, Aspectos estructurales y vías metabólicas*. Segunda edición. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill; 1994.
22. **Dupont J, Holub B, Knapp H, Meydani M.** Fatty acid-related functions. *Am J Clin Nutr* 1996; 63 (suppl): 991S-993S.
23. **Gibson RS.** Assessment of the status of vitamins A, D and E En: *Principles of Nutritional Assessment*, New York, Oxford University Press, 1990.
24. **The National Academy of Sciences.** *The American Recommended Dietary Allowances (RDA)*. En: *Recommended Dietary Allowances*, 10th Edition, by The National Academy of Sciences, Washington DC, USA, 1989.
25. **Packer I.** Vitamin E is nature's master antioxidant. *Scientific American* 1994; 1(1):54-63.
26. **Takamatsu S, Takamatsu M, Satoh K.** Effects on health of dietary supplementation with 100 mg. d-alpha-tocopheryl acetate, daily for 6 years. *J Internat Med Res* 1995; 23:342-357
27. **Salonen J, Nyyssonen K, Toumainen T.** Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: A four year follow up study

- in men, *Br Med J* 1995; 311(7013):1124-1127.
28. **Sies H, Sthal W.** Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants *J Am Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1315S-1321S.
 29. **Nikki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Goto N.** Interaction among vitamin C, vitamin E and β -carotene. *J Am Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1322S-1326S.
 30. **Schoenberg MH, Birk D, Begeer HG.** Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1306S-1311S.
 31. **Zhang YH, Kramer T, Taylor P, Li J, Blot W, Brown C, Guo W, Dawsey S, Li B.** Possible immunologic involvement of antioxidants in cancer prevention *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1477S-1482S.
 32. **Traber M, Packer I.** Vitamin E: beyond antioxidant function *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1501S-1509S.
 33. **Chahn AC.** Vitamin E and Atherosclerosis, *J Nutr* 1998; 128:1593-1596.
 34. **Steiner M, Glantz M, Lekos A.** Vitamin E plus aspirin compared with aspirin alone in patients with transient ischemic attacks. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1381S-1384S.
 35. **Reaven P.** Dietary and pharmacology regimens to reduce lipid peroxidation in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1483S-1489S.
 36. **Hodis H, Mack W, Labree L.** SERIAL Coronary angiographic evidence that antioxidant intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA* 1995; 273(23):1849-1854.
 37. **Paolisso G, Tataranni P, Foley J, Bogardus C, Howard B, Ravussin E.** A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38(10):1213-1217.
 38. **Ghalaut VS, Ghalaut PS, Khrrb S, Singh GP.** Vitamin E in intestinal fat malabsorption. *Ann Nutr Metab* 1995; 39:296-301.
 39. **Mol MJ, De Rijke YB, Demacker PN, Stalenhoef AF.** Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis* 1997; 129:169-176.
 40. **Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR.** Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clin Sci* 1997; 92:361-365.
 41. **Schultz M, Leist M, Ptrizika M, Gassmann B, Brigelius-Flohé R.** Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetra-methyl-2(2-carboxyethyl)-6-hydroxycromano, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1527S-1534S.
 42. **Gámez C, Artacho R, Ruiz-López MD, Puerta A, López MC.** Nutritional status of vitamin A and E in institutionalized elderly people in Granada, *J Nutr Sci Vitaminol* 1996; 42 (5):397-405.
 43. **Melnikova V, Bezdetnaya L, Belitchenco I, Potapenko A, Merlin JL, Guillenum F.** Meta-tetra (hydroxyphenyl) cholirine-sensitized photodynamic damage of cultured tumour and normal cells in the presence of high concentration of alpha-tocopherol. *Cancer lett* 1999; 139:89-95.
 44. **Diplock A.** Safety of antioxidant vitamins and β -carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1510S-1516S.
 45. **Pryor WA.** Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(1):141-164.
 46. **Lepalla J, Virtamo J, Fogelholm M, Huttunen J, Albanes D, Taylor P, Heinonen O.** Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(1):230-235.
 47. **Koul A, Mishra A, Nerhu B.** Modulation of oxidative stress by ascorbic acid and /or alpha tocopherol. *J Nutr Envir Med* 2000; 10(3):233-236.
 48. **Olson JA.** Vitamina A. En: *Conocimientos Actuales en Nutrición*, Copublicación OPS e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, North America; 1991.
 49. **Olson JA.** Vitamin A, Retinoids and Carotenoids. En: *Shils ME, Olson JA & Shike M. Eds. Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th ed Philadelphia: Lea & Febiger; 1998.

50. Nestel P, Trumbo P. The role of provitamin A carotenoids in the prevention and control of vitamin A deficiency, *Arch Latinoam Nutr* 1999; 49(suppl):26S-33S.
51. Olson JA. Hypovitaminosis A: Contemporary Scientific Issues. *J. Nutr.* 1994; 124(suppl):1461S-1466S.
52. Artmel B, Moon TE, Levine N. Effects of long term intake of retinol on selected clinical and laboratory indexes *Am J Clin Nutr* 1999; 69(5):937-943.
53. Russell RM. The vitamin A spectrum: From deficiency to toxicity. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(4):878-884.
54. Olivieri O, Stanzial AM, Girelli D, Trevisan MT, Guarini P, Terzi M, Caffi S, Fontana F, Casaril M, Ferrari S, Corrocher R. Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging: the Nove Study. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:510-517.
55. Palacios A, Piergiacomini VA, Catala A. Vitamin A supplementation inhibits chemiluminescence and lipid peroxidation in isolated rat liver microsomes and mitochondria. *Mol Cell Biochem* 1996; 154(1):77-82.
56. Piergiacomini PA, Palacios A, Catala A. Comparative studies on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria obtained from different rat tissues: effect of retinyl palmitate. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; 64(2):75-80.
57. Axel DI, Frigge A, Dittman J, Runge H, Spyridopoulos I, Riessen R, Viebahn P, Karsch KR. All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2001 49(4):851-862.
58. Ross AC. Vitamin A status: Relationship to immunity and the antibody response. *Pro Soc Exp Biol Med.* 1992; 200:303-320.
59. International Vitamin A Consultative Group. Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status. IVACG editors 1982.
60. Márquez M. Ácidos grasos y vitamina E en ancianos institucionalizados. [Trabajo de grado]. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. 1997.