



* 5 3 0 9 8 8 6 7 1 2 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

61693135x
i24777596

**STATUS NUTRICIONAL DE CAROTENOIDES, RETINOL
Y TOCOFEROLES EN LA DIABETES MELLITUS
INSULINO-DEPENDIENTE.**

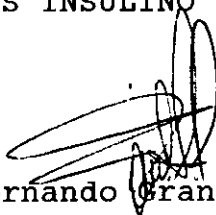
D. FERNANDO GRANADO LORENCIO



**STATUS NUTRICIONAL DE CAROTENOIDES, RETINOL Y
TOCOFEROLES EN LA DIABETES MELLITUS INSULINO-
DEPENDIENTE.**

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas presentada por D. Fernando Granado Lorencio
y realizada en la Unidad de Vitaminas (Servicio de
Nutrición) de la Clínica Puerta de Hierro, Madrid.

"STATUS NUTRICIONAL DE CAROTENOIDES, RETINOL Y TOCOFEROLES
EN LA DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTE".



Fernando Granado Lorencio.

VOBO Directores de la Tesis



Enrique Rojas Hidalgo



Begonia Olmedilla Alonso




Dr. Enrique Rojas Hidalgo y Dra. Begoña Olmedilla Alonso han dirigido la Tesis titulada "Status nutricional de carotenoides, retinol y tocoferoles en la diabetes mellitus insulino-dependiente" que para optar al título de Doctor presenta D. Fernando Granado Lorenzo y certifican que han leído la versión final y están de acuerdo con el contenido de la misma.

Madrid, 14 Mayo 1998



Enrique Rojas Hidalgo



Begoña Olmedilla Alonso

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. Enrique Rojas-Hidalgo y la Dra. Begoña Olmedilla Alonso por su confianza y la dirección del presente trabajo. A la Dra. Rosa M^a Arahuetes por la tutoría de la presente Tesis y el ánimo transmitido al autor.

A los Dres. Pilar Manzano, Francisco Botella y Alberto Simal por su colaboración en la selección e información a los pacientes y la discusión de distintos aspectos clínicos relacionados con el presente trabajo. A Enrique Gil-Martínez por su participación en los análisis de muestras y a Isabel Millán por la realización y discusión de los diferentes estudios estadísticos.

A Pilar Martínez y Teresa Motilla, enfermeras del Servicio de Nutrición, por su entusiasmo y colaboración en el manejo y extracción de muestras a los muchos participantes en los diferentes estudios. A Elena Carbonell y Carmen Izquierdo por su trato a los voluntarios y ayuda en diferentes aspectos administrativos.

Mi especial agradecimiento a Inmaculada Blanco por su inestimable ayuda en la manipulación y análisis de datos, la edición del presente trabajo y, sobretodo, la paciencia mostrada con el autor.

Al Servicio de Bioquímica de la Clínica Puerta de Hierro por la realización de los análisis clínicos y a la Gerencia y Dirección de Gestión por el interés y apoyo mostrado hacia el desarrollo de los distintos Proyectos que han contribuido al presente trabajo.

Asimismo, agradezco al personal de la Cafetería y del Autoservicio de la Clínica su colaboración en el trato a los voluntarios y en la preparación de menús especiales para los estudios de biodisponibilidad. Al Fondo de Investigaciones Sanitarias (Proyecto FIS 92/0720 y 97/0966), Lilly S.A. y la Unión Europea (Proyecto AIR CT93/0888) por la financiación de los proyectos utilizados en la realización del presente trabajo.

A todos los voluntarios, pacientes diabéticos y familiares, mi agradecimiento por su participación, colaboración y entusiasmo mostrado durante la realización de los estudios.

A mi madre, por su confianza. A Fernanda y Javier, por su comprensión y apoyo, mi mayor agradecimiento.

*A mi padre
(D.E.P)*

**STATUS NUTRICIONAL DE CAROTENOIDES, RETINOL Y TOCOFEROLES EN LA DIABETES
MELLITUS INSULINO-DEPENDIENTE.**

INDICE

- 1.- Introducción.
- 1.1.- Estado nutricional. Generalidades.
- 1.2.- Métodos para la valoración del estado nutricional de carotenoides, retinol y tocoferol.
 - 1.2.1.- Generalidades.
 - 1.2.2.- Métodos recomendados.
- 1.3.- Carotenoides, retinol y tocoferoles.
 - 1.3.1.- Carotenoides.
 - 1.3.1.1.- Nomenclatura y estructura química.
 - 1.3.1.2.- Fuentes dietéticas e ingesta.
 - 1.3.1.3.- Funciones y actividad biológica.
 - 1.3.1.4.- Absorción y metabolismo.
 - 1.3.1.4.1.- Aspectos cualitativos de la absorción.
 - 1.3.1.4.2.- Aspectos cuantitativos de la absorción.
 - 1.3.1.4.3.- Metabolitos "in vivo".
Eliminación.
 - 1.3.1.5.- Transporte y distribución a tejidos.
 - 1.3.2.- Retinol.
 - 1.3.2.1.- Nomenclatura y estructura química.
 - 1.3.2.2.- Fuentes dietéticas e ingesta recomendada.
 - 1.3.2.3.- Funciones y actividades biológicas.
 - 1.3.2.4.- Absorción y metabolismo.
 - 1.3.2.5.- Transporte y distribución a tejidos.
 - 1.3.2.6.- Control homeostático de retinol en plasma.

1.3.3.- Vitamina E (Tocoferoles).

1.3.3.1.- Nomenclatura y estructura química.

1.3.3.2.- Fuentes dietéticas e ingesta recomendada.

1.3.3.3.- Funciones y actividades biológicas.

1.3.3.4.- Absorción y metabolismo.

1.3.3.5.- Transporte y distribución a tejidos.

1.4.- Determinantes del status sérico de carotenoides, retinol y tocoferoles.

1.4.1.- Factores dietéticos.

1.4.2.- Factores fisiológicos.

1.4.2.- Factores sociales y estilo de vida.

1.5.- Valores de referencia y puntos de corte ("cut-off points")

1.6.- Diabetes mellitus.

1.6.1.- Introducción.

1.6.2.- Carotenoides, retinol y tocoferol en la diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID).

2.- Objetivos.

3.- Sujetos.

3.1.- Grupo control

3.1.1.- Valores de referencia.

3.1.2.- Estudio familiar.

3.2.- Sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente.

3.2.1.- Población general.

3.2.2.- Estudio familiar.

3.3.- Estudio de seguimiento.

3.4.- Estudio de aclaramiento y biodisponibilidad.

3.5.- Consideraciones éticas.

4.- Material y métodos:

- 4.1.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).
 - 4.1.1.- Equipo de cromatografía.
 - 4.1.2.- Estándares y reactivos.
- 4.2.- Método de análisis.
 - 4.2.1.- Condiciones cromatográficas.
 - 4.2.2.- Preparación de la muestra.
 - 4.2.2.1.- Separación de la fracción de "lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL)".
 - 4.2.3.- Detección e identificación de compuestos en suero.
 - 4.2.4.- Cuantificación. Purezas de patrones y curvas de calibrado.
 - 4.2.5.- Límite de detección en Suero.
 - 4.2.6.- Control de calidad.
- 4.3.- Método para la evaluación de ingesta.
 - 4.3.1.- Desarrollo de un cuestionario de frecuencias semicuantitativo (CFS) para la evaluación de la ingesta de carotenoides.
 - 4.3.1.1.- Objetivos.
 - 4.3.1.2.- Selección de frutas y verduras.
 - 4.3.1.3.- Diseño del cuestionario.
 - 4.3.1.4.- Contenido de carotenoides en frutas y verduras.
 - 4.3.1.5.- Control de calidad, validación y reproducibilidad del cuestionario de frecuencias.
 - 4.3.1.6.- Procesamiento de los datos de ingesta.
- 4.4.- Métodos estadísticos.

5.- Resultados.

- 5.1.- Control de calidad de los datos. Precisión y exactitud.
- 5.2.- Status sérico, cuali y cuantitativo, de carotenoides, retinol y tocoferol en una población de pacientes DMID.

- 5.2.1.- Análisis cualitativo.
- 5.2.2.- Análisis cuantitativo.
 - 5.2.2.1.- Población diabética. Comparación con valores de referencia.
 - 5.2.2.2.- Estudio familiar.
 - 5.2.2.3.- Estudio de seguimiento.
- 5.3.- Ingesta dietética de carotenoides y sus niveles séricos.
 - 5.3.1.- Relación entre ingesta y suero.
 - 5.3.2.- Validación del cuestionario de frecuencias.
 - 5.3.3.- Reproducibilidad del método. Variaciones estacionales en la ingesta.
- 5.4.- Dieta "pobre" en carotenoides. Aclaramiento sérico de carotenoides.
- 5.5.- Biodisponibilidad de α - $+$ β -caroteno y luteína.
 - 5.5.1.- Respuesta en "TRL".
 - 5.5.2.- Respuesta en plasma.
- 6.- *Discusión.*
 - 6.1.- Control de calidad de los análisis.
 - 6.2.- Grupos de población.
 - 6.3.- Prevalencia de niveles marginales y "óptimos" en sujetos con DMID.
 - 6.4.- La diabetes mellitus como determinante del status sérico de carotenoides, retinol y tocoferol.
 - 6.4.1.-Tiempo de evolución de la enfermedad y presencia de retinopatía.
 - 6.4.2.- Control de la glucemia en la diabetes mellitus insulino-dependiente.
 - 6.5.- Correlación entre los compuestos analizados en suero.
 - 6.6.- La dieta como determinante del status sérico de carotenoides.
 - 6.6.1.- Validación y reproducibilidad del CFS.
 - 6.6.2.- Ingesta dietética y niveles séricos de carotenoides.
 - 6.7.- Biodisponibilidad de carotenoides.

7.- Conclusiones.

8.- Bibliografía.

9.- Apéndices.

10.-Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral.

(*) Con el fin de facilitar la lectura, las tablas y figuras se incluyen al final de cada capítulo.

Lista de abreviaturas utilizadas.

- ARAT:** Acil-CoA-retinol-acil transferasa.
- ATBC:** α -Tocopherol and β -carotene Cancer Prevention Study.
- AUC:** Area de la curva de concentraciones frente al tiempo.
- BMI:** Índice de masa corporal.
- CARET:** β -carotene and Retinol Efficacy Trial.
- CFS:** Cuestionario de frecuencias semicuantitativo.
- CIC:** Citología por impresión conjuntival.
- C_{máx.}:** Concentración máxima.
- CRBP:** Proteína intracelular "ligadora" de retinol.
- CV:** Coeficiente de variación.
- DMID:** Diabetes mellitus insulino-dependiente.
- DT:** Desviación típica.
- EN:** Estado nutricional.
- HbA_{1c}:** Hemoglobina glicada.
- HDL:** Lipoproteína de alta densidad.
- HMG-CoA-reductasa:** Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa.
- HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.
- ICT:** Impresión conjuntival por transferencia.
- IDL:** Lipoproteína de densidad intermedia.
- INSALUD:** Instituto Nacional de la Salud.
- LC-MS:** Cromatografía líquida-espectrometría de masas.
- LDL:** Lipoproteína de baja densidad.
- LRAT:** Lecitin-retinol-acil transferasa.
- LRP:** Proteína relacionada con el receptor LDL.
- MAPA:** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- NMR:** Resonancia magnética nuclear.
- PHS:** Physycian's Health Study.
- RAR:** Receptores nucleares para ácido (trans) retinoico.
- RBP:** Proteína "ligadora" de retinol.
- RDA:** Raciones dietéticas recomendadas.
- RDR:** Prueba de respuesta a dosis relativa.
- RDR (M):** Prueba de respuesta a dosis relativas (modificado).
- RE:** Equivalentes de retinol.
- RXR:** Receptores nucleares para ácido (9-cis) retinoico.

+S30DR: Respuesta tras dosis durante 30 días.

TRL: Fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos.

TTR: Transtiretina (prealbúmina).

UI: Unidades de insulina.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

WHO: Organización Mundial de la Salud.

"De interés especial para el médico de clientela con práctica a la cabecera del enfermo, es todavía el hecho de que las vitaminas pueden desplegar, además de las actividades propias de toda substancia activa....., otras acciones independientes de las primeras".

Stepp, Künnau y Schroeder (1939).

"In fashioning our chemical world nature created a marvelous chemical structure, the double bond".

...."A carotenoid-free world would be crab to behold and a retinoid-free world....., would be swathed for us in eternal darkness". ()*

J.A. Olson

(*) *"Al modelar nuestro mundo orgánico, la naturaleza creó una estructura química maravillosa, el doble enlace".*

..... "Un mundo sin carotenoides sería monótono de observar igual que un mundo libre de retinoides....., nos sumiría en la eterna oscuridad". J. A. Olson.

INTRODUCCIÓN

STATUS NUTRICIONAL DE CAROTENOIDES, RETINOL Y TOCOFEROLES EN LA DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDIENTE.

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- Estado nutricional. Generalidades.

El estado de nutrición (EN) de un individuo puede definirse como el equilibrio entre el ingreso y el gasto de nutrientes. El resultado entre las necesidades nutricionales y el grado en que estas son satisfechas será el índice de un buen o mal estado nutricional y su valoración metódica en grupos de población la que proporciona datos objetivos para detectar situaciones con escasas manifestaciones clínicas (Rojas-Hidalgo, 1990) y establecer programas de intervención (Fidanza, 1994).

El presente trabajo se centra en el estudio del status nutricional de carotenoides y vitaminas liposolubles (retinol, α - y γ -tocoferol) en sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente. El concepto de **vitamina** es más fisiológico que químico, y engloba una serie de compuestos orgánicos responsables de diversas actividades biológicas en el organismo. En cuanto a los carotenoides, constituyen un grupo de pigmentos liposolubles (> 600 en la naturaleza) relacionados con la vitamina A al funcionar algunos de ellos como precursores de retinol. El hombre no los puede sintetizar y los ingiere a través de los alimentos, encontrándose en sangre sólo algunos de los presentes en la dieta.

Hoy día, el interés en los micronutrientes (sustancias esenciales para la actividad vital cuyas Recomendaciones de Ingesta Diaria - RDA - y presencia en la dieta se estiman en μg o mg) se basa en el destacado papel de algunos de ellos como antioxidantes, así como su intervención en la proliferación, diferenciación celular y funciones inmunológicas, lo que ha dado un nuevo impulso sobre la importancia de su estudio y valoración en el organismo (Van den Berg, 1993a) y su posible papel en la prevención de enfermedades degenerativas (cataratas, afecciones cardiovasculares, cáncer, complicaciones tardías de la diabetes, etc).

El **estado nutricional** es un concepto fundamental cuando se aplica a poblaciones. No obstante, su validez en el ser humano implica el estudio de un determinado nutriente, así como las complejas interacciones con otros nutrientes y no nutrientes de la dieta. En este contexto, el desarrollo de métodos analíticos validados para la identificación de **biomarcadores de riesgo** - como medida de exposición frente a un estado fisiopatológico- y de conceptos como **biodisponibilidad** - proporción de nutriente que se absorbe y llega a las células para su uso o almacenamiento- y **bioconversión** - transformación a compuesto fisiológicamente activo- resultan fundamentales para establecer el papel de los micronutrientes en la salud y su relación con ciertas enfermedades, así como para evaluar la necesidad de intervención terapéutica.

1.2.- Métodos para la determinación del estado nutricional de carotenoides, retinol y tocoferol.

1.2.1.- Generalidades.

El EN puede valorarse a partir de información extraída de los siguientes métodos:, 1) examen clínico y/o antropométrico, 2) evaluación dietética y 3) determinación de marcadores bioquímicos y/o inmunológicos. En la evaluación del estado nutricional vitamínico, se plantean además cuestiones como qué métodos están disponibles, cómo interpretar los resultados y qué "puntos de corte" deben establecerse (Rojas-Hidalgo, 1990).

Los métodos dietéticos y clínicos, aunque son muy utilizados en la evaluación de riesgos nutricionales a nivel de poblaciones o para detectar la presencia de deficiencias, en general, son menos específicos y poco sensibles, por lo que son inadecuados a la hora de determinar estados "marginales" de vitaminas (Van den Berg, 1993a).

En epidemiología nutricional, la estimación de la ingesta de alimentos y nutrientes es de gran importancia. Mediante métodos dietéticos puede obtenerse información sobre la cantidad y calidad de alimentos consumidos por un individuo o población. Estos métodos aunque sólo aportan datos sobre hábitos alimentarios, bien a corto plazo o en épocas pasadas (incluso años), pueden ser de utilidad a la hora de clasificar individuos de una determinada población según la ingesta de un nutriente. Cada método de evaluación de consumo de alimentos tiene distintas limitaciones y, hoy día, no existen "métodos de referencia" (Alberti-Fidanza y Porrini, 1994). La exposición a un nutriente se puede basar en medidas de ingesta dietética a partir de alimentos (y/o suplementos nutricionales), o en la determinación de marcadores bioquímicos de nutrientes en muestras de tejidos disponibles.

Los métodos analíticos tradicionales utilizados para la determinación de carotenoides, vitamina A y vitamina E no permitían la caracterización y cuantificación de los distintos compuestos que presentan actividad vitamínica de forma individualizada (Nieremberg y cols, 1989a). Convencionalmente, las muestras eran sometidas a extracción con solventes orgánicos (con o sin saponificación), seguida de reacciones químicas (reacción de Carr-Price para vitamina A; reacción de Emmerie-Engel para tocoferol) y medición del extracto por espectrofotometría. En los años 70, la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) - como método no destructivo, reproducible y de gran resolución- ha hecho posible la determinación individualizada de estos compuestos permitiendo el estudio de su distribución en alimentos y tejidos biológicos y contribuyendo al conocimiento de su metabolismo en el hombre.

Los diferentes enfoques para la evaluación del status de carotenoides, vitamina A y E se muestran en la tabla 1. De ellos, la identificación de marcadores bioquímicos se considera objetiva y especialmente útil para identificar individuos en situaciones de "riesgo" en estadios tempranos - bajos depósitos corporales sin síntomas de enfermedad o marcadores de toxicidad vitamínica- (Van den Berg, 1994). Entre los métodos bioquímicos, se pueden distinguir dos grupos diferentes (Solomons y Allen, 1983):

1) Métodos directos o estáticos.- Miden la concentración del micronutriente o sus metabolitos en un medio biológico accesible (células sanguíneas, suero, orina o tejidos);

2) Métodos indirectos, funcionales o dinámicos.- Se mide "in vitro" o "in vivo" la respuesta de un parámetro/función fisiológica dependiente del micronutriente.

Estos dos tipos de pruebas pueden reflejar dos aspectos diferentes del estado nutricional vitamínico; el cuantitativo relacionado con el contenido corporal y el cualitativo de la función dependiente del micronutriente a nivel celular, tisular o del organismo. (Van den Berg, 1993a).

1.2.2.- Métodos recomendados.

En la Tabla 2 se muestran los diferentes métodos disponibles y recomendados. La elección del método apropiado depende de factores como el objetivo del estudio, accesibilidad de la muestra, tamaño de los grupos o poblaciones, etc.

Las pruebas estáticas se consideran útiles y sensibles para el muestreo rutinario y para la evaluación del estado depleción/repleción de depósitos corporales (de Pee y cols, 1997). Así, concentraciones hepáticas de vitamina A son consideradas como el mejor indicador de status de vitamina A corporal, aunque no es un método aplicable a poblaciones. Los métodos bioquímicos - retinol sérico y MRDR - e histológicos (CIC), no proporcionan estimaciones cuantitativas de reservas de vitamina A y no pueden ser utilizadas para clasificar individuos en el rango completo de status de vitamina A (Haskell y cols, 1997). En el caso de la vitamina E, la relación vitamina E/lípidos constituye un indicador más fiable ya que ajusta la influencia de los lípidos sobre los niveles de α -tocoferol en suero (Morrisey y cols, 1993).

Por tanto, la evaluación mediante métodos estáticos puede no ser totalmente adecuada en términos de salud pública, especialmente cuando se aplica a individuos que presentan deficiencias preclínicas o marginales (ej. vitamina A) (Olson, 1997). La fiabilidad dependerá, en parte, del método utilizado y variabilidad analítica e inter-individual, aunque los criterios de interpretación (puntos límite o de corte) y la variabilidad intra-individual juegan un papel importante (Van der Berg, 1993a, 1994; de Pee y cols, 1997).

Por su parte, el enfoque funcional requiere de una mayor información sobre la cinética y metabolismo de los distintos micronutrientes bajo diferentes condiciones dietéticas y situaciones fisiológicas (Van den Berg, 1993a; Piertzik, 1994). En este sentido,

las pruebas funcionales utilizadas (ver tabla 1) requieren una mayor validación dado que no son aplicables de forma rutinaria o en estudios de campo y que algunos métodos (RDR, CIC) sólo son útiles en determinados rangos de reservas hepáticas de vitamina A (Olson, 1997).

En general, las pruebas funcionales son difíciles de estandarizar, presentan gran variabilidad intraindividual y suponen un costo económico excesivamente elevado. Estas pruebas serían útiles para confirmar alteraciones detectadas con métodos estáticos, validación biológica de "puntos límite o de corte" de indicadores estáticos y para definir estados vitamínicos "óptimos" (Van den Berg, 1993a). Por último, dada la ausencia de parámetros fisiológicos o bioquímicos funcionales y cuantificables que respondan específicamente a carotenoides, hoy día no hay indicadores formales del status de estos compuestos, el cual se considera sinónimo de concentraciones en suero o tejidos (Parker, 1997).

1.3.- Carotenoides, retinol y tocoferoles.

En 1909, Stepp observó que los ratones blancos, sometidos a un régimen completo pero carente de sustancias solubles en alcohol y éter, no podían sobrevivir. McCollum y Davis (1913) describen un factor liposoluble en la grasa de mantequilla, posteriormente caracterizado como **vitamina A**, necesario para estimular el crecimiento de las ratas alimentadas con una dieta incompleta. Dado que algunos extractos de plantas coloreadas tenían efectos similares, se pensó que estos pigmentos - más tarde definidos como **carotenoides**-podían ser transformados biológicamente en **vitamina A** (retinol). Esta conversión biológica fue demostrada por Moore en 1930, coincidiendo con la elucidación de las estructuras del retinol y los carotenoides por Karrer (Stepp y cols., 1939; Machlin, 1984; Olson, 1992).

Evans y Bishop describen, por primera vez (1922), un factor dietético liposoluble -denominado en 1924 por Sure, **vitamina E**-necesario para el desarrollo del embarazo en la rata (Stepp y cols., 1936; Machlin, 1984). En 1936, Evans y cols. logran el aislamiento de dos factores químicamente homogéneos (α - y β -tocoferol), con actividad de vitamina E, procedentes del aceite de germen de trigo y en 1938, Fernholz establece la estructura química del α -tocoferol (Stepp y cols., 1939; Machlin, 1984).

Desde el punto de vista químico, los carotenoides (y retinoides naturales) y tocoferoles pertenecen a la fracción insaponificable de los lípidos. Forman parte del grupo de los terpenos clasificándose como tetraterpenos (C_{40} , carotenoides) y diterpenos (C_{20} , tocoferoles). Por su parte, los retinoides naturales derivan de los carotenoides por rotura de éstos a nivel del enlace 15-15' pudiendo sufrir posteriores modificaciones en su estructura.

1.3.1.- **CAROTENOIDES.**

1.3.1.1.- **Nomenclatura y estructura química.**

El término carotenoides responde a un grupo de pigmentos liposolubles presentes en plantas y microorganismos que no pueden ser sintetizados por los animales. Formados en su mayoría por 8 unidades de isopreno, poseen una estructura de dobles enlaces conjugados (alternancia de simples y dobles enlaces) y las moléculas están característicamente invertidas en su mitad (Zechmeister, 1944, 1962; Isler, 1971; Bauerfeind, 1981; Weedon, 1995) (figura 1).

Se han descrito más 600 carotenoides en la naturaleza con más de 60 grupos funcionales (Straub, 1987). Dentro de los carotenoides se diferencian dos grupos: carotenos o compuestos hidrocarburoados

(menos del 10%) y xantofilas u oxicarotenos, que presentan oxígeno en su estructura, generalmente en los anillos terminales. Los carotenoides objeto de este estudio se muestran en las figuras 2-4. Debido a la presencia de dobles enlaces, los carotenoides presentan isomería "cis-trans" o "Z/E" (isómeros geométricos), los cuales pueden ser interconvertidos mediante la luz, energía térmica o reacciones químicas (Zechmeister, 1944). Recientemente, el interés en las formas "cis" se debe al papel biológico de los "cis-retinoides" (Mangelsdorf, 1994) y la posibilidad de semejante función en los carotenoides o su actividad como precursores de aquellos.

1.3.1.2.- Fuentes dietéticas e ingesta.

De los carotenoides presentes en la naturaleza, sólo algunos llegan al hombre a través de la cadena alimentaria, ya sean inalterados o parcialmente metabolizados (Bendich y Olson, 1989). En la dieta de países occidentales, las principales fuentes de carotenoides son las frutas, hortalizas y verduras (Chug-Ahuja y cols., 1993; Block, 1994; Varela y cols, 1995), aunque otros alimentos de origen animal (mantequilla, leche, huevo, salmón, etc), así como aditivos alimentarios también contribuyen al aporte total en la alimentación (Block, 1994).

La ingesta de carotenoides - cuali y cuantitativamente- varía según las poblaciones. En España, según los distintos estudios, la ingesta oscila entre 3.5-8.5 mg/persona/día (Varela y cols, 1995; Granada y cols, 1996; Olmedilla y cols., 1997c) y presenta importantes variaciones estacionales (Granada y cols., 1996; Olmedilla 1997c, 1997d).

Aunque no suelen darse recomendaciones de ingesta de carotenoides, éstos se tienen en cuenta al determinar la actividad vitamínica A de los alimentos/dietas y estimar los requerimientos de vitamina A (Food and Nutrition Board, 1991). Según establece la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1988), la actividad

provitamina A (Equivalentes de retinol -RE-) de un alimento a partir de los carotenoides viene dada por:

$\mu\text{g RE} = 1/6 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno} + 1/12 \mu\text{g otros carotenoides provitamínicos.}$

Asimismo, para alimentos con cierto contenido de grasa (p.e. leche), la tasa de conversión del β -caroteno a retinol se considera más eficaz y se establece en 1/3 (Brubacher y Weiser, 1985). Sin embargo, estos factores parecen estar sobreestimados proponiéndose los siguientes factores de conversión dependiendo de la matriz del alimento (West, 1996): 1/2 para alimentos grasos (grasas, margarina); 1/10 para frutas y batata; 1/25 (1/15-1/50) para hortalizas de hoja verde; 1/25 (1/15-1/50) para zanahorias. Por otro lado, dado que el factor de conversión de β -caroteno en retinol es menor conforme aumenta su contenido en la dieta, la WHO (1988) ha propuesto factores de 1 μg de retinol equivalente a 4 μg , 6 μg o 10 μg de β -caroteno según que la ingesta de carotenoides totales en la comida sea, 1 mg, de 1-4 mg o > 10 mg, respectivamente.

1.3.1.3.- Funciones y actividad biológica.

En el hombre, la única función probada de algunos carotenoides - que actualmente explica su consideración como micronutrientes- es su papel como precursores de retinol (vitamina A) (Parker, 1997). Del total de carotenoides descritos, menos del 10% pueden ser metabolizados a retinol y funcionan como precursores de vitamina A en mamíferos (Bauerfeind, 1981; Olson, 1989) (tabla 3). El requisito estructural para la capacidad provitamínica A supone la presencia de anillo de β -ionona intacto unido a una cadena poliénica de 7-15 átomos de carbono.

En 1960, Glover sugirió que podrían existir dos vías de conversión de β -caroteno a retinol: 1) rotura central a nivel del enlace 15-15' del β -caroteno y 2) rotura excéntrica a nivel de algún otro enlace central y posterior acortamiento de la cadena hasta formar retinol.

A favor de la rotura central se aportaron pruebas por Olson y Hayaishi (1965) y Goodman y cols. (1966). El enzima, denominado β -carotenoide-15-15'-dioxigenasa (E.C: 1.13.11.21) requiere oxígeno molecular como co-sustrato y su actividad, sin embargo, no es específica para el β -caroteno ya que otros carotenoides provitamínicos también son convertidos a retinol. Por otro lado, la rotura excéntrica de β -caroteno, bajo ciertas circunstancias, puede generar otros productos de oxidación como β -apo-13'-carotenona, β -apo-8'-carotenal y otros β -apo-carotenales (10', 12', 14') identificados en homogenizados de tejidos (Tang y cols, 1991; Wang y cols, 1991).

Aunque la deficiencia en vitamina A sigue siendo un problema de salud pública prioritario en países en desarrollo, en el mundo industrializado el interés se ha dirigido hacia otras actividades biológicas y sus efectos promotores de la salud (Tabla 4), así como su potencial uso en la prevención de enfermedades crónicas (Parker, 1996a).

Los resultados de numerosos estudios epidemiológicos y de laboratorio sugieren la importancia del β -caroteno y otros carotenoides (tanto en la dieta como en niveles séricos) frente a distintos tipos de cáncer (Peto y cols, 1981; Ziegler, 1993; Garewall, 1995; Van Poppel y Goldbohm, 1995; Mayne, 1996; Steinmetz y Potter, 1996). Esta asociación inversa parece estar condicionada, entre otros factores, por el estado nutricional de la población

objeto de estudio. Así, estudios de suplementación en Linxian (China) (Blot y cols, 1993; Li y cols, 1993) redujeron la incidencia de cáncer gastrointestinal (tracto superior) y la mortalidad total en una población con status marginal de vitaminas y minerales. Sin embargo, los resultados de tres grandes estudios de intervención con β -caroteno, sólo o en combinación con otras sustancias (retinol, α -tocoferol, aspirina) (ATBC Study; Physician's Health Study; CARET) parecen indicar que en personas con un estado nutricional adecuado (aunque considerados "grupo de riesgo" -fumadores y trabajadores con exposición al asbesto-), la suplementación con β -caroteno incluso provoca un aumento sobre la mortalidad total y determinados tipos de cáncer (ATBC, CARET) y no tiene ningún efecto sobre la mortalidad total (Physician's Health Study) y enfermedad cardiovascular (PHS's; ATBC, CARET) (Hennekens, 1996; Rowe, 1996; Mayne, 1996).

Actualmente, los datos disponibles parecen indicar que la suplementación con β -caroteno no ejerce ningún efecto beneficioso sobre la incidencia de los principales tipos de cáncer en los países industrializados, aunque sí reduce lesiones precancerosas en otros tipos menos frecuentes (cuello uterino y cavidad oral) (Mayne, 1996). La principal conclusión es que el beneficio, a nivel de salud pública, debe conseguirse mediante el consumo de frutas y verduras (ricas en carotenoides y otros compuestos con actividad protectora) (Steinmetz, y Potter, 1996; Mayne, 1996; Rowe, 1996), y que el uso de suplementos de β -caroteno no es recomendable, especialmente en fumadores (Mayne, 1996; Hathcock, 1997).

Asimismo, estudios epidemiológicos sugieren que dietas ricas en β -caroteno y otros carotenoides pueden tener un efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares (Gey y cols., 1987; Gaziano y Hennekens, 1993; Gerster, 1992; Kolhmeier y Hastings, 1995), aunque esto no ha podido ser demostrado en estudios de intervención con carotenoides aislados (Physician's Health Study), observándose incluso un aumento de la mortalidad por enfermedad isquémica, infarto

cerebral y otras enfermedades cardiovasculares (ATBC, CARET) (ATBC Study Group, 1994; Omenn y cols, 1996).

Por otro lado, algunos carotenoides de la dieta sin actividad provitamínica A (luteína, zeaxantina) pueden jugar un papel importante en la prevención y retraso de dos enfermedades oculares asociadas con el envejecimiento (catarata y degeneración macular) conforme a lo observado en estudios epidemiológicos (Jacques y cols, 1988; Gerster, 1989; Bunce y cols., 1990; Taylor y cols, 1995; Snodderly, 1995).

Aunque los carotenoides han sido "popularizados" como antioxidantes, existe poca evidencia de que dicha actividad explique sus efectos anticarcinógenos (Krinsky, 1994; Stahl y cols, 1994). Diferentes carotenoides, con y sin actividad provitamínica A, y metabolitos (p.e 2,6-ciclo-licopeno-1,5,-diol) presentan actividad antitumoral "in vitro" la cual podría ser mediada a través de efectos inmunomoduladores, regulación génica de proteínas para comunicación intercelular, inhibición de factores de crecimiento y detención del ciclo celular (Prabhala y cols, 1993; Bertram y cols, 1995, 1996; Stahl y Sies, 1996a; Sharoni y cols, 1996; Levi y cols, 1996). Este efecto lo ejercerían actuando bien como moléculas intactas, como metabolitos con efectos celulares similares a los retinoides (Bertram, 1994; Bertram y cols, 1996) o como precursores de retinoides activos (Stahl y Sies, 1996a).

1.3.1.4.- Absorción y metabolismo.

1.3.1.4.1.- Aspectos cualitativos de la absorción.

El hombre no parece presentar diferencias cualitativas en la absorción de carotenoides de la dieta aunque la cinética y transporte en plasma difiere entre ellos, posiblemente, debido en parte a su polaridad (Van Vliet, 1996). Una cantidad apreciable puede ser absorbida mediante difusión pasiva por la mucosa intestinal, siendo

incorporada sin modificar en los quilomicrones y secretada al torrente circulatorio (Erdman y cols, 1993; Bowen y cols, 1993; Parker, 1996a).

Alrededor de 40-50 carotenoides están disponibles en la alimentación para ser absorbidos, metabolizados o utilizados por el organismo humano (Khachick y cols, 1991). En el suero humano, se han identificado alrededor de 34 carotenoides, incluyendo 13 isómeros y 8 metabolitos (Khachick y cols, 1992; Khachick y cols, 1997). De ellos, luteína, zeaxantina, licopeno, β -criptoxantina, α - y β -caroteno, representan cerca del 90% o más de los carotenoides circulantes en el hombre (Bieri, 1985). Sin embargo, no todos los carotenoides de la dieta se encuentran en plasma (p.e. epoxi-carotenoides: violaxantina, neoxantina) (Khachick y cols, 1991). Asimismo, la ausencia de ésteres de xantofilas en plasma y en quilomicrones (Khachick y cols, 1991; Wingerath y cols, 1995) tras dietas habituales, sugiere que éstas se absorben tras sufrir hidrólisis.

Se han descrito distintos factores que afectan tanto a la absorción como a su conversión a retinol de los carotenoides de la dieta (El Gorab y cols, 1975; Hollander y Ruble, 1978; Erdman y cols, 1993; De Pee y West, 1996). Recientemente revisados (De Pee y West, 1996), West ha acuñado el término SLAMANGHI para hacer referencia a estos factores que, en su opinión, condicionan la absorción y conversión a vitamina A de los carotenoides: eSpecies de carotenoides (p.e. β -caroteno), uiones moleculares (presencia de ésteres), cantidad de carotenoides consumidos (mayor respuesta relativa a menores concentraciones), Matriz del alimento (inclusión en gotas lipídicas, cloroplastos), modificadores de la Absorción (grasa, pectina), status Nutricional del sujeto (p.e. nivel de retinol, proteínas), factores Genéticos (p.e. síndromes de malabsorción), factores relacionados con el Huésped (p.e. parásitos intestinales), e Interacciones (p.e. matriz compleja de alimento + parásitos + medicamentos).

Uno de los factores que más afecta la biodisponibilidad de los carotenoides es su liberación de la matriz física (alimento) en la cual son ingeridos y su disolución en la fase lipídica (Parker, 1996a). El tratamiento térmico de hortalizas y verduras, parece mejorar la biodisponibilidad de los carotenoides en muchos alimentos (Micozzi y cols, 1992; Granado y cols, 1992; Olmedilla y cols, 1996b; Hart y Scott, 1995; Stahl y cols, 1992a; Rodríguez-Amaya, 1997; Gartner y cols, 1997), probablemente al disociar los complejos proteína-carotenoide (Parker, 1996a) y promover la rotura de paredes celulares inducida por tratamiento térmico (Stahl y Sies, 1996b).

Existen diferentes pruebas sobre interacciones entre carotenoides durante la absorción e incorporación a quilomicrones. En humanos, el β -caroteno reduce la respuesta a la administración de cantaxantina (White y cols, 1994) y de luteína (Kostic y cols, 1995) mientras que aumenta la de α -caroteno y licopeno (Wahlquist y cols, 1994; Johnson y cols, 1997). Por su parte, Van den Berg y cols (1996a) han descrito una menor respuesta plasmática a β -caroteno cuando se administra de forma conjunta con luteína aunque éste efecto no se produce con licopeno. Respecto a la β -criptoxantina, sus niveles séricos no parecen alterarse tras 4 meses de administración de β -+ α -caroteno, sólo o en combinación con α -tocoferol (Olmedilla y cols, 1997d) y , posiblemente, tampoco se afecte por otros carotenoides aportados por una dieta mixta (Yeum y cols, 1996).

En conjunto, los resultados sugieren que las interacciones entre carotenoides se reducen a las presentadas entre carotenoides hidrocarbonados y oxicarotenoides (xantofilas) y que ésta se produce durante la absorción intestinal en humanos, bien sea a nivel de lumen intestinal o de enterocito (Paetau y cols, 1997). Aunque se ha descrito una absorción y/o incorporación en lipoproteínas preferencial de isómeros "trans" (Stahl y cols, 1993a; 1995; Gaziano y cols, 1995; Parker 1996b; You y cols, 1996) y de luteína y zeaxantina (Gartner y cols, 1996), el hecho de que el hombre absorba

una gran variedad de carotenoides con diferentes clases estructurales, sugiere la ausencia de un transporte discriminatorio aunque sí saturable (Parker, 1996a; Van Vliet y cols, 1996).

1.3.1.4.2.- Aspectos cuantitativos de la absorción.

Dado la ausencia de modelos animales apropiados para estudiar todos los aspectos del metabolismo de carotenoides en el hombre, la información disponible proviene de diferentes enfoques, entre los que cabe señalar estudios de balance (ingesta vs contenido en heces), respuesta en plasma, respuesta en quilomicrones y estudios de "aclaramiento" en plasma.

En la mayoría de los casos, las estimaciones cuantitativas de la eficacia de absorción de carotenoides se basan en valorar la cantidad de carotenoides que entra en plasma o se incorpora en quilomicrones durante la absorción (frente al tiempo) en estudios de respuesta a dosis únicas - *test de tolerancia*- o múltiples - *administración diaria*- (Solomons y Bulux, 1993; Parker, 1997).

La eficacia de absorción, según los diferentes tipos de estudio y dosis utilizadas, varía entre 5-80% y decrece marcadamente al aumentar la ingesta (Blomhoff y cols, 1992; Erdman y cols, 1993; Bowen y cols, 1993; Parker, 1996a; Van den Berg, 1993b). Esta variabilidad puede deberse, de un lado, a que los valores de "área bajo la curva" (AUC) plasmáticos, no son proporcionales a la dosis empleada (Parker, 1996b, 1997). De otro, a que el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (C-máx.) en suero tras suplementación puede estar relacionado con la estructura química y polaridad del carotenoide (Kostic y cols, 1995; Van Vliet, 1996). En muchos casos, no se tiene en cuenta la conversión en retinol, la cual puede modificarse por un status bajo de retinol (Solomons y Bulux, 1993; De Pee y West, 1996) pero no si éste es adecuado (Parker, 1997).

Mucho de lo que sabemos hoy día sobre el metabolismo del β -caroteno en humanos proviene de dos estudios de los años 60 en pacientes hospitalizados y canulados en el conducto torácico (Goodman y cols, 1966; Blomstrad y Werner, 1967). En ellos, se señalaba a los ésteres de retinilo como el principal producto del metabolismo del β -caroteno en el sistema linfático (61-88% de marcaje recuperado), encontrando cantidades variables de β -caroteno inalterado (hasta el 30%). En sujetos control, utilizando curvas de respuesta en lipoproteínas ricas en triglicéridos, Van Vliet y cols (1995) han estimado la conversión de β -caroteno en retinol en un 35-71% - asumiendo un rendimiento de 2 mol de retinol por mol de β -caroteno. Novotny y cols (1995) utilizando β -caroteno marcado y modelos multicompartimentales - con una relación de conversión de β -caroteno a retinol de 1:1 - estimaron que el 20% del β -caroteno absorbido (22%) se transformaba en retinol. La utilización de β -caroteno marcado con ^{13}C (Parker y cols, 1993 y 1996b; You y cols, 1996) y deuterio (Hoppe y cols, 1996) ha permitido estudiar este aspecto a dosis típicas de la dieta (1 mg/día). Así, se observa que, prácticamente, todos los individuos "responden" a la dosis administrada y que la eficacia de conversión de β -caroteno a retinol es similar en dosis entre 1 y 15 mg. A dosis farmacológicas (p.e. 50 mg) el porcentaje de conversión decrece y es muy variable según los sujetos, lo que sugiere que la capacidad de conversión a retinol es saturable (Parker, 1996b).

En general, diversos factores pueden intervenir en la interpretación de la respuesta plasmática en estudios de biodisponibilidad (Parker, 1997): por un lado, bajas respuestas (baja concentración plasmática) pueden indicar una alta tasa de conversión a retinol; por otro, la presencia de concentraciones endógenas de carotenoides hace necesario utilizar dosis elevadas lo que puede alterar el balance endógeno y provocar saturación de procesos

metabólicos o de transporte. Por último, el β -caroteno no se transfiere de forma rápida entre lipoproteínas (posiblemente al estar en el núcleo) mientras que las xantofilas (posiblemente en la superficie) probablemente sufran una transferencia más rápida, resultando en un equilibrio entre LDL y HDL. El rápido intercambio entre lipoproteínas influye sobre las concentraciones en plasma y lipoproteínas frente al tiempo, hecho utilizado para evaluar la biodisponibilidad de carotenoides.

1.3.1.4.3.- *Metabolismo "in vivo". Eliminación.*

Actualmente, no se conoce el grado de metabolismo post-absortivo de β -caroteno a vitamina A (hepático o extrahepático) y se dispone de poca información sobre los carotenoides no-provitamínicos que se absorben intactos (Parker, 1997).

Algunos de los carotenoides presentes en el suero humano parecen corresponder a metabolitos formados "in vivo". Se ha detectado la presencia de posibles metabolitos por oxidación de la luteína, caracterizados como mono-ceto-mono-hidroxi y di-ceto-carotenoides (Khachick y cols, 1992; 1995a; Khachick y cols, 1997). La escasa presencia de estos compuestos en la dieta y su aumento en plasma tras suplementación con luteína y zeaxantina (Khachick y cols, 1995a; Olmedilla y cols, 1997a) sugiere su formación "in vivo". Asimismo, se han identificado productos de deshidratación de luteína (anhidroluteína I y II) (Khachick y cols, 1992; 1995b; Khachick y cols, 1997) sintetizados en condiciones ácidas similares a las encontradas en el estómago (Khachick y cols, 1995b), mientras que el aumento de zeaxantina tras suplementación con luteína sugiere la posibilidad de que ésta se forme "in vivo" a partir de luteína de la dieta (Bertram, 1996).

Metabolitos oxidativos (derivados hidroxilados) de licopeno en suero se han caracterizado como 2,6-ciclo-licopeno-1,5-dioles

(Khachick y cols 1995a, 1996), los cuales podrían provenir del licopeno-5-6-epóxido de la dieta (tomate y derivados) tras modificación enzimática o química en el organismo (Stahl y Sies, 1996b).

Asimismo, en estudios administrando 9-cis- β -caroteno marcado (^{13}C), la ausencia de marcaje en 9-cis- β -caroteno y 9-cis-retinol del suero y su presencia en "trans"- β -caroteno y "trans"-retinol, indica que no se trata de absorción preferencial sino de isomerización "in vivo" durante la ingestión, absorción y/o secreción al torrente circulatorio (Parker, 1996b; You y cols, 1996).

Respecto a las vías y cinética de eliminación de carotenoides, existen pocos resultados en el hombre. Los carotenoides no parecen ser eliminados en orina (Bowen y cols, 1993) y son eliminados, sin modificar, en la bilis tanto en condiciones normales como patológicas (Leo y cols, 1995). Asimismo, todos los carotenoides descritos en suero, incluyendo posibles metabolitos e isómeros, se han caracterizado también en leche materna (Khachick y cols, 1997).

En ausencia de ingesta de carotenoides, los niveles de carotenoides en plasma caen al 10-75% de su valor inicial en 2-3 semanas dependiendo del carotenoide y, posiblemente, de los valores iniciales (tabla 5). Se observa una intensa bajada tras 2-4 días la cual es más lenta posteriormente (Rock y cols, 1992a). Esto sugiere la existencia de dos reservas corporales con diferente velocidad de recambio (Rock y cols, 1992a; Micozzi y cols, 1992). Basados en este tipo de estudios, Rock y cols (1992a) estimaron la vida media en plasma de distintos carotenoides (Tabla 6).

En estudios de suplementación (con dosis únicas o intermitentes), se han determinado distintos parámetros biocinéticos (vida media, tiempo de permanencia en el organismo), y el tiempo necesario para recuperar los niveles iniciales (tabla 6). La vida

media en plasma depende de la estructura química del carotenoide (Kübler y von Renersdorf, 1993; Paetau y cols, 1997), varía con la cantidad administrada (Dimitrov y Ulley, 1989), es más rápido en hombres que en mujeres (Kübler, 1989) y en fumadores (Masaki y cols, 1993). No obstante, parece que la disminución de los niveles de carotenoides en plasma en ausencia de ingesta es similar a la observada tras administrar dosis únicas (Kübler, 1989). En general, cabe señalar que no existe información respecto a los factores que determinan su velocidad de recambio así como las vías de eliminación (Parker, 1996a).

1.3.1.5.- Transporte y distribución en tejidos.

En humanos y animales, los carotenoides son transportados en plasma en lipoproteínas. La distribución de carotenoides entre distintas fracciones de lipoproteínas parece estar influenciada por su polaridad, siendo los carotenoides hidrocarburados (p.e. β -caroteno, licopeno) transportados fundamentalmente por las LDL, mientras que los más polares (p.e. luteína, zeaxantina) estarían más uniformemente distribuidos entre las distintas clases de lipoproteínas (Krinsky y cols, 1958; Parker, 1996a; Traber y cols, 1994; Erdman y cols, 1993; Clevidence y Bieri, 1993; Vogel y cols, 1997).

Aunque la cinética de transferencia de carotenoides entre lipoproteínas no se ha establecido, estudios de suplementación parecen señalar que cierta cantidad de β -caroteno es transferido desde los quilomicrones hacia las HDL (Traber y cols, 1994) mientras que el aumento en LDL - tras 24-48 horas de administrar la dosis- parece indicar el recambio hepático a través de las VLDL o múltiples compartimentos hepáticos (Parker, 1996a).

Presumiblemente, los carotenoides apolares (licopeno, β -caroteno) se sitúan en el núcleo hidrofóbico mientras que los polares (xantofilas) se dispondrían, al menos en parte, en la superficie de

las lipoproteínas (Parker, 1996a). Esta orientación puede influir en la transferencia de carotenoides entre lipoproteínas, aunque ésta parece escasa y muy lenta (Traber y cols, 1994).

En sujetos bien nutridos, los carotenoides se distribuyen principalmente en tejido adiposo (80-85%), hígado (8-12%) y músculo (2-3%) con concentraciones menores en otros tejidos (Bendich y Olson, 1989; Parker, 1988; Stahl y cols, 1992b; Kaplan y cols, 1990; Schmitz y cols, 1991). Del contenido total corporal, el suero contiene alrededor del 1% siendo los mayoritarios los siguientes: β -caroteno, luteína, licopeno, β -criptoxantina, zeaxantina y α -caroteno, con concentraciones menores de otros carotenoides oxigenados y polienos (fitoeno y fitoflueno) (Bendich y Olson, 1989; Khachik y cols, 1991, 1992; Granado y cols, 1991).

Aunque el β -caroteno y el licopeno son los carotenoides predominantes en suero, las concentraciones y porcentajes relativos de carotenoides para un mismo órgano varían considerablemente entre individuos (Parker, 1988; Nieremberg, y Nann, 1992; Stahl y cols, 1992b; Schmitz y cols, 1993) . En términos relativos, se detectan niveles altos de β -caroteno y licopeno en hígado, glándulas adrenales y testículos, con concentraciones menores en pulmón y riñón. A pesar de que los carotenoides hidrocarbonados son muy lipofílicos, sus niveles en tejido adiposo son relativamente bajos, en comparación con otros tejidos como hígado y testículo (Stahl y Sies, 1996b). Sin embargo, dado que el tejido adiposo representa el 20% del peso corporal total, su contribución al contenido total de carotenoides es considerable, constituyendo, junto con el hígado, los principales depósitos en el organismo (Parker, 1989). Por otro lado, parece existir una distribución preferente de carotenoides según los tejidos. Así, mientras que en testículo, el carotenoide principal es el licopeno (Stahl y cols, 1994), en la retina se ha detectado una acumulación selectiva de luteína y zeaxantina con distribución diferente según la proximidad al polo central (Bone y Landrum, 1992).

La proporción de isómeros "cis/trans" en tejidos también varía. El β -caroteno se encuentra principalmente en forma "trans" en sangre (90-95%), mientras que una mayor proporción de isómeros "cis" se detecta en tejidos periféricos (10-40%) (Stahl y cols, 1992b, 1993b; Tamai y cols, 1995; Van Vliet, 1996). El 9-cis- β -caroteno, presente en tejidos, se detecta a muy bajas concentraciones en plasma lo que sugiere su formación o acumulación preferencial en tejidos (Stahl y cols, 1992b). De igual modo, la forma "trans" de licopeno que supone el 95% del licopeno presente en alimentos, representa alrededor del 65% en quilomicrones y un 45% en suero, mientras que en testículo está en cantidades 3-5 veces mayores que las formas "cis". Esto sugiere que es isomerizado "in vivo" rindiendo el patrón típico encontrado en sangre y tejidos (Gartner y cols, 1997).

1.3.2.- *RETINOL*

1.3.2.1.- **Nomenclatura y estructura química**

El término **Vitamina A** es empleado genéricamente para los compuestos derivados de la β -ionona que poseen la actividad biológica de all-trans-retinol, o están estructuralmente relacionados (Nomenclature Policy, 1987) (figura 5). Así, el término incluye al all-trans-retinol (vitamina A preformada), sus análogos sintéticos y ciertos carotenoides que se pueden convertir en retinol en el organismo. El término **Retinoides** es más amplio y hace referencia tanto a los compuestos naturales como a los análogos sintéticos (con o sin actividad de vitamina A).

El all-trans-retinol es un alcohol de cadena larga que se encuentra en la mayoría de los tejidos animales en forma de ésteres de ácidos grasos (Blomhoff, 1994). Los metabolitos activos derivados de retinol incluyen: retinal (11-cis-retinal como cromóforo de pigmentos visuales en retina) (actividad biológica del 75% frente a retinol), 3-dehidro-retinol (vitamina A₂, 30-40% de actividad),

ésteres de retinol (actividad 100%) y derivados ácidos (ácido all-trans-retinoico y ácido 9-cis-retinoico). Estos últimos no cubren todas las necesidades metabólicas del organismo dado que no protegen contra la ceguera nocturna ni la disfunción reproductora (Machlin, 1991).

1.3.2.2.-Fuentes dietéticas e ingesta recomendada.

Con fines nutricionales, la actividad vitamínica A de los alimentos se expresa como Equivalentes de retinol (ER). Se define como 1µg de all-trans-retinol (3.33 Unidades Internacionales) y es equivalente a 6 µg de all-trans-β-caroteno o 12 µg de otros carotenoides provitamínicos (Food and Nutrition Board, 1991).

La vitamina A preformada (ésteres de retinilo, retinol, retinal, 3-dehidro-retinol y ácido retinoico) se presenta en alimentos de origen animal, fundamentalmente como ésteres de retinol. Se encuentra en forma de compuestos precursores (carotenoides con actividad provitamínica A), principalmente en el reino vegetal. Fuentes dietéticas de vitamina A preformada incluyen a la leche y productos lácteos (quesos, mantequilla, etc) huevos, hígado y otras vísceras (riñones, corazón) así como distintos pescados, especialmente en aceites de hígado de pescados marinos (bacalao, tiburón). Entre las fuentes de origen vegetal (carotenoides provitamínicos), cabe destacar la zanahoria, espinacas, acelgas, apio verde, pimiento rojo, níspero y manadarina (Olmedilla y cols, 1996c).

A nivel mundial, alrededor del 60% de la vitamina A de la dieta es aportada en forma de carotenoides provitamínicos, mientras que en países en desarrollo, este porcentaje llega al 82% (Rodríguez-Amaya, 1997). En la dieta española, la ingesta media de retinol preformado es de 686 µg/persona/día. Los carotenoides provitamínicos contribuyen a la ingesta media total de vitamina A (equivalentes de retinol) en un 45% (Varela y cols, 1995) y son aportados por un

número reducido de frutas y hortalizas, tanto anual como estacionalmente (Granado y cols, 1996).

Las recomendaciones de vitamina A se basan en estudios que sugieren que el mantenimiento de un nivel plasmático superior a 20 µg/dl parece ser esencial, mientras que una concentración de 30 µg/dl podría ser adecuada para asegurar unas reservas corporales modestas de esta vitamina (Food and Nutrition Board, 1991). Diferentes estudios han confirmado la necesidad de ingestas de 1200 µg de retinol o 2400 µg de β-caroteno para mantener unos niveles séricos superiores a 30 µg/dl (de Pee y West, 1996). Basados en estudios de depleción en adultos, el "requerimiento funcional" (ingesta mínima para prevenir signos de alteración funcional) mínimo se ha estimado en 500-600 µg/día (Nutrition Working Group, 1990). Asimismo, basados en datos epidemiológicos sobre el papel de los carotenoides como antioxidantes y frente a determinados carcinógenos, se recomienda que 1/3 de la actividad total de vitamina A sea ingerida como provitamina. En España, la cantidad recomendada en individuos adultos es de 1000 µg ER para hombres y de 800 µg ER para mujeres (Moreiras y cols, 1997).

1.3.2.3.- Funciones y actividades biológicas

El papel de la vitamina A en la visión, reproducción, crecimiento y procesos de epitelización se conoce desde hace décadas (Stepp y cols, 1939). Recientemente, han surgido otras funciones que implican el mantenimiento de la integridad de la respuesta inmune y la diferenciación y proliferación celular (p.e. modulación de la expresión génica), indicando un efecto "anti-infeccioso" y un papel anticarcinogénico para esta vitamina (Van den Berg, 1996b).

En la visión, el papel de la vitamina A se centra en la actividad del 11-cis-retinal como grupo prostético (cromóforo) de la rodopsina en células retinianas, el cual se convierte en all-trans-

retinal durante la absorción de luz (conversión de rodopsina a meta-rodopsina I (Machlin, 1984; Blomhoff, 1994)).

Sin embargo, con excepción del proceso visual, los múltiples efectos de la vitamina A son mediados por sus derivados ácidos (Pfahl y Chytil, 1996). Estos derivados afectan a una gran diversidad de sistemas biológicos incluyendo células embrionarias, linfoides, nerviosas y musculares, así como programas de desarrollo. La actividad del ácido retinoico está mediada por receptores nucleares (RAR's y RXR's), los cuales forman parte de un complejo sistema de señales que permiten interacciones receptor-receptor, receptor-ADN así como con otros sistemas reguladores como hormonas tiroideas y vitamina D₃ (Petkovitch, 1992; Pfahl y Chytil, 1996; Hendricks, 1996).

Asimismo, otro derivado, el ácido 9-cis-retinoico, interacciona y activa receptores nucleares RXR (Mangelsdorff y cols, 1990; Levin y cols, 1992), lo que sugiere que la isomerización puede ser importante no sólo en la visión, sino en la regulación de la transcripción génica. En este contexto, se ha demostrado que el ácido retinoico puede derivarse a partir de β -caroteno en varios tejidos (Napoli y Race, 1988) y que los cis-carotenoides podrían actuar como precursores de ácido 9-cis-retinoico (Wang y cols, 1994).

Diferentes estudios epidemiológicos señalan una asociación entre ingesta de vitamina A y riesgo de cáncer. Hoy día, parece existir evidencia sobre un "efecto protector" entre carotenoides y fuentes de vitamina A e incidencia de cáncer de pulmón. Hay una asociación más discreta con el cáncer de mama y poco convincente para el de colon, mientras que en el cáncer de próstata podría tener una incidencia mayor (Hunter y Willet, 1994).

1.3.2.4.- Absorción y metabolismo

El retinol (o los ésteres de retinilo tras su hidrólisis) presente en la dieta es absorbido por el enterocito y reesterificado, fundamentalmente con ácido palmítico. Posteriormente, incorporado a los quilomicrones, alcanza la vía linfática. En cantidades fisiológicas, el retinol se absorbe, aparentemente por difusión facilitada y con más eficacia que la mayoría de los carotenoides. Aproximadamente, la absorción oscila entre < 75% (Blomhoff y cols, 1992) y 90% (Machlin, 1991), mientras que a dosis farmacológicas es menor y se realiza por difusión pasiva (Machlin, 1991; Blomhoff y cols, 1992). En humanos, no existe evidencia de que la absorción de vitamina A esté influenciada por el status de vitamina A del sujeto (Biesalski, 1997).

El retinol producido en el enterocito es esterificado para su transporte hasta el hígado. En este sentido, la presencia de proteínas celulares que se unen al retinol (CRBP II) parecen jugar un papel central mediando la reducción de retinal a retinol y su esterificación - mediante LRAT y ARAT-, a concentraciones fisiológicas (Ong, 1994; Hendricks, 1996).

Durante el transporte de quilomicrones y su metabolismo a quilomicrones residuales hacia el hígado, los ésteres de retinilo se mantienen casi totalmente intactos en estas lipoproteínas. Tales ésteres son capturados por las células parenquimatosas del hígado y, en parte, por tejidos extrahepáticos con intensa proliferación celular (p.e. médula ósea) (Blomhoff, 1994). En hígado, los ésteres de retinilo (forma de almacenamiento) son hidrolizados y el retinol transferido al retículo endoplásmico para ser secretado a la sangre tras su unión a la RPB.

El metabolismo celular del retinol implica tres grandes vías (Blomhoff y cols, 1992). En términos cuantitativos, la vitamina A ingerida se metaboliza siguiendo las siguientes vías (Machlin, 1984;

Blomhoff, 1994): 1) Aproximadamente, el 20% no se absorbe y es excretado, 1-2 días después, en las heces; 2) Del 80% absorbido, entre un 20-50% es conjugado u oxidado a productos que serán excretados en la semana siguiente en heces u orina; y 3) El resto (30-60%) de la vitamina A es almacenada, fundamentalmente, en las células estrelladas del hígado (50-80% de los depósitos corporales) fundamentalmente como ésteres de retinilo.

En el hígado, el retinol se metaboliza más lentamente para formar numerosos productos, algunos de los cuales son conjugados con el ácido glucurónico o la taurina y eliminados en la bilis y la orina (Blomhoff, 1994). Su catabolismo es lento con una vida media de 120-150 días (Olson, 1997) y, probablemente, la mayoría del catabolismo implica su transformación irreversible a ácido retinoico el cual puede sufrir posteriores transformaciones (Blomhoff, 1994).

1.3.2.5.- Transporte y distribución en tejidos

La movilización de la vitamina A desde el hígado y su transferencia a los tejidos es un proceso altamente regulado. El retinol que alcanza la sangre es transferido y almacenado (90-95%) en las células estrelladas del hígado (constituyendo una reserva para varios meses), siendo movilizado cuando la ingesta de retinol es baja.

En condiciones de estado nutricional adecuado, el 95% del retinol en plasma se encuentra unido a la RBP (holo-RBP), estando asociada (95%) a la transtiretina (pre-albúmina), en proporciones 1:1, lo que parece prevenir la filtración glomerular del complejo RBP-retinol (Blomhoff, 1994). La formación de este complejo es previa a la secreción hepática (Sivaprasadarao y Findlay, 1994), y la unión del retinol estimula su secreción. La unión de retinol a RBP es un proceso muy específico, siendo el único ligando en condiciones fisiológicas.

El retinol se recicla en plasma, hígado y tejidos extrahepáticos, de forma que una fracción del retinol plasmático proviene de tejidos extrahepáticos (Blomhoff, 1994). La cinética del retinol en plasma se ha descrito como un modelo tricompartmental, representado por el retinol plasmático, los depósitos de recambio lento (principalmente, hígado), y un tercero de recambio rápido (tejidos extrahepáticos) (Green y Green, 1994).

La captura de holo-RBP por los tejidos (p.e. hígado, placenta) parece estar mediada por receptores específicos aunque parece existir una transferencia no específica, así como una captura de quilomicrones residuales en tejidos (p.e. médula ósea, leucocitos) (Blomhoff, 1994) donde el retinol es esterificado o metabolizado hasta ácido retinoico (Hendriks, 1996).

1.3.2.6- Control homeostático del retinol en plasma.

En humanos, en condiciones nutricionales adecuadas, los niveles de retinol se mantienen en un rango muy definido de concentración, independientemente de la ingesta de la vitamina A (Stepp y cols, 1939; Blomhoff y cols, 1992; Biesalski, 1997). Sólo cuando las reservas hepáticas son muy escasas, las concentraciones plasmáticas reflejan un cambio (Green y Green, 1994). Los niveles de retinol se incrementan desde el nacimiento hasta la edad adulta y, en la mayoría de las poblaciones, los hombres presentan niveles plasmáticos mayores que las mujeres (Murrill y cols, 1941; Kimble y cols, 1946; Underwood, 1984; Thurnham, 1988a; Ito y cols, 1990; Olmedilla y cols, 1994).

El control homeostático del retinol no es completamente conocido y es posible que su regulación se derive del equilibrio entre 8 "pools" diferentes: plasmático (TTR-RBP-retinol, RBP-retinol y retinol libre), en fluidos intersticiales (TTR-RBP-retinol, RBP-

retinol y retinol libre), retinol unido a membranas y retinol unido a CRBPs intracelulares (Blomhoff y cols, 1992; Green y Green, 1994). Esta regulación también está mediada por factores que afectan el balance entre la entrada y la salida de retinol en plasma. Así, la síntesis de RBP por el hígado parece ser constitutiva y la vitamina A no modula su tasa de síntesis ni su ritmo de degradación. Sin embargo, la síntesis de CRBP sí es inducida por retinol y ácido retinoico, jugando un papel importante en la captura celular y almacenamiento de retinol (Green y Green, 1994).

Por último, dos órganos tienen un papel clave en la regulación del retinol plasmático: hígado y riñón. El hígado como procesador del retinol de la dieta, almacén de vitamina A y lugar de síntesis de RBP y TTR, determina la entrada de retinol en el plasma. El riñón, por su parte, está implicado en la reabsorción de retinol y en la salida de retinol y RBP (Blomhoff, 1994).

1.3.3. VITAMINA E

1.2.3.1.- Nomenclatura y estructura química.

El término **vitamina E** debe ser usado como descripción genérica de todos los derivados del "tocol" y "tocotrienol" que muestran cualitativamente actividad biológica de α -tocoferol (figura 6) (Machlin, 1984).

El término tocoferol no es sinónimo de vitamina E, sino que indica a todos los mono, di y trimetil tocoles, independientemente de la actividad biológica. La molécula de tocol, núcleo de hidroxicromanona unido a una cadena de fitilo saturada (en el caso del tocol), o con tres dobles enlaces (en el caso del tocotrienol), constituye la estructura básica de estos compuestos, que se diferencian por el número y situación de los grupos metilo fijados en

el núcleo (figura 6). El grupo comprende α -, β -, γ -, y δ -tocoferol y α -, β -, γ -, y δ -tocotrienol.

Todos estos compuestos se presentan en una variedad de isómeros; la forma isómera natural con mayor actividad es el RRR- α -tocoferol (d- α -tocoferol) y supone alrededor del 90% de la actividad vitamínica E en tejidos (Cohn, 1997), mientras que la forma sintética es racémica, el all-rac- α -tocoferol (dl- α -tocoferol).

El término Unidad Internacional de vitamina E se define como la actividad de 1 mg de RRR- α -tocoferol, mientras que la actividad de all-rac- α -tocoferol es del 74%. Si la actividad biológica se refiere al α -tocoferol (100%), las actividades relativas de las otras sustancias serían: β -tocoferol 25-50%; γ -tocoferol 10-35% ; α -tocotrienol 30% (Food and Nutrition Board, 1991).

1.3.3.2.- Fuentes dietéticas e ingesta recomendada.

Con fines dietéticos, la actividad vitamina E se expresa como "equivalentes de RRR- α -tocoferol" (α -TE). Para el cálculo de los α -TE en dietas que contienen sólo formas naturales, se aplican los siguientes factores: β -tocoferol (x 0.5); γ -tocoferol (x0.1) y α -tocotrienoles (x0.3) (Food and Nutrition Board, 1991).

La vitamina E sólo es sintetizada por las plantas. Los ocho isómeros de las series del tocol y tocotrienol se presentan ampliamente distribuídas en la naturaleza. En alimentos de origen animal, casi toda la actividad vitamínica E se presenta como α -tocoferol, mientras que en alimentos de origen vegetal otros isómeros se presentan en cantidades sustanciales (Machlin, 1984).

El contenido en tocoferol de los alimentos varía mucho dependiendo de los tipos de tratamiento (almacenamiento, cocción, deshidratación, congelación), dado que los tocoferoles naturales son poco estables frente al calor y el oxígeno. Las principales fuentes de vitamina E están en los aceites vegetales, margarinas, cereales enteros y frutos secos; las carnes, pescados, grasas animales y la mayoría de frutas y hortalizas presentan poca cantidad (Stepp y cols, 1939; Machlin, 1984; Sheppard y cols, 1993).

Las recomendaciones dietéticas de vitamina E se basan en la cantidad de vitamina E en la dieta (y grasa poliinsaturada), y su facilidad de almacenamiento en tejidos. La ingesta recomendada para adultos varía según el sexo y oscila entre 8-12 mg α -TE (Nutrition Working Group, 1990; Food and Nutrition Board, 1991; Moreiras y cols, 1997). En España, la ingesta de vitamina E se ha estimado en 13.3 mg/persona/día (130% de las RDA) siendo los aceites los que aportan el 79% de la ingesta, mientras que las verduras contribuyen con cerca del 7% (Varela y cols, 1995).

1.3.3.3.- Funciones y actividades biológicas

La principal función de la vitamina E es su capacidad antioxidante "in vivo" protegiendo especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados en membranas biológicas y lipoproteínas frente al daño oxidativo (Machlin, 1984, 1991; Traber y Sies, 1996). La vitamina E actúa "barriendo" radicales de oxígeno y parando la reacción en cadena provocada por estos radicales (Burton y Traber, 1990).

El grupo hidroxilo fenólico reacciona con un radical peroxilo formando el correspondiente hidroperóxido orgánico y el radical tocoferoxilo, parando la cadena de peroxidación. El radical tocoferoxilo puede ser regenerado mediante interacciones con donadores de hidrógeno como ascorbato, tioles, ubiquinol, glutatión

reducido y carotenoides (Machlin, 1991; Niki y cols, 1995; Rock, 1996; Truscott y cols, 1996; Traber y Sies, 1996). Los tocoferoles, especialmente el α -tocoferol, también reaccionan con singletes de oxígeno y óxido nítrico (Traber y Sies, 1996).

Estudios epidemiológicos y de intervención han señalado el efecto beneficioso de una elevada ingesta o niveles plasmáticos de vitamina E frente al desarrollo y curso de enfermedades crónicas y degenerativas (aterosclerosis, cardiopatía isquémica, ciertos tipos de cáncer, cataratas, diabetes mellitus, envejecimiento) (Gey y cols, 1987; Gey, 1994; Knekt, 1993; Reaven, 1995; Taylor y cols, 1995; Steinmetz y Potter, 1996; Traber y Sies 1996; Giugliano y cols, 1996) y en la modulación de la inmunidad celular (Tengerdy, 1990; Meidany y Tengerdy, 1993; Zhang y cols, 1995; Traber y Sies, 1996).

Además de la acción antioxidante, se han descrito otras actividades de las distintas formas de vitamina E. Así, el γ -tocotrienol aumenta el recambio del enzima limitante de la síntesis de colesterol (HMG-CoA-reductasa) (Traber y Sies, 1996), lo que podría explicar el efecto hipocolesterolemiante de la fracción rica en tocotrienoles del aceite de palma (Qureshi y Qureshi, 1993). Independientemente de la actividad antioxidante, el α -tocoferol presenta un efecto inhibitor dosis-dependiente de la proliferación celular en músculo liso a través de la activación de factores de transcripción (AP-1). Asimismo, inhibe la proteína quinasa C (Azzi y cols, 1995) y la actividad 5-lipooxigenasa. Por último, actúa como estabilizador y regulador de la fluidez de membranas y de la actividad anticoagulante (Traber y Sies, 1996).

1.3.3.4.- Absorción y metabolismo

La absorción de tocoferoles, a dosis fisiológicas, varía entre 15-45% (rango 10-95%). El tocoferol y/o sus ésteres se absorben (tras hidrólisis) posiblemente por difusión pasiva, decreciendo el

porcentaje conforme aumenta la dosis (Machlin, 1984, 1991; Traber y cols, 1993; Traber y Sies, 1996). El proceso de absorción depende de los mecanismos de absorción de grasas, requiriendo esterasas pancreáticas (para liberar ésteres de tocoferilo) y ácidos biliares. La grasa en la dieta, especialmente triglicéridos de cadena media, favorece la absorción.

En el enterocito, el tocoferol se integra (sin reesterificación) en quilomicrones para su transporte hacia el hígado. Posteriormente es liberado a la sangre en las VLDL. Existe evidencia a favor de la no biodiscriminación durante la absorción intestinal entre α - y γ -tocoferol ni entre estereoisómeros de α -tocoferol (Traber y cols, 1993).

La vitamina E se metaboliza escasamente. Menos del 1% de la vitamina E ingerida se excreta en la orina (denominados metabolitos de Simon, mayormente conjugados con ácido glucurónico), siendo principalmente eliminada en la heces (Machlin, 1991; Traber y Sies, 1996). Las formas de vitamina E no utilizadas preferencialmente (γ -tocoferol, mezclas racémicas), se eliminan durante la formación de las VLDL, posiblemente a través de su eliminación en la bilis (Traber y Sies, 1996; Leo y cols, 1995). Por vía biliar, la eliminación es del 75% de la vitamina E administrada (Cohn, 1997).

El principal producto de oxidación es la tocoferil-quinona, que puede conjugarse como glucuronato y ser excretado en la bilis. También puede ser degradado en el riñón a ácido tocoferónico y procesado para su liberación en orina (Traber y Sies, 1996). La presencia de otro metabolito (2,5,7,8-tetrametil-2(2' carboxietil)-6-hidroxicromano) en orina, ha sido recientemente descrita en humanos suplementados con altas dosis de α -tocoferol, sugiriendo que la excreción de éste compuesto indica la saturación de la capacidad plasmática de unión de α -tocoferol (Schultz y cols, 1995).

1.3.3.5.- Transporte y distribución en tejidos

Durante el catabolismo de los quilomicrones, la lipoprotein-lipasa juega un papel fundamental como proteína de transferencia de distintas formas de vitamina E a otras lipoproteínas (HDL) y, posteriormente, a los tejidos (Traber y Sies, 1996). Los quilomicrones residuales, que contienen la mayor parte de los tocoferoles de la dieta, son internalizados por las células parenquimatosas del hígado mediante diferentes vías que implican a la lipoprotein-lipasa, Apo E, receptor LDL y LRP (Traber y Sies, 1996).

El hígado juega un papel central en el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas de vitamina E y en la discriminación de los distintos estereoisómeros. Esta capacidad depende de la proteína ligadora de α -tocoferol hepática ("Tocopherol Binding Protein") (Traber y Kayden, 1989; Kayden y Traber, 1993; Traber y Sies, 1996). De todos los isómeros de vitamina E presentes en la dieta, el α - y el γ -tocoferol parecen ser preferentemente absorbidos y retenidos. Las VLDL secretadas por el hígado están enriquecidas en RRR- α -tocoferol lo que explica que éste isómero constituya el 90% del contenido en tejidos (Traber y cols, 1993; Traber y Sies, 1996; Cohn, 1997).

No se han descrito proteínas específicas de transporte en plasma para la vitamina E, circulando asociada a lipoproteínas, fundamentalmente a la LDL. Este hecho determina que los niveles de vitamina E no dependan exclusivamente de la ingesta dietética sino de las variaciones en lipoproteínas y que la relación vitamina E/lípidos sea más fiable para la evaluación del status, especialmente en situaciones patológicas (Thurhnam y cols, 1986; Machlin, 1991; Traber y cols, 1993). Todas las fracciones de lipoproteínas contienen α -tocoferol aunque, en el hombre, las principales transportadoras son las LDL y HDL. Durante el catabolismo de VLDL a IDL y LDL existe transferencia de vitamina E a las HDL y de éstas a otras lipoproteínas (Traber y cols, 1993).

La captura de tocoferol por los tejidos varía directamente con el logaritmo de la ingesta y su concentración en tejidos varía de forma considerable (Machlin, 1984). Esta transferencia viene mediada por diferentes mecanismos: intercambio entre lipoproteínas y membranas, transferencia durante lipólisis de lipoproteínas por lipoprotein-lipasa, transferencia desde quilomicrones a fibroblastos, endocitosis mediada por receptor LDL (Apo B/E) y captura tisular y transporte inverso hacia el hígado por HDL (Apo A-I/A-II) (Traber y cols, 1993; Traber y Sies, 1996). Cabe resaltar, que los tejidos no poseen mecanismos de regulación para la captura de α -tocoferol dado que los procesos de transferencia son regulados por las necesidades energéticas del tejido (en el caso de transferencia catalizada por lipoprotein-lipasa) y/o de colesterol (transferencia mediada por receptores LDL) (Traber y cols, 1993).

El tejido adiposo es el principal depósito periférico conteniendo cerca del 80-90% del α -tocoferol, junto con el hígado y el músculo. Las glándulas adrenales e hipofisaria, así como los testículos y plaquetas presentan las concentraciones más altas (Machlin, 1984). Estudios con tocoferol marcado (en ratas) señalan que la velocidad de recambio también varía de forma importante. Es relativamente rápida en plasma, hígado, pulmón y riñón, más lenta en músculo esquelético y cardíaco, y muy lenta en tejido adiposo y nervioso (Burton y Traber, 1990). Sin embargo, ningún órgano funciona como reservorio de α -tocoferol, liberándose según la demanda. Así, aunque la principal reserva de α -tocoferol está en el tejido adiposo, la vitamina E no se moviliza fácilmente desde este tejido (Schaefer y cols, 1983).

1.4.- Determinantes del status sérico de carotenoides, retinol y tocoferoles.

Mientras que para el retinol y α -tocoferol existen rangos de concentración generalmente aceptados (Machlin, 1984; 1991), se ha descrito una alta variabilidad intra- e interindividual para los niveles de carotenoides séricos en distintas poblaciones (Tangney y cols, 1987; Thurnham, 1988a; Ito y cols, 1990; Ascherio y cols, 1992; Rautalahti y cols, 1993; Olmedilla y cols, 1994; Hercberg y cols, 1994; Tee y cols, 1994). Este hecho hace menos fiable la estimación real del compuesto en caso de una única determinación (Tangney y cols, 1987) y puede llevar a una sobreestimación de la prevalencia de valores altos o bajos al utilizar rangos de concentración fijos (Van den Berg, 1993a, 1994; Olmedilla y cols, 1994).

Se han descrito diversos factores dietéticos (tipo de alimento, absorción y utilización), fisiológicos y de estilo de vida relacionados con los niveles de estos compuestos en sangre y que pueden afectar la interpretación de su distribución en poblaciones.

1.4.1.- Factores dietéticos.

Aunque la presencia de nutrientes en el organismo procedentes de la dieta depende de su disponibilidad y tasa de absorción, su concentración en fluidos corporales y/o tejidos puede estar sujeta a regulación (p.e. retinol). Esto supone que cambios en la dieta o el status sean contrarrestados por cambios en la eficacia de absorción o movilización de depósitos corporales manteniéndose constantes los niveles para las funciones metabólicas (Van den Berg, 1993b). Por otro lado, los marcadores bioquímicos (p.e carotenoides séricos) no representan medidas directas de exposición dietética dada la presencia de variaciones intra e inter-individuales en la

biodisponibilidad de nutrientes y en las concentraciones en tejidos (Bowen y cols, 1993; Micozzi y cols, 1992,; Jacques y cols, 1993; Van Vliet, 1996; De Pee y West, 1996).

La influencia de la dieta como determinante de los niveles séricos de carotenoides se conoce desde hace décadas (Boeck y Yater, 1929; Stepp y cols, 1939) y estudios con distintas poblaciones demuestran que los niveles plasmáticos de carotenoides reflejan, al menos de forma cualitativa, su ingesta en la dieta (Stacewicz-Sapuntzakis y cols, 1987; Thurnham, 1988a; Riboli y cols, 1988; Shibata y cols, 1989; Ito y cols, 1990; Tee y cols, 1994; Scott y cols, 1996). Sin embargo, existen factores (tabla 7) que pueden determinar la gran variabilidad en la respuesta entre individuos y hacen que la relación entre su ingesta y los niveles en suero y tejidos sea compleja (Rojas-Hidalgo y Olmedilla, 1993).

En principio, los niveles en plasma reflejan la ingesta a corto plazo (2-3 semanas) (Bowen y cols, 1993; Rock y Swenseid, 1992; Yeum y cols, 1996), mientras que sus niveles en tejido adiposo, cualitativa y cuantitativamente, parecen reflejar la ingesta a más largo plazo (Parker, 1989; Nieremberg y cols, 1992). Las correlaciones observadas entre carotenoides ingeridos en la dieta y concentraciones plasmáticas (Forman y cols, 1993; Yong y cols, 1994; Jarvinen, 1996) - aún ajustados por distintos parámetros (ingesta calórica, colesterol, triglicéridos, edad, BMI, hábito tabáquico, ingesta alcohólica, suplementos vitamínicos y medicamentos ...) - varían desde la ausencia de correlación (Kardinal y cols, 1995) hasta valores de 0.63 (p.e. β -criptoxantina; Olmedilla y cols, 1997c). Estos resultados parecen indicar no sólo que los niveles séricos reflejan la ingesta a corto plazo, sino que depende del carotenoide específico y del método de evaluación dietético utilizado (Yong y cols, 1994).

Para el retinol preformado, en sujetos con un status nutricional adecuado, la correlación entre ingesta y niveles en

plasma es muy débil debido al control homeostático en sangre, hecho constatado en ensayos clínicos donde los niveles de retinol se elevan discretamente sólo si los iniciales son anormalmente bajos (Willet y cols, 1983; 1984).

Para la vitamina E, se han descrito asociaciones significativas entre su ingesta total y niveles séricos de α -tocoferol aunque sólo en individuos que tomaban suplementos, siendo débiles en caso de sujetos que no los tomaban (Willet y cols, 1984; Ascherio y cols, 1992; Vogel y cols, 1997). Asimismo, se han descrito asociaciones inversas entre γ -tocoferol y sujetos que tomaban suplementos de α -tocoferol (Ascherio y cols, 1992; Behrens y Madere, 1986) lo que confirma las observaciones de que los suplementos de α -tocoferol reducen los niveles de γ -tocoferol en suero de humanos (Baker y cols, 1986; Handelman y cols, 1994; Olmedilla y cols, 1997a).

1.4.2.- Factores fisiológicos.

Entre los factores que pueden modificar el status de carotenoides, retinol y α -tocoferol así como su relación con la dieta, se podrían diferenciar aquellos propios del sujeto y los asociados a su modo de vida, aunque, a veces, ambos se relacionen.

Como factores intrínsecos al individuo, se incluye el sexo como determinante de los niveles de retinol y algunos carotenoides (Tabla 8). En la mayoría de las poblaciones, independientemente de los hábitos dietéticos de la población, las mujeres presentan menores niveles de retinol y mayores de carotenoides provitamínicos que los hombres, mientras que no parece afectar a los niveles de α - y γ -tocoferol ni a carotenoides no provitamínicos. En mujeres, también se ha descrito la influencia de la fase del ciclo menstrual como determinante de los niveles de retinol y carotenoides (Forman y cols, 1996), aunque este efecto no se ha observado en otros estudios (Tangney y cols, 1991; Rock y cols, 1995).

El efecto de la edad no se ha observado de forma clara en todos los estudios (Tabla 9) y es posible que sea un factor determinante sólo tras ajustar otras variables como ingesta dietética, colesterol y BMI (Drewnowski y cols, 1997).

Asimismo, se han descrito asociaciones negativas entre Índice de Masa Corporal (BMI) y algunos carotenoides (Nieremberg y cols, 1989b; Ascherio y cols, 1992; Saintot y cols, 1995; Flagg y cols, 1996; Drewnowski y cols, 1997; Vogel y cols, 1997) aunque no en todos los estudios (Jarvinen y cols, 1993). Para el retinol, se han observado tanto asociaciones positivas (Fernández-Bañares y cols, 1993) como negativas (Nieremberg, 1989b), mientras que para α -tocoferol no se ha encontrado asociación (Vogel y cols, 1997). La ingesta de colesterol y alcohol así como colesterol y triglicéridos séricos han sido descrito como factores determinantes en algunos estudios (Striker y cols, 1988; Roidt y cols, 1988; Jarvinen y cols, 1993; Saintot y cols, 1995).

1.4.3.- Factores sociales y estilos de vida.

Entre los factores sociales o externos al sujeto, destaca el consumo de tabaco y alcohol. Estudios "in vitro" han mostrado la desaparición progresiva de carotenoides y α -tocoferol séricos al ser expuestos al humo de tabaco (Handelman y cols, 1996), aunque las asociaciones en estudios con poblaciones no son uniformes (Tabla 10).

La relación entre consumo de alcohol y niveles de carotenoides, retinol y tocoferoles parecen ser todavía más complejas y contradictorias (Tabla 11). Así, aunque se ha descrito un efecto adverso del consumo de alcohol sobre los niveles de carotenoides (Lecomte y cols, 1994), Brady y cols (1996) encontraron que esta relación puede ser explicada, exclusivamente, por diferencias en la ingesta de dietética dado que el consumo de alcohol se asocia de

forma inversa con la ingesta de carotenoides. Más aún, estudios con animales indican que el alcohol puede ejercer un efecto opuesto al interferir con el aclaramiento del β -caroteno (Leo y cols, 1992), lo que podría explicar sus mayores niveles en grandes bebedores (Ahmed y cols, 1994). Asimismo, algunos de los resultados contradictorios asociados al consumo de alcohol podrían estar asociados a una alteración del perfil lipoproteico, afectando el transporte de estos nutrientes en plasma (Drewnowski y cols, 1997).

El uso de determinados fármacos también se ha asociado a efectos sobre los niveles plasmáticos de estos compuestos. Cabe destacar el aumento de retinol, α -tocoferol y β -caroteno y/o carotenoides asociado a la utilización de diuréticos (Nieremberg y cols, 1989b; Coates y cols, 1991; Vogel y cols, 1997) y su disminución con el uso de hipolipemiantes (Erdman y cols, 1993). Niveles de retinol elevados se han asociado al uso de anticonceptivos orales y hormonas de sustitución (Nieremberg y cols, 1989b; Hercberg y cols, 1994; Machlin, 1991) mientras que no hay de efecto con el uso de hipoglucemiantes orales (Nieremberg y cols, 1991).

Otros factores asociados o que pueden alterar los niveles séricos de carotenoides y α -tocoferol son el origen geográfico (urbano vs rural), tipo de ocupación, estado civil (Jarvinen y cols, 1993; Jarvinen, 1996) y exposición al sol (Roe, 1987; White y cols, 1988). Sin embargo, dado que una menor ingesta de estos nutrientes se asocia con edad avanzada, sexo masculino, ocupaciones manuales, consumo de alcohol y hábito tabáquico (Jarvinen, 1996; Brady y cols, 1996), es difícil diferenciar el efecto de estos factores de aquellos puramente dietéticos.

1.5.- Valores de referencia y "puntos de corte" ("Cutt-off points").

El objetivo último en la evaluación del status nutricional vitamínico es clasificar individuos (o grupos) según la ingesta o niveles séricos de vitaminas en marginales, adecuados o tóxicos, o bien, en términos de riesgo para desarrollar una enfermedad relacionada con una deficiencia vitamínica (o toxicidad) (Van den Berg, 1994). La fiabilidad de la evaluación del status mediante métodos bioquímicos depende, en parte, del método utilizado (variabilidad analítica y metodológica), los criterios de interpretación ("puntos límite o de corte") y la variabilidad intraindividual (Van den Berg, 1993a; 1994).

Es común la utilización de percentiles (p.e. 2.5 y 97.5) como "puntos de corte" de una curva de distribución obtenida de datos recogidos en una población aparentemente sana, estableciendo como zona de "riesgo" a aquellos individuos que caen en ambos extremos. Sin embargo, estos valores obtenidos estadísticamente, carecen de base biológica o funcional (Van den Berg, 1994). Dada la arbitrariedad de los puntos de corte establecidos estadísticamente, se deberían definir los criterios de inclusión/exclusión de los sujetos (tabaco, sexo, edad, estación de recogida de muestra, etc.) haciendo más fiable el rango de referencia y su comparación entre poblaciones (Van den Berg, 1993a; Rauthalati y cols, 1993; Olmedilla y cols, 1994).

Para los **carotenoides**, no existen rangos de concentración aceptados en suero. Igualmente, el concepto de deficiencia, en el sentido clásico, no es aplicable a los carotenoides en nutrición humana, fuera del uso en términos relativos en un contexto de evaluación de riesgo frente a enfermedades crónicas (Parker, 1997).

Niveles elevados de carotenoides en suero (>300 µg/dl) (hipercarotenemia) (Underwood, 1984) no son causa de ninguna enfermedad aunque pueden estar asociados a algunos trastornos (hipotiroidismo, diabetes mellitus, enfermedad hepática o renal, anorexia nervosa, tumor cerebral) (Stepp y cols, 1939; Rock y Swenseid, 1993; Olmedilla y cols, 1995), ingestión de suplementos y/o dietas ricas en carotenoides durante períodos prolongados (Bendich y Machlin, 1988) o incapacidad de conversión de β-caroteno a retinol (Sharvill, 1970). Asimismo, la hipocarotenemia no determina ninguna entidad patológica, aunque en estudios epidemiológicos se ha señalado como factor de riesgo frente al desarrollo de determinadas enfermedades (Gerster, 1989, 1992; Ziegler, 1993; Kohlmeier y Hastings, 1995; Van Poppel y Goldbohm, 1995; Mayne, 1996; Steinmetz y Potter, 1996).

Debido al control homeostático del **retinol**, sus niveles plasmáticos tienden a disminuir cuando los depósitos hepáticos caen por debajo de 20 µg/g de tejido (Maiani y cols, 1993). Los criterios comúnmente aceptados para la interpretación del status sérico de retinol en adultos son los siguientes (Machlin, 1984, 1991; Food and Nutrition Board, 1991; Nutrition Working Group, 1990; Maiani y cols, 1993):

< 10 µg	retinol/dl	=	Deficiencia severa
10-15 µg	"	/dl	= Nivel crítico (primeros síntomas de deficiencia) (Nut. Working Group)
10-20 µg	"	/dl	= Nivel bajo (Deficiencia marginal)
20-30 µg	"	/dl	= Nivel marginal
20-80 µg	"	/dl	= Normal o adecuado
> 80 µg	"	/dl	= Alto
> 100 µg	"	/dl	= Toxicidad

Ante un status nutricional de vitamina A normal, los niveles de ésteres de retinilo suponen 5-10% del retinol circulante (Underwood, 1984). Porcentajes superiores de formas éster se asocian a toxicidad, y pueden estar presentes, sin elevación de retinol, en determinadas situaciones patológicas (ej. cirrosis hepática) (Maiani y cols, 1993). La interpretación de estos valores es complicada dado que los niveles circulantes pueden estar alterados bajo diversas circunstancias (enfermedad aguda o crónica, enfermedad hepática, síndromes de malabsorción, uso de ciertos medicamentos, fiebre, malnutrición energético-proteica, etc.).

Salvo en casos de deficiencia o toxicidad, el retinol plasmático no es un buen indicador de las reservas corporales totales ya que dentro del rango normal de reservas de vitamina A (20-300 µg/g hígado), las concentraciones plasmáticas de retinol están homeostáticamente reguladas (Olson, 1984). No obstante, se acepta que niveles > 30 µg retinol/dl, se asocian a reservas hepáticas adecuadas (Food and Nutrition Board, 1991).

La estimación del status de **vitamina E** mediante determinaciones bioquímicas estáticas se basa en estudios de niveles plasmáticos de α-tocoferol en poblaciones y en el hecho de que niveles de α-tocoferol en sangre < 0.5 mg/dl se asocian con un aumento de la hemólisis oxidativa de eritrocitos "in vitro" (Machlin, 1984, 1991; Morrisey y cols, 1993). Los rangos orientativos para la interpretación del status de vitamina E en plasma en adultos son (Machlin, 1991):

< 0.5	mg/dl	= Deficiencia
0.5-0.7	mg/dl	= Bajo
> 0.7	mg/dl	= Aceptable

Dada la estrecha correlación de los niveles de α -tocoferol con los lípidos plasmáticos, el valor de α -tocoferol plasmático como único criterio es insuficiente (Morrisey y cols, 1993). Así, la relación α -tocoferol/lípidos totales, α -tocoferol/colesterol o α -tocoferol/colesterol+triglicéridos, es una medida más fiable que la simple determinación de α -tocoferol (Thurnham, 1986; Machlin, 1984, 1991; Morrisey y cols, 1993; Gey, 1994). Una relación de α -tocoferol/colesterol >2.5 ($\mu\text{g}/\text{mg}$), sería considerada aceptable (Machlin, 1984), aunque para otros autores (Keller y Salked, 1988) un valor entre 2.2-3.8 es considerado marginal.

Por último, el hecho de que un status vitamínico y antioxidante "óptimo" se considera como pr^rerequisito para una salud "óptima", ha llevado a algunos autores a establecer puntos de corte de estos compuestos en suero asociados con riesgo mínimo ("niveles óptimos deseables", Tabla 12) de muerte prematura por enfermedad cardiovascular, cáncer y otras enfermedades degenerativas (Gey y cols, 1987; Gey, 1994; Keller y Salked, 1988; Diplock, 1993; Biesalski, 1995). No obstante, aunque de gran interés en relación con la salud, los resultados de los estudios de intervención con estas sustancias no permiten establecer, hoy día, cuál es la ingesta o los niveles séricos adecuados de estos compuestos en relación a la prevención de determinadas enfermedades, ni el grado de aplicación a grupos con diferentes características.

1.6.- Diabetes mellitus insulino-dependiente (tipo I).

1.6.1.- Introducción.

La diabetes mellitus es un síndrome heterogéneo, de etiología variada y cuya signos patológicos se caracterizan por hiperglucemia, déficit o actividad disminuida de la insulina, alteraciones en el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas, y desarrollo de complicaciones a corto y largo plazo (ADA, 1996a; Horton y Napoli, 1996).

En la diabetes mellitus insulino-dependiente (tipo I) se presenta un déficit de insulina debido a la destrucción de células β del páncreas y la absoluta dependencia de insulina exógena para prevenir la cetoacidosis y la muerte. Se puede presentar a cualquier edad, aunque normalmente aparece en la adolescencia, y suele estar asociada a determinados antígenos HLA, predisposición a insulinitis vírica y fenómenos autoinmunes (ADA, 1996a).

Las complicaciones a largo plazo incluyen alteraciones microvasculares (retinopatía, nefropatía), neuropatía (periférica y otras afecciones neuropáticas) y macrovasculares (aterosclerosis acelerada, enfermedad arterial coronaria, cerebrovascular y vascular periférica) (ADA, 1996b; Horton y Napoli, 1996). El diagnóstico y tratamiento precoz de la diabetes se considera de gran valor dado que las complicaciones pueden reducirse de forma importante mediante un tratamiento adecuado de la enfermedad. El mantenimiento de los niveles de glucosa próximos a la normalidad es prioritario ya que reduce el riesgo de cetoacidosis diabética, mejoran los síntomas (poliuria, polidipsia, infecciones, etc.), disminuye el riesgo de desarrollo y/o progresión de retinopatía diabética, nefropatía y neuropatía, y se asocia con un perfil lipídico menos aterogénico (ADA, 1996c).

Se han desarrollado diferentes hipótesis para explicar la patogenia de estas complicaciones, implicando la vía del sorbitol (Winegrad y cols, 1974), la glicación no enzimática de proteínas con la subsiguiente alteración de su función (Brownlee y cols, 1988), y la participación de radicales libres (stress oxidativo) bien por exceso de producción de radicales libres o bien por un reducido status/ actividad antioxidante en estos sujetos (Giugliano y cols, 1996). Sin ser excluyentes las hipótesis planteadas, no explican totalmente los mecanismos implicados en dichas complicaciones ni la variabilidad en la aparición y curso de dichas complicaciones en sujetos diabéticos.

Parece manifiesta la relación entre el control de la glucemia y periodo de tiempo de desarrollo de las complicaciones. El estudio multicéntrico Diabetes Control and Complications Trial (DCCT Research Group, 1993) evaluó en 1441 sujetos la relación entre las complicaciones de la diabetes mellitus y la hiperglucemia. En los pacientes asignados aleatoriamente a tratamiento intensivo (n=711, con mayor apoyo médico, frecuentes autocontroles de glucemia, bomba externa de infusión de insulina o bien 3 o más inyecciones de insulina/día), tras un seguimiento de siete años, se observó que el riesgo de desarrollo y/o progresión de retinopatía, nefropatía y neuropatía disminuía en un 60% en comparación con la terapia convencional (1 o 2 inyecciones/día y control menos riguroso). Esta reducción era independiente del sexo, edad y duración de la enfermedad y se correlacionaba con el control glucémico (evaluado por niveles de HbA1c) producido por el tratamiento intensivo.

En el tratamiento de la diabetes, la dieta debe ser utilizada como base para integrar la terapia insulínica, la ingesta (especialmente de carbohidratos) y la actividad física (ADA, 1996d). En sujetos diabéticos, los requerimientos nutricionales no difieren de los de la población general. La dieta debe aportar calorías y nutrientes suficientes para asegurar el normal crecimiento y

desarrollo. Cuando la ingesta dietética es adecuada, no hay, en general, necesidad de suplementación con vitaminas y/o minerales en estos sujetos, excepto en casos especiales de uso de diuréticos y otros medicamentos que pueden afectar los requerimientos de estos micronutrientes (ADA, 1997).

1.6.2.- Carotenoides, retinol y tocoferol en la diabetes mellitus insulino-dependiente (tipo I).

La diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) es un trastorno metabólico que puede modificar el status nutricional de algunos micronutrientes y compuestos relacionados (p.e. carotenoides no provitamínicos). Tradicionalmente, los sujetos con DMID se han clasificado entre los grupos de riesgo para un status nutricional bajo de determinados micronutrientes (Stepp y cols, 1939; Mosenthal y Loughlin, 1944; Mooradian y Morley, 1987; Schorah y cols, 1988; Basu y cols, 1989; Gaby y cols, 1991; Tamai y cols, 1994; Mooradian y cols, 1994; Basu y Basualdo, 1997). Además, estos sujetos suelen presentar un status antioxidante bajo y/o un elevado stress oxidativo (Strain, 1991; Holler y cols, 1993; Carsky, 1993; Wolff, 1993; Tsai y cols, 1994; Fauré y cols, 1993, 1995; Farré y cols, 1996; Giugliano y cols, 1996; Ndahimana y cols, 1996).

Numerosos estudios han observado una elevada proporción de diabéticos (tipo I) con niveles séricos de retinol subóptimos o marginales (Tabla 13). Este hecho podría estar asociado a bajos niveles de RBP (Basu y cols, 1989; Krill y cols, 1997) y de transtiretina en estos sujetos (Gebre-Medhin y cols, 1985), lo que impediría la formación del complejo retinol-RBP-TTR. También se ha descrito un status bajo de zinc -cofactor de enzimas reguladores del metabolismo del retinol e importante en la síntesis de apo-RBP-, aunque existen datos contradictorios al respecto (Fauré y cols, 1995; Farré y cols, 1996). Asimismo, otro factor posiblemente implicado sería la mayor excreción de RBP, por alteración de la reabsorción

tubular renal en la diabetes, incluso en ausencia de microalbuminuria (Catalano y cols, 1993; Dubrey y cols, 1997).

Sin embargo, no se han observado correlaciones entre la glucemia, glucosuria, acidosis y niveles de retinol (Ralli y cols 1935; Heyman, 1936; Mosenthal y Loughlin, 1944). Tampoco se ha visto influencia de los niveles de fructosamina y HbA1c y excreción de RBP (Catalano y cols, 1993), aunque sí de la glucemia basal y glucosuria en estudios de "euglycemic clamp" debidos a la bajada de glucosa en sangre (Catalano y cols, 1993).

La elevada frecuencia de "xantemia" (carotenemia) y "xantosis" (carotenodermia) en diabéticos ("Diabetische Xanthosis", "pseudoicterus" en no-diabéticos) es un hecho reconocido desde principios de siglo (Von Noorden, 1904; Hymans y Snapper, 1913; Ueber, 1916; Solomon, 1919; Boeck y Yater, 1929; Rabinowitch, 1930; Heyman, 1935; Ralli, 1935; Stepp y cols, 1939; Murrill y cols, 1941; Mosenthal y Loughlin, 1944; Kimble y cols, 1946; Cohen, 1958; Hoerer y cols, 1974; Gouterman y Sibrack, 1980; Rojas-Hidalgo, 1987). Esta xantosis fue asociada con la presencia de "lipocromo o pigmento carotenoide" en sangre (Hymans y Snapper, 1913) y a "caroteno" en mayor proporción que xantofilas (Solomon, 1919).

Aunque ya se conocía la influencia de la dieta (Hymans y Müller, 1920; Boeck y Yater, 1929; Cohen, 1958) y su estacionalidad sobre los niveles de carotenoides en sangre (Hymans van den Bergh y Müller, 1920), la hipercarotenemia - con o sin xantosis- en sujetos diabéticos se relacionaba con hiperlipemia (Emerson, 1966) y un mal pronóstico de la enfermedad (Head, 1921; Rabinowitch, 1930; Cohen, 1958). De hecho, la frecuencia de hipercarotenemia en sujetos diabéticos disminuía al mejorar el control de la glucemia (Mosenthal, 1944).

En este contexto, la presencia de menores niveles de retinol, junto con hipercarotenemia, así como mayor frecuencia de

carotenodermia en diabéticos, incluso en ausencia de ingesta elevada de verduras, fue considerada por algunos autores como evidencia de una alteración del metabolismo de los carotenoides- conversión a retinol- en estos pacientes (Ralli, 1935; Heyman, 1936; Stepp y cols, 1939; Murrill y cols, 1941; Krall y Zorrilla, 1971; Hoerer y cols, 1974; Krill y cols, 1997).

Sin embargo, los estudios de respuesta a dosis única con β -caroteno realizados en sujetos diabéticos son poco concluyentes. Ralli y cols (1935) describieron un aumento brusco de β -caroteno en plasma, mayor aumento absoluto y bajada más lenta. Por el contrario, Heyman (1936) observó un retraso en la aparición de β -caroteno tras su administración, aunque se mantenían elevados durante más tiempo. Murrill y cols (1941) no detectaron ningún retraso en la respuesta plasmática tras la administración de β -caroteno. Asimismo, Ramachandran (1973) no observa diferencias en la aparición de β -caroteno tras su administración, observa máximos en plasma a las 6-8 horas y no evidencia alteración alguna durante las 24 horas siguientes. Para este autor, estos resultados sugieren que no existe alteración durante la absorción o metabolismo de β -caroteno en sujetos con diabetes mellitus.

Respecto a los niveles séricos de vitamina E, los resultados son contradictorios dado que se han descrito tanto niveles mayores, iguales o menores en diabéticos insulino-dependientes (tabla 13). Es posible que estas discrepancias se deban a la falta de homogeneidad de la población estudiada (p.e. inclusión de sujetos hiperlipémicos) e incertidumbres metodológicas (Vandewoude y cols, 1987; Mooradian y cols, 1994; Nnahimana y cols, 1996). De hecho, al relacionar los niveles de α -tocoferol con niveles de colesterol, no se detectan diferencias con controles normolipémicos (Vandewoude y cols, 1987; Tsai y cols, 1994).

No obstante, aún con niveles normales de vitamina E, es posible que la presencia de hiperglucemia modifique la composición (p.e.glicación) y/o actividad (unión y transferencia de vitamina E a células endoteliales) de lipoproteínas y antioxidantes en estos sujetos (Kunisaki y cols, 1993; Kawamura y cols, 1994).

Por último, basados en el posible papel del estrés oxidativo en la aparición y/o evolución de las complicaciones a largo plazo de la diabetes, diferentes autores han descrito efectos beneficiosos de la administración de distintos antioxidantes (Gisinger y cols, 1988; Ceriello y cols, 1991; Baker y Campbell, 1992; Davie y cols, 1992; Kahler, y cols, 1993; Fauré y cols, 1995; Reaven, 1995; Fuller y cols, 1996). Sin embargo, aunque el papel del estrés oxidativo y la terapia antioxidante en las complicaciones diabéticas es de gran interés (Bloomgarden, 1997) y existan razones teóricas para suplementar con antioxidantes, hay pocas evidencias que confirmen que dichas terapias proporcionan algún beneficio (ADA 1997).

TABLA 1.- Métodos disponibles para la evaluación del status de vitamina A, E y carotenoides (*).

<u>VITAMINA A</u>	<u>VITAMINA E</u>	<u>CAROTENOIDES</u>
<u>Evaluación clínica</u>		
Ceguera nocturna		Carotenodermia
Xerosis conjuntival		
Xerosis corneal/		
Escaras córneas		
<u>Indicadores biológicos</u>		
<u>Estáticos</u>		
Retinol sérico/plasma	α -tocoferol sérico/plasma	Carotenoides séricos/plasma
Retinol en leche materna	α -tocoferol en eritrocitos	" " en tejidos
RBP en suero	" " en plaquetas	
Concentración en hígado	" " tej. adiposo	
	Relación Vit.E/lípidos	
<u>Funcionales</u>		
Adapt.visual a la oscuridad	Hemólisis eritrocitaria	Metabolitos en suero
RDR	Exhalación de pentano	Protección ADN celular
RDR (M)	MDA en eritrocitos	Oxidación de LDL
+S3ODR	Oxidación de LDL	Inmunocompetencia
Marcaje isotópico	Dienos conjugados	Marcaje isotópico
	Inmunocompetencia	
	Marcaje isotópico	
<u>Histológicos</u>		
CIC/ICT	Biopsia intestino	
<u>Métodos dietéticos</u>		
Evaluación dietética	Evaluación dietética	Evaluación dietética

(*). Adaptado de Maiani et al (1993), Morrisey et al (1993), Rojas-Hidalgo y Olmedilla (1993), Piertzik (1994), Van den Berg (1996b), Olson (1997), de Pee y cols (1997), WHO (1998).

TABLA 2.- Métodos disponibles y recomendados para la evaluación del status de carotenoides, vitamina A y E (*).

Micronutriente	Método recomendado	"Mejor método disponible"	"Método prometedora"
Carotenoides		Perfil de carotenoides (S)	
Vitamina A		Retinol (S)	RDR
Vitamina E	α -tocoferol estandarizado con lípidos (S)		

(*) Tomado de "Flair Concerted Action No. 10 Status Papers" (Van den Berg, 1993a).
(S): Suero.

TABLA 3.- Actividad provitamínica A relativa de algunos carotenoides naturales (*).

	<u>Retinol</u> (100%)	<u>β-caroteno</u> (100%)	<u>(1)</u>	<u>(2)</u>
β -caroteno all-trans	17	100	100	100
13-cis- β -caroteno	-	-	-	53
9-cis- β -caroteno	6	50	-	38
α -caroteno all-trans	8-9	50	50-54	53
β -criptoxantina	8-10	50	50-60	57
γ -caroteno	-	50	42-50	42
β -apo-8'-carotenal	12	50-60	72	-
β -apo-10'-carotenal	0	0	-	-
α -criptoxantina	0	0	-	-
Luteína	0	0	-	-
Zeaxantina	0	0	-	-
Licopeno	0	0	-	-
Fitoeno	0	0	-	-
Fitoflueno	0	0	-	-

(*) Adaptado de Zechmeister, 1962; Bauerfeind, 1981; Simpson, 1983; Khachick y cols., 1991. (1) Valores de Bauerfeind (1971) y Zechmeister(1944);(2) Rodriguez-Amaya (1997).

TABLA 4.- Actividades biológicas de los carotenoides (*)

FUNCIONES

Pigmentos accesorios en la fotosíntesis
Protección frente a fotosensibilización
Actividad provitamínica A
Mecanismos de protección (mimetismo) y procesos sexuales.

ACCIONES (A menudo, inducidas por administración de altas dosis)

Antioxidantes
Inmunopotenciadores
Inhibición de mutagénesis y transformación
Inhibición de lesiones premalignas

ASOCIACIONES (Principalmente, estudios epidemiológicos)

Disminución del riesgo de cataratas
Disminución del riesgo de degeneración macular
Disminución de riesgo de algunos cánceres
Disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular

(*) Adaptado de Bendich y Olson (1989) y Olson (1993).

TABLA 5.- Niveles de carotenoides plasmáticos tras dietas pobres o exentas de carotenoides (*).

<u>Carotenoide</u>	<u>Tiempo</u>	<u>% final alcanzo</u>	<u>Referencia</u>
"Carotene"	1-2 meses	Bajan (1)	Pearson, 1967
Carotenoides	2 semanas	60%	Carughi y cols, 1994
α -caroteno, β -caroteno.	3 semanas	18%	Bowen y cols, 1988
β -cript., Lut., Licopeno		8%	
β -caroteno	21 días	54%	Fuller y cols, 1993
	70 días	37%	
Carotenoides	21 días	71%	
	70 días	48%	
Lic., lut., β -cript	4 días	Bajan (1)	Stahl y cols, 1993a
α -caroteno, bcaroteno.	4 días	Bajan (1)	Stahl y cols, 1992a
Licopeno	2 semanas	Bajan (1)	Micozzi, 1992
Luteina	10-12 días	65%	Olmedilla y cols (2)
Zeaxantina	"	77%	" "
β -Cript., licopeno	"	72%	" "
β -caroteno	"	86%	" "

(*) Porcentaje frente a nivel basal (100%). (1) Porcentaje no especificado. (2) Observaciones no publicadas. Pacientes con nutrición enteral (formulas comerciales) tras laringectomía (Olmedilla y cols, 1996a).

TABLA 6.- Vida media de carotenoides en plasma según diferentes tipos de estudios.

<u>Carotenoide</u>	<u>Vida media</u>	<u>Referencia</u>
Dietas pobres en carotenoides		
α -caroteno	< 12 días	Rock y cols, 1992a
β -caroteno	< 12 días	
β -criptoxantina	< 12 días	
Licopeno	12 - 33 días	
Luteína/Zeaxantina	33 - 64 días	
Dosis únicas o intermitentes (cápsulas o alimentos)		
β -caroteno	5 - 6 días	Kübler y cols, 1993
	4 - 6 días	Dimitrov y cols, 1989
	7 - 14 días	Micozzi y cols, 1992
	11 - 15 días	Masaki y cols, 1993
	51 días (*)	Novotny y cols, 1995
Licopeno	13 días (**)	
	2 - 3 días	Kübler y cols, 1993
	""	Stahl y cols, 1992a
	11 - 14 días	Micozzi y cols, 1992
	14 días	Brown y cols, 1989
Cantaxantina	9 días	Oshima y cols, 1997
	5-6 días	Kübler y cols, 1993
Capsantina	< 1 día	Oshima y cols, 1997
Recuperación de niveles basales		
β -caroteno	4 días	Ralli y cols, 1935
	7 - 9 días	Stahl y cols, 1993a
	<7 días	Jonhson y cols, 1992
	10 - 40 días	Dimitrov, 1988
	22 días	Paetau y cols, 1997
α -caroteno	7 - 9 días	Stahl y cols, 1993a
Licopeno	7 días	Stahl y cols, 1992a
	11 - 14 días	Micozzi y cols, 1992
Luteína/Zeaxantina	30 días (#)	Khachik y cols, 1995a
Luteína	18 días	Kostic y cols, 1995
Carotenoides totales	< 42 días	Yeum y cols, 1996

(*) Tiempo medio de permanencia en el organismo. (**) Tiempo medio de permanencia en un compartimento. (#) Dosis repetidas durante 18-21 días.

TABLA 7.- Factores que afectan la relación entre ingesta de carotenoides y niveles en suero/tejidos.

a.- Durante la absorción y/o conversión a retinol.

Digestibilidad (y método de procesamiento) de la matriz del alimento
Tamaño de la partícula del alimento
Cantidad, tipo y estado físico de carotenoides en la dieta
Cantidad (y tipo) de grasa en la comida
pH gástrico
Secreción biliar (y pancreática)
Presencia de antioxidantes/prooxidantes en la dieta
Cantidad y tipo de fibra
Interacciones entre carotenoides y otros componentes de la dieta
Nivel y status de proteínas
Status de retinol, Zn^{2+} y Fe^{2+}
Calorías totales y alcohol.
Presencia de determinadas enfermedades (ej. malabsorción, diarrea)
Presencia de parásitos intestinales.

b.- Afectan presencia y concentración en tejidos.

Variabilidad interindividual en la absorción/respuesta.
Conversión a retinol (Actividad provitamínica A).
Posible metabolismo "in vivo".
Isomerización "in vivo".
Absorción y distribución tisular preferente de carotenoides e isómeros.
Interacciones entre carotenoides y otros componentes de la dieta.

TABLA 8.- Influencia del sexo sobre las concentraciones séricas de carotenoides, retinol y tocoferoles (*).

<u>Ref.</u>	<u>Retinol</u>	<u>α-/γ-Toc</u>	<u>L/Z</u>	<u>β-Cript.</u>	<u>Licopeno</u>	<u>α-caroteno</u>	<u>β-caroteno</u>
Murrill, 1941	-						+(1)
Kimble, 1946	-						+(1)
Pearson, 1967	-						+(1)
Olson, 1984	-						
Stacewicz, 1987	-			+		+	+
Thurhnam, 1988	-	0		+	0	+	+
Shibata, 1989	-			+		+	+
Ito, 1990	-	0	0	+	0	+	+
Hercberg, 1994	-			+		+	+
Olmedilla, 1994	-	0	0	+	0	+	+
Biesalski, 1997	-						
Vogel, 1997	0	+	0	+	0	+	+

(*) (+) Mujeres con niveles mayores que los hombres; (-) Mujeres con niveles menores que los hombres; (0) No diferencia entre sexos. (1) Referido como "carotenos". L/Z: Luteína+Zeaxantina.

TABLA 9.- Influencia de la edad sobre los niveles séricos de retinol, tocoferol y carotenoides (*).

<u>Ref.</u>	<u>Retinol</u>	<u>α-/γ-toc</u>	<u>L/Z</u>	<u>β-cript.</u>	<u>Licopeno</u>	<u>α-caroteno</u>	<u>β-carotenc</u>
Pearson, 1967	+						
Fdez-Bañares, 1993	+	+					
Hallfrisch, 1994	+	+					
Jarvinen, 1996	-						
Ito, 1990			+	+	-	-	+
Jarvinen, 1993							-
Hercberg, 1994			+				-
Vogel, 1997	0	0				-	
Drenowski, 1997							0

(*) (+) Asociados a mayores niveles; (-): Asociados a menores niveles. (0): No asociación.

TABLA 10.- Influencia del consumo de tabaco sobre los niveles de retinol, tocoferoles y carotenoides en suero (*).

<u>Ref.</u>	<u>Retinol</u>	<u>α-/γ-toc</u>	<u>L/Z</u>	<u>β-cript.</u>	<u>Licopeno</u>	<u>α-caroteno</u>	<u>β-carote</u>
Nieremberg, 1989b	-						-
Thurhnam, 1990			-		0		-
Ascherio, 1992	0	0	-		0		-
Fdez-Bañares, 1993							-
Pamuk, 1994	+		0		-		-
Ross, 1995	0	0	0		0		
Jarvinen, 1993	0						
Hallfrisch, 1994	0						
Riemersma, 1991		0					
Drenowski, 1997							-
Vogel, 1997	-	0		-		-	-

(*) (+), asociación con niveles mayores; (-), asociación con niveles menores; (0), no asociación.

TABLA 11.- Influencia del consumo de alcohol sobre los niveles de retinol, tocoferoles y carotenoides en suero (*).

<u>Ref.</u>	<u>Retinol</u>	<u>α-/γ-toc.</u>	<u>L/Z</u>	<u>β-cript.</u>	<u>Licopeno</u>	<u>α-caroteno</u>	<u>β-caroteno</u>
Rissanen, 1987	+						
Hercberg, 1994	+	+					-
Haller, 1996	+						
Lecomte, 1994	0		-	-	-	-	-
Ascherio, 1992	-					0	
McCauley, 1993	-						
Striker, 1988							-
Thurhnam, 1988					+		-
Ahmed, 1994					+		-(1)
Vogel, 1997	+	0	0	0	0	0	0

(*) (+), asociación con niveles mayores; (-), asociación con niveles menores; (0), no asociación. (1) Asociado con mayores niveles en grandes bebedores.

TABLA 12.- Niveles "óptimos" (recomendados) de β -caroteno, retinol y α -tocoferol en suero.

Compuesto	Deficiente	Marginal	Adecuado	Óptimo	Referencia
β -caroteno				>21	Gey, 1987
$\mu\text{g}/\text{dl}$					
	<16	16-37	>37	>64	Keller, 1988
				>28-37	Diplock, 1993
				>16-21	Gey, 1993
Retinol	<28	28-40	>40	57-114	Keller, 1988
$\mu\text{g}/\text{dl}$					
α -tocoferol	<0.65	0.65-0.86	>0.86	>1.08	Keller, 1988
mg/dl					
				>1.35	Biesalski, 1995

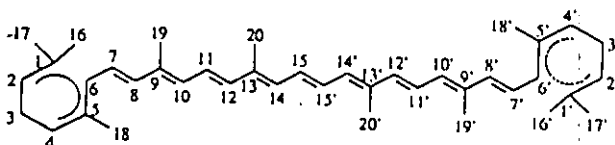
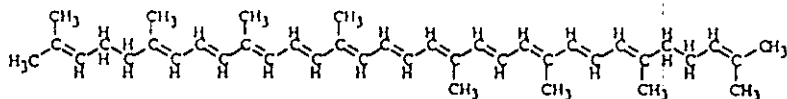
TABLA 13.- Retinol, α -tocoferol y carotenoides séricos en sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente (*).

<u>Referencia (sujetos)</u>	<u>Retinol</u>	<u>α-tocoferol</u>	<u>L/Z</u>	<u>β-cript.</u>	<u>Licopeno</u>	<u>α-carot.</u>	<u>β-carot</u>
Boeck,1929 (n=100)							+ <u>86%</u>
Rabinowitch,1930 (n=500)							+ <u>82%</u>
Ralli, 1935 (n=5)							+
Heyman, 1936 (n=10)							+(3)
Stepp,1936							+
Murrill,1941(n=16)	0						
Mosenthal,1944 (n=114)	- <u>68%</u>						+ <u>28%</u>
Kimble, 1946 (n=116)	-						+
Cohen, 1958	-						+
Ramachandran,1973 (n=40)	0						0
Lewis,1973 (n=36)		0					
Hoerer,1974 (n= 51)							-
Anderson, 1980				---	-----	--0/(1)-	-----
Vatassery,1983 (n=9)		0/- (2)					
Karpen, 1985 (n=13)		- (3)					
Vandewoude,1987 (n=34)		+/0 (4)					
Collette,1988 (n=9)		0					
Basu, 1989 (n=25)	-						
Caye-Vaughien,1990(n=10)		+					
Krempft,1991 (n=35)	-	+					
Martinoli,1993 (n=60)	-	+(5)					
Holler,1993 (n=20)	-	0					
Tamai, 1994 (n=26)	-						+
Tsai, 1994 (n= 19)		0		---	-----	--0 (1)--	-----
Griesmacher,1995 (n=77)		0					
Ndahimana,1996 (n=119)		+					
Krill,1997(n=11familias)	-						

(*) Población no diabética como grupo de referencia. Las citas anteriores a los años 80 se refieren a medidas espectrofotométricas y los datos de β -caroteno corresponden a mediciones a 450 nm, referidas como "carotenos". Valores subrayados indican % de la población diabética con niveles superiores (+) o inferiores (-) en diabéticos; (0) no diferencia entre grupos. (1) "total carotene".(2) Tocoferol más bajo en sujetos con mayor edad. (3) Valores en plaquetas. (4) Elevados en sujetos con hipercolesterolemia (5) Diabéticos con mayor edad y/o nefropatía.

CAROTENOIDES

Estructura básica ($C_{40}H_{56}$) y numeración.



Grupos terminales de carotenoides presentes en suero.

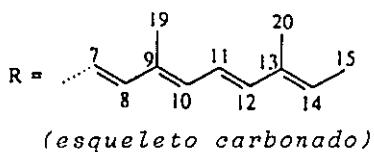
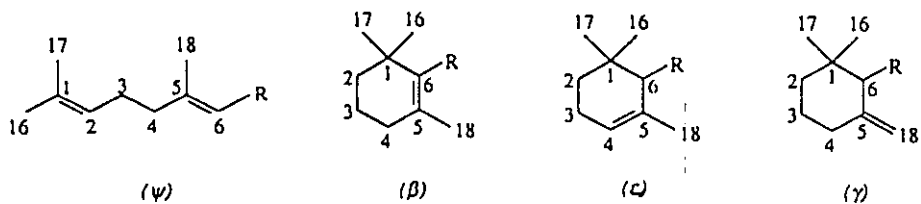


Figura 1.- Estructura básica de carotenoides, numeración y estructura y denominación de carotenoides objeto de estudio.

Figura 2.-

HIDROXICAROTENOIDES

ESTRUCUTRA	DENOMINACION
	<p>Luteína (β, ϵ-caroten-3,3'-diol)</p>
	<p>Zeaxantina (β, β-caroten-3,3'-diol)</p>
	<p>Anhidroluteína I (3-OH-3,4'-didehidro-β, γ-caroteno)</p>
	<p>2,3'-Anhidroluteína II (3-OH-2,3'-didehidro-β, ϵ-caroteno)</p>
	<p>3,4'-Anhidroluteína III (3'-OH-3,4'-didehidro-β, β-caroteno)</p>
	<p>α-Criptoxantina (β, ϵ-caroten-3-ol)</p>
	<p>β-Criptoxantina (β, β-caroten-3-ol)</p>
	<p>Palmitato de luteína (Palmitato de β, ϵ-caroten-3-ol)</p>

Figura 3.-

CETOCAROTENOIDES

ESTRUCTURA	DENOMINACION
	<i>ε,ε-caroten-3,3'-diona</i>
	<i>3'-OH-ε,ε-caroten-3-ona</i>
	<i>3-OH-β,ε-caroten-3'-ona</i>
	<i>Equinenona (β,β-caroten-4-ona)</i>
	<i>Cantaxantina (β,β-caroten-4,4'-diona)</i>

APO-CAROTENALES

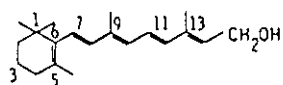
	<i>β-apo-8'-carotenal</i>
	<i>β-apo-10'-carotenal</i>
	<i>β-apo-12'-carotenal</i>
	<i>β-apo-14'-carotenal</i>

Figura 4.-

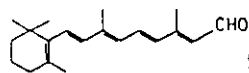
CAROTENOS

Estructura	Denominación
	α-Caroteno (β, ε-caroteno)
	β-Caroteno (β, β-caroteno)
	γ-Caroteno (β, ψ-caroteno)
	Licopeno (ψ, ψ-caroteno)
	ξ-Caroteno (7, 8, 7', 8', tetrahidro- licopeno)
	Neurosporeno (7, 8, dihidrolicopeno)
	Fitoflueno (15-cis-7, 8, 11, 12, 7', 8'- hexahidrolicopeno)
	Fitoeno (15-cis-7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12' octahidrolicopeno)

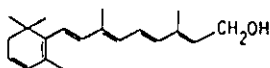
Figura 5.- Vitamina A. Estructura del retinol y derivados.



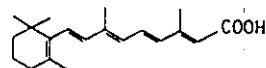
Retinol



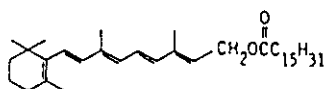
Retinal



Dehidro-retinol (A₂)

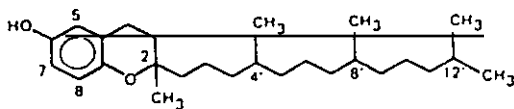


Acido retinoico

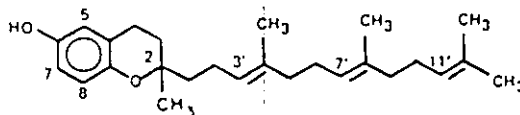


Palmitato de retinilo

Figura 6.- Vitamina E. Miembros de la serie de tocoferol.



Estructura TOCOL



Estructura TRIENOL

Posición de metilos	Estructura TOCOL	Estructura TRIENOL
5, 7, 8	α-tocoferol	α-tocotrienol
5, 8	β-tocoferol	β-tocotrienol
7, 8	γ-tocoferol	γ-tocotrienol
8	δ-tocoferol	δ-tocotrienol

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS.

La diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) es un trastorno metabólico que puede modificar el status nutricional sérico de algunos micronutrientes y compuestos relacionados (carotenoides no provitamínicos). Tradicionalmente, los sujetos con DMID se han clasificado entre los grupos de riesgo frente a un status nutricional bajo de determinados micronutrientes y un mayor stress oxidativo.

Una alta ingesta o niveles séricos elevados de carotenoides, α - y γ -tocoferol y, en menor medida, retinol, están epidemiológicamente asociados como factores preventivos frente a determinadas enfermedades -ciertos tipos de cáncer, enfermedad cardiovascular, cataratas. Asimismo, se ha propuesto que la suplementación con determinados antioxidantes podría ejercer un efecto "preventivo" sobre el desarrollo y la progresión de algunas complicaciones a largo plazo de la diabetes.

Hipótesis

La diabetes mellitus insulino-dependiente es un factor determinante de los niveles séricos de carotenoides, retinol, α - y γ -tocoferol, modificando su absorción (y/o conversión a retinol), transporte, metabolismo y/o utilización (aclaramiento).

OBJETIVOS:

1.- Estudiar, cuali y cuantitativamente, los niveles de carotenoides, retinol, α - y γ -tocoferol en suero de una población de sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente y su comparación con población control no diabética.

2.- Evaluar en sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente posibles factores determinantes de los niveles séricos de carotenoides, retinol y tocoferoles: ingesta dietética, aclaramiento en suero de carotenoides y biodisponibilidad (absorción y conversión a retinol) de carotenoides, con y sin actividad provitamínica, tiempo de evolución de la enfermedad y control de la glucemia.

SUJETOS

3.- SUJETOS

La distribución de los grupos estudiados en el presente trabajo se muestra como organigrama en la figura 7.

Los sujetos no seguían dietas especiales o de adelgazamiento y no tomaban suplementos vitamínicos, dietéticos o productos de herbolario que pudieran afectar los niveles de carotenoides, retinol y/o α -tocoferol, salvo los anticonceptivos orales que no se consideraron criterio de exclusión (excepto en el estudio de seguimiento).

En todos los grupos, los niveles de colesterol total, triglicéridos y colesterol-HDL estuvieron dentro del rango de normalidad. La distribución de edades en los grupos se muestra en la figura 8. Dada la variación estacional en la ingesta de carotenoides (Granado y cols, 1996) y su impacto sobre los niveles séricos (Olmedilla y cols, 1994), la toma de muestras en todos los grupos se distribuyó a lo largo del año (primavera-verano/otoño-invierno) (Tabla 14).

3.1.- Grupo Control.

3.1.1.- Valores de Referencia.

Para establecer "rangos de referencia" de carotenoides en suero, se estudiaron un total 450 sujetos (210 hombres, 240 mujeres) con edades entre 5-79 años (mediana: hombres 32; mujeres 32,5), aparentemente sanos, con residencia en Madrid y su provincia (área metropolitana y rural).

3.1.2.- Estudio familiar.

Grupo control "familiar"

Se estudiaron un total de 214 sujetos aparentemente sanos (97 hombres, 117 mujeres), con edades entre 6-79 años (mediana: hombres 28; mujeres 26), no diabéticos y familiares en primer grado de sujetos diabéticos insulino-dependientes (n=54). El índice de masa corporal (BMI) fue de 25 +/- 4.8 (hombres) y 23.8 +/- 6 (mujeres). La proporción de fumadores fue de 15% en los hombres y 9% en las mujeres.

Grupo control "no-familiar". Relación dieta/suero.

Se incluyeron 236 sujetos (113 hombres, 123 mujeres), con edades entre 5-76 años (hombres: mediana 35 ; mujeres: mediana 35), con BMI de 26.1 +/-4.2 para hombres y 22.5+/-3 para mujeres. La proporción de fumadores fue de 38% en hombres y 31% en mujeres. Para la comparación entre ingesta y niveles séricos de carotenoides, como grupo control se tomaron 67 sujetos entre 25-45 años, no fumadores, participantes en un estudio de suplementación con carotenoides y financiado por la Unión Europea (AIR CT/93-0888). En estos sujetos se evaluó la ingesta de carotenoides a partir de frutas y hortalizas frescas en la misma época del año (invierno) utilizando los mismos métodos (CFS y registros de 3 días de dieta) que en el grupo de diabéticos y se evaluó la "validación" y "reproducibilidad" del CFS.

3.2.- Sujetos con Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente.

3.2.1.- Población general.

Como población global de pacientes con DMID se estudiaron 123 sujetos (60 hombres, 63 mujeres), con edades entre 13-84 años (mediana: hombres 27,5; mujeres 27), con residencia en la Comunidad

de Madrid y atendidos en el Area 6 del INSALUD. Todos ellos son pacientes externos del Servicio de Nutrición y Diabetes de la Clínica Puerta de Hierro, al cual acuden para el control y seguimiento de la enfermedad.

El único criterio de inclusión fue la presencia de diabetes mellitus insulino-dependiente, no teniendo en cuenta el perfil lipídico, niveles de fructosamina y glicohemoglobina (HbA_{1c}), tiempo de evolución de la enfermedad, presencia de complicaciones (micro o macrovasculares), BMI, hábito tabáquico, hábitos dietéticos (excepto uso de suplementos) o status socio-económico.

3.2.2.- Estudio familiar.

Se estudiaron 54 diabéticos (DMID) entre 13-67 años (Hombres: mediana 27 años; Mujeres: mediana 30 años) durante el periodo marzo 1992/mayo 1993. La influencia del tiempo de evolución de enfermedad y la presencia de retinopatía se evaluó dividiendo el grupo con < de 10 años de evolución (n=26; 14 hombres, 12 mujeres) y > de 10 años de evolución (n=28; 14 hombres, 14 mujeres). Todos los sujetos fueron tratados con un promedio de dos inyecciones diarias de insulina de acción prolongada (p.e. Humulina^R, Insulatard^R) sólo o mezclada con insulina de acción rápida (p.e. Actrapid^R, Velosulin^R) (50% de los sujetos). Las características de esta población se muestra en la Tabla 15.

3.3.- Estudio de seguimiento.

El estudio de seguimiento, se realizó en 63 sujetos con DMID sometidos a protocolo de tratamiento intensivo de la diabetes (múltiples autocontroles diarios y ajuste de las dosis de insulina). Los criterios de selección de estos sujetos a la entrada en el estudio fueron edad entre 14-35 años, menos de 5 años de evolución de la enfermedad, sin remisión espontánea, sin complicaciones clínicas aparentemente (macro y/o microvasculares), sin enfermedad

intercurrente, sin hipertensión ni hipercolesterolemia, sin presencia de embarazo ni uso de suplementos vitamínicos, productos de herbolario o anticonceptivos orales.

Todos los sujetos visitaron el Servicio de Nutrición y Diabetes de la Clínica Puerta de Hierro cada 3-6 meses (dependiendo del control de la diabetes) coincidiendo con la extracción de muestra de sangre y la evaluación dietética. Las características de los sujetos a la entrada del estudio se muestran en tabla 16.

Los parámetros lipídicos y glucémicos, hierro sérico, ferritina, transferrina y cinc fueron determinados por el Servicio de Bioquímica Clínica de la Clínica Puerta de Hierro. También se registraron microalbuminuria, BMI, frecuencia de hipoglucemias, dosis de insulina, autocontroles diarios de glucemia y aparición de infecciones.

3.4.-Estudio de aclaramiento y biodisponibilidad.

Un total de 18 sujetos (10 IDDM y 8 controles) fueron incluidos en el estudio de aclaramiento, de los cuales 7 diabéticos y 5 controles participaron en el ensayo de biodisponibilidad. El estudio de biodisponibilidad se llevó a cabo mediante doble suplementación con una cápsula de $\alpha+\beta$ -caroteno y luteína en cada sujeto, con un período de descanso de 15 días entre ambos tratamientos. Sólo 2 controles no pudieron realizar el doble estudio. Las características de los sujetos a la entrada del estudio se muestra en la tabla 17.

El estudio de depleción de carotenoides en suero con dieta "pobre" en carotenoides y las pruebas de respuesta a dosis únicas se llevaron a cabo de forma simultánea conforme al siguiente protocolo. Para el estudio de depleción, se informó a los participantes sobre la necesidad de evitar frutas y hortalizas ricas en carotenoides así como otros alimentos y platos preparados que tuvieran carotenoides en

su composición (ver Apéndice II). Los sujetos que realizaron el estudio de biodisponibilidad, además, evitaron el consumo de alimentos con vitamina A preformada (retinol) durante las 24 horas previas a la administración de la cápsula de $\alpha+\beta$ -caroteno. Todos los sujetos llevaron un registro del consumo de alimentos durante el estudio, y se cuantificó aplicando porciones estándar.

El objetivo de la dieta "pobre" en carotenoides era conseguir un aporte de carotenoides totales < 0.5 mg/día y/o $< 10\%$ del consumo de carotenoides a partir de frutas y hortalizas frescas en la población general (Granado y cols, 1996). El estudio se llevó a cabo durante 11-21 días, obteniendo muestras de sangre en ayunas los días 0, 1, 2, 3, 6, 11, 15, 16, 17 y 21.

El estudio de biodisponibilidad con $\alpha+\beta$ -caroteno se realizó el día 1, tras 24 horas de dieta libre de retinol. Los sujetos acudieron al laboratorio tras, al menos, 10 horas de ayuno cogiéndose una vía para la obtención de sangre a distintos tiempos durante las 8-9 horas siguientes a la administración de la cápsula. Se tomó una muestra de sangre en ayunas (basal) e, inmediatamente después, los sujetos tomaron un desayuno estándar consistente en leche desnatada, pan y aceite de oliva (40 g) junto con la cápsula conteniendo extractos naturales de carotenoides, equivalente al aportado por a) 100g de zanahorias cocidas ($\alpha+\beta$ -caroteno) y b) 200g de espinacas cocidas (luteína).

Las cápsulas fueron las utilizadas en el Proyecto AIR CT93-0888 de la UE. Los extractos fueron preparados por Unilever y encapsulados por Scherer R.P. North America y su composición se muestra en la tabla 18. Tras el desayuno, se tomaron muestras de sangre cada hora durante un período de 8-9 horas. Dadas las características especiales de los sujetos diabéticos, todos los sujetos tomaron una pieza de fruta (pera o manzana, pelada) a media mañana y una comida estándar (sin carotenoides ni retinol) a las 5 horas de iniciar el estudio.

El estudio de biodisponibilidad con luteína se realizó el día 15, tras 14 días de dieta "pobre" en carotenoides y 13 días después de la administración de $\alpha+\beta$ -caroteno. El protocolo seguido fue idéntico al de $\alpha+\beta$ -caroteno, obteniendo muestras de sangre cada hora, a las 24 y 48 horas y 6 días después de la toma de la cápsula.

3.5.- Consentimiento informado.

Los procedimientos utilizados en los diferentes ensayos (AIR CT93-0888 y FIS 97/0966) están de acuerdo con las normas éticas del Comité de Ensayos Clínicos de la Clínica Puerta de Hierro y fueron aprobados por el Ministerio de Sanidad. Todos los sujetos fueron informados y dieron su consentimiento por escrito, con la aprobación del padre o tutor en caso de menores de edad.

TABLA 14.- Grupos de población (*) y distribución anual (%) de la toma de muestras.

	<u>Población referencia</u>				<u>Estudio familiar</u>					
	<u>Control</u>		<u>DMID</u>		<u>Familiares</u>		<u>No-fam.</u>		<u>DMID</u>	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
n	210	240	60	63	97	117	113	123	28	26
Edad										
(mediana)	32	32.5	27.5	27	28	26	35	35	27	30
(rango)	(5 - 79)		(13 - 84)		(6 -79)		(5-76)		(13-67)	
	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>O</u>	<u>I</u>	<u>(0-6 / 7-12)</u>		<u>(P+V / O+I)</u>			
POBLACION CONTROL:										
Hombres	31	13	18	38	69 / 31		44 / 56			
Mujeres	37	15	18	31	68 / 32		52 / 48			
POBLACION DMID:										
Hombres	25	25	27	23	48 / 52		50 / 50			
Mujeres	30	24	22	24	54 / 46		54 / 46			
ESTUDIO FAMILIAR										
Familiares en 1^{er} grado:										
Hombres	50	14	17	19	69 / 31		64 / 36			
Mujeres	64	11	16	9	73 / 27		75 / 25			
Controles no familiares:										
Hombres	11	12	20	57	68 / 32		23 / 77			
Mujeres	16	16	20	48	64 / 36		32 / 68			
DMID:										
Hombres	52	3	24	21	73 / 27		55 / 45			
Mujeres	56	28	8	8	64 / 36		84 / 16			
DMID (tiempo de evolución de la enfermedad)										
< 10 años (n=28)	43	21	18	18	61 / 39		63 / 37			
> 10 años (n=26)	65	8	15	12	77 / 23		73 / 27			

(*) Hombres (H); Mujeres (M); primavera (P), verano (V), otoño (O), invierno (I). Distribución conforme al primer (0-6) y segundo (7-12) semestre del año.

TABLA 15.-Características de los pacientes diabéticos incluidos en el estudio familiar (Media (Desv. Standard)).

	HOMBRES (n=28)	MUJERES (n=26)
Edad (años)	32.3 (14.6)	31.9 (12.5)
BMI (Kg/m ²)	22.9 (2.9)	24.3 (3.9)
Colesterol (mg/dl)	186 (58)	209 (46)
c-HDL (mg/dl)	53 (18)	64 (22)
Fructosamina (mmol/L)	3.61 (2.72)	3.84 (0.56)
HbA _{1c} (%)	9.81 (2.72)	10.42 (2.14)
Tiempo de Evolución		
(% sujetos) < 10 años	50%	54%
> 10 años	50%	46%
Retinopatía (% sujetos)	25%	27%
Fumadores (% sujetos)	21%	46%
Creatinina sérica (μmol/L)	1.02 (0.11)	0.83 (0.09)
Acido úrico (mg/dl)	4.1 (0.8)	3.3 (1.1)
Urea (mg/dl)	36 (7)	34 (7)
Albúmina (g/L)	4.6 (0.4)	4.4 (0.4)
Insulina (UI/kg/d)	0.60 (0.21)	0.68 (0.22)
Dosis Total Insulina / día	40.1 (10.5)	40.5 (13.9)

TABLA 16.- Características del estudio de seguimiento. Sujetos en tratamiento intensivo.

	Hombres	Mujeres
No. sujetos incluidos	32	31
No. sujetos excluidos	2	4
Causas: Uso de suplementos vitamínicos	1	2
Anticonceptivos/embarazo	-	2
Sin determinación basal	1	-
No. sujetos para seguimiento	30	27
Tiempo medio de seguimiento (meses)		
Media (rango)	15 (0-30)	17 (0-33)
No. de abandonos (%)		
a 12 meses	4/24 (17)	4/22 (18)
a 24 meses	13/21 (62)	7/19 (37)
No. de fumadores (%)	5 (17)	11 (41)
Tiempo en Tto. intensivo hasta		
1ª determinación (meses)	0 - 8	0 - 6

Características de sujetos DMID a la entrada del estudio de seguimiento (media (SD)).

	Hombres	Mujeres
Edad (media)	21,7 (6,6)	20,3 (5,7)
BMI	2,4 (2,7)	22,0 (2,3)
HbA _{1c} (%)	7,9 (2,1)	8,6 (1,6)
Fructosamina (mmol/L)	2,7 (0,9)	2,8 (0,6)
Glucemia (mg/dl)	151 (69)	193 (86)
Colesterol (mg/dl)	168 (18)	175 (24)
Triglicéridos (mg/dl)	62 (17)	60 (17)
Cinc (µg/dl)	99 (14)	98 (11)
Ferritina (µg/ml)	86 (37)	38 (29) (*)
Creatinina (mg/dl)	0,97 (0,13)	0,84 (0,10) (*)
Insulina/día (u.i)	42 (15)	44 (16)
Retinol (µg/dl)	39 (9)	35 (8)
α-toc./col (µg/mg)	6,1 (1,0)	6,2 (1,0)

(*)p<0.01

TABLA 17.-Características de los sujetos a la entrada en el estudio de aclaramiento y biodisponibilidad (media,SD,**rango).**

Contactados	21 IDDM	
Incluidos:		
"Aclaramiento"	10 IDDM	8 controles
"Biodisponibilidad"	7 IDDM	5 controles
	<u>DMID (n=10)</u>	<u>Control (n=8)</u>
Edad (años)	24 (6)	27 (3)
Sexo	7H / 2M	6H / 1M
IMC (kg/m ²)(*)	22.6 (1.6)	25.7 (1.3)
Tiempo de evolución (años; mediana (rango))	6 (< 1-23)	-
Colesterol (mg/dl)	168 (44)	178 (20)
cHDL (mg/dl)	58 (13)	61 (18)
Triglicéridos (mg/dl)	94 (49)	85 (48)
Glucemia basal (*) (mg/dl)	227 (105)	95 (5)
HbA _{1c} (%)(**)	7.7 (2)	4.8 (0.5)
Fructosamina (*) (mmol/L)	1.9 (0.5)	1.3 (0.12)

H:Hombres; M:Mujeres; (*) p<0.01; (**) p<0.005.

TABLA 18.- Composición de carotenoides y tocoferoles (mg/cápsula) de las cápsulas administradas en los estudios de biodisponibilidad (*).

<u>Compuesto</u>	<u>α+β-caroteno</u>	<u>Luteína (1)</u>
α-tocoferol	1.75 (1)	3.3
γ-tocoferol	--	--
All-trans-luteína	--	12.12
13/15-cis-luteína	--	3.17
Zeaxantina	--	--
Licopeno total	--	--
α-caroteno total	3.70	--
β-caroteno total	8.20	--
all-trans-β-caroteno	4.98	--
9-cis-β-caroteno	2.42	--

(*) Determinación por HPLC (Unidad de Vitaminas. Clínica Puerta de Hierro). (1) Cuantificación en extractos saponificados.

Fig. 7.- STATUS SERICO DE CAROTENOIDES, VITAMINAS A Y E

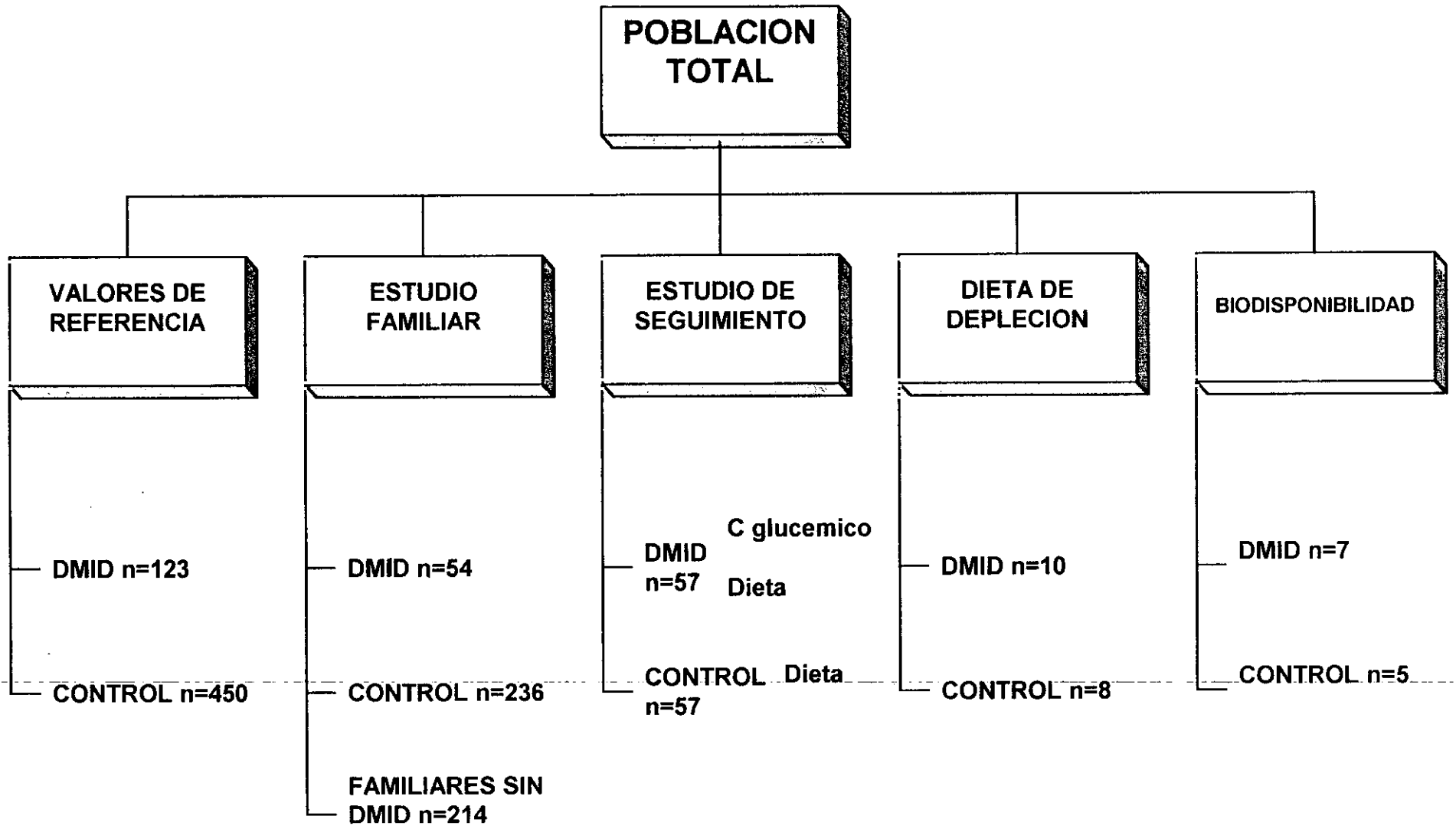
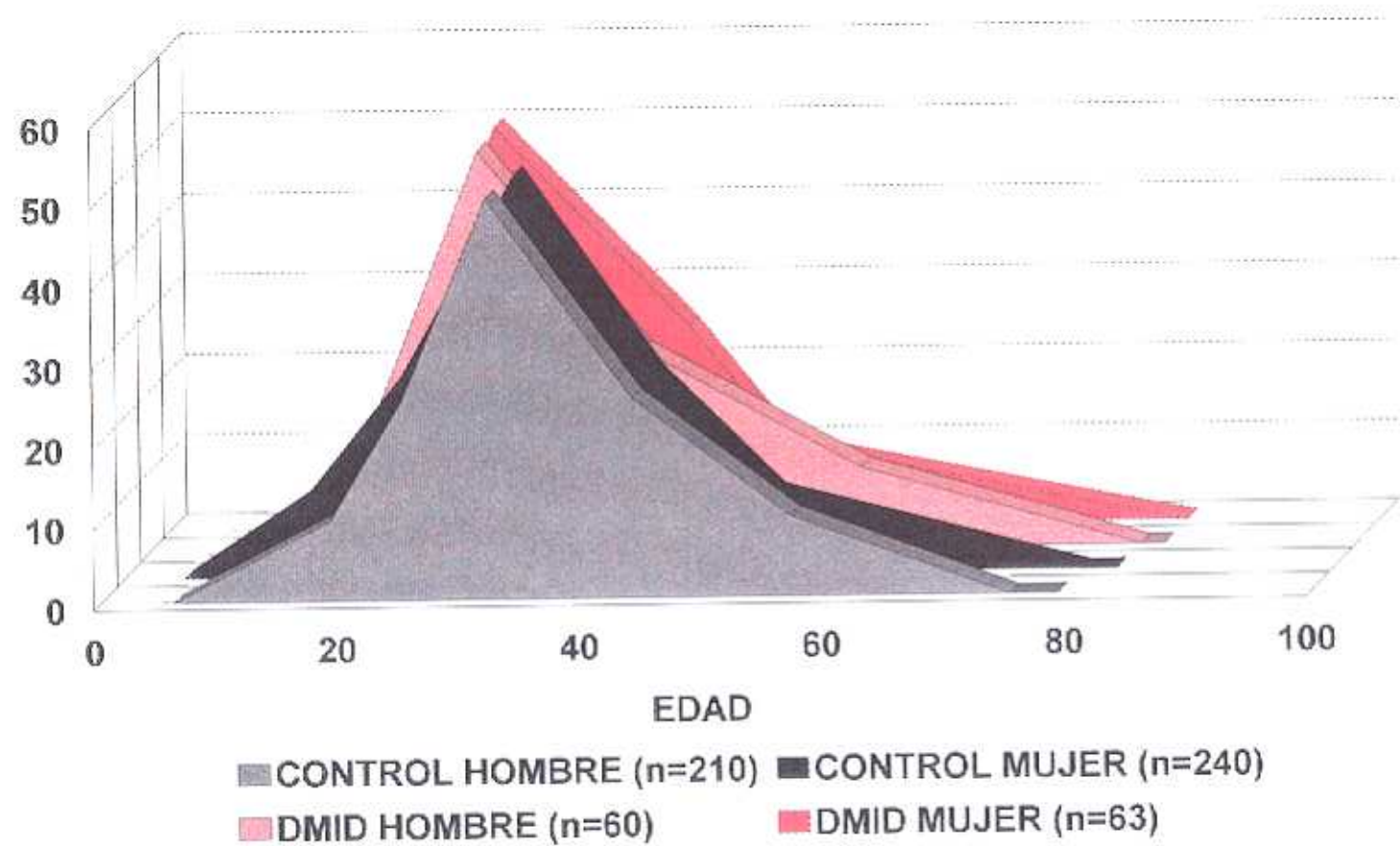


Fig. 8.- DISTRIBUCION DE EDAD EN GRUPOS DE POBLACION



MATERIAL Y MÉTODOS

4.- MATERIAL Y METODOS

4.1.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

4.1.1.- Equipo de cromatografía

El equipo cromatográfico consistió en un cromatógrafo ALC/GPC (modelo 201, Waters Associates, Milford, MA) equipado con dos bombas (modelo 6000A y M45) e inyector manual (modelos U6K y Reodhyne). Para la detección se utilizaron detectores UV/VIS , modelo 440 (filtro fijo), 490 E (longitud de onda variable y programable en el tiempo) y 990 (red de diodos) (Waters Associates). Las señales del detector se registraron en M730 Data Module y Millenium Station (version 2.0).

La corrección espectrofotométrica de patrones se realizó con un espectrofotómetro de doble haz (Uvicon 930, Kontron Instruments).

4.1.2.- Estándares y reactivos.

Licopeno, all-trans α - y β -caroteno, all-trans-retinol, acetato de retinol, palmitato de retinilo, D- α -tocoferol, γ -tocoferol y acetato de D- α -tocoferol se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). β -apo-8'-carotenal se obtuvo de Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). Luteína, zeaxantina, γ -caroteno, cantaxantina, 9-cis, 13-cis y 15-cis- β -caroteno, β -criptoxantina, fitoeno, mutatochromo, 10'-, 12'- y 14'- β -apo-carotenal fueron suministrados generosamente por Hoffmann-La Roche (Basilea, Switzerland). Muestras de patrones puros de α -criptoxantina, ξ -caroteno , anhidroluteína I, II y III fueron donados por el Dr. F. Khachick (USDA, Beltsville, MD, USA). Violaxantina, neoxantina, 13-cis-luteína (neoluteína A) y 13-cis-zeaxantina (neozeaxantina A) fueron cedidos por el Dr. Tóth (Pécs, Hungría). Patrones de ésteres de luteína (monopalmitato, dipalmitato, dimiristato y miristato-palmitato) fueron suministrados por el Dr. Stahl (Düsseldorf, Alemania).

Tetrahidrofurano (THF) se obtuvo de Scharlau (Barcelona, España), Hidroxibutiltolueno (BHT) y diclorometano de Carlo Erba (Barcelona, España), metanol, etanol, n-hexano y acetonitrilo (grado HPLC) fueron suministrados por Merck (España) y acetato amónico se obtuvo de Sigma Chemical (España).

4.2.- Método de análisis.

4.2.1.- Condiciones cromatográficas

Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa conforme a las condiciones descritas por Olmedilla y cols (1990, 1992, 1997b) y Granado y cols (1991). El sistema cromatográfico consistió en columnas C-18 Spheri-5-RP-18 (monofuncional) y Spheri-5-ODS (polifuncional) (5 μm , 250 x 4.6 mm) , y precolumna Aquapore ODS RP-18 (7 μm) (15 x 3.2 mm) (Applied Biosystems, Inc., San José. CA).

Como fase móvil se utilizaron tres sistemas de solventes binarios y ternarios premezclados y elución en isocrático o en gradiente. El sistema I, consistió en una mezcla de acetonitrilo/diclorometano/metanol (70/20/10) a flujo 1.8 ml/min y el sistema II , en acetonitrilo/metanol (85/15) en gradiente de flujo de 1.8 a 3.5 ml/min. El sistema III, consistió en un gradiente lineal mezclando los sistemas II/I (98%, 2%) a tiempo cero hasta el minuto seis (sistema II/I ; 2%, 98%) el cual se mantuvo hasta el minuto 15 retornando a condiciones iniciales. El tiempo total de análisis fue de 20 minutos más un tiempo de reequilibrado de columna de 10 minutos. Se añadió acetato amónico (0.025 M) a ambas fases móviles para mejorar la recuperación de carotenoides en columna (Craft, 1993).

El sistema III separa los siguientes compuestos de forma simultánea: retinol, acetato de retinol (estándar interno) y palmitato de retinilo, α -, γ - y δ -tocoferol, luteína, zeaxantina, 13/15-cis-luteína, cis-zeaxantina, cantaxantina, β -apo-8'-carotenal, anhidroluteína I y II, α - y β -criptoxantina, licopeno trans, 5/7 o 9

cis-licopeno, 13/15-cis-licopeno, neurosporeno, γ -caroteno, ξ -caroteno, α -caroteno, all-trans- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno y 13/15-cis- β -caroteno, fitoflueno y fitoeno (Granado et al, 1991; Olmedilla et al, 1997b).

4.2.2.- Preparación de la muestra.

Las muestras de sangre obtenidas en ayunas fueron centrifugadas a 630 x g durante 10 minutos. El suero se separó y se almacenó a -20°C ó -75°C hasta el análisis (menos de 5 meses a -20°C y de un año a -75°C) para asegurar la estabilidad de los compuestos a analizar (Craft y cols, 1988; Thurnham y cols, 1988b).

Brevemente, 500-1000 μ l de etanol conteniendo acetato de retinol y/o acetato de tocoferol como estándares internos se añadieron a 500-1000 μ l de suero. Tras agitar en vortex durante 45 segundos, se hizo doble extracción añadiendo el doble de volumen de hexano o hexano/diclorometano (5:1) estabilizado con BHT (0.01%) y agitando 3 y 2 minutos, respectivamente. Las fases orgánicas se separaron, juntaron y evaporaron bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se reconstituyó con 200 μ l de tetrahidrofurano (inyección en sistema I), etanol /tetrahidrofurano (3:1) (inyección en sistema II) o etanol /tetrahidrofurano (1:1) (inyección en sistema III, gradiente). El volumen de inyección fue entre 5-10 μ l.

La recuperación de los carotenoides en la primera y segunda extracción así como el efecto del solvente desnaturizante (etanol vs isopropanol), solvente de extracción, columna y fase móvil y varios ciclos de congelación/ descongelación de la muestra sobre la isomerización de carotenoides durante la extracción, se comparó con el método descrito por Stahl y cols (1992b). El porcentaje de recuperación fue superior al 95% para todos los carotenoides. La recuperación de retinol y α -tocoferol añadidos a la muestra fue de 96 (\pm 8) y 98 (\pm 9), respectivamente (Olmedilla y cols, 1992).

4.2.2.1.- Separación de la fracción de "lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL)".

En el estudio de biodisponibilidad, la cuantificación de ésteres de retinol y carotenoides se realizó en fracciones de TRL según el protocolo descrito por Griffiths y cols, 1994. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con EDTA (5%) y se centrifugaron a 2000 x g durante 20 minutos dentro de los 30 minutos siguientes a la obtención de la muestra. Alrededor de 0.5-1 ml de plasma se separó para la cuantificación de carotenoides y ésteres de retinol en plasma total y 2.5-3 ml de plasma se utilizaron para la separación de TRL. Ambas muestras se congelaron a - 20°C hasta su análisis (< 20 días).

Para el aislamiento de TRL, las muestras se descongelaron lentamente a 4°C, y agitando suavemente. Las muestras se prepararon por duplicado transfiriendo 0.5 ml de plasma a tubos eppendorf a los cuales se añadió 0.8 ml de solución de NaCl 0.9% (densidad = 1.006 kg/L) y se sometieron a centrifugación (12.600 x g) durante 2 horas. La fracción "TRL" de cada duplicado era recogida mediante aspiración, lavando las paredes del tubo, y se juntaron para su extracción. La validación de éste protocolo se realizó comparando los resultados con la técnica de aislamiento de TRL descrita por Van Vliet y cols (1995) consistente en ultracentrifugación a 100.00 x g durante 30 minutos (rotor flotante SW40 Ti (Beckman)), tanto en sujetos control y diabéticos para muestras obtenidas durante 8 horas del estudio.

En sujetos control, los coeficientes de variación, en el día y entre días, del método de aislamiento de TRL rindieron valores de 1% y 6% para α -caroteno, 1% y 2% para all-trans- β -caroteno, 9% y 4% para palmitato de retinilo y 16% y 8% para luteína, respectivamente. En sujetos diabéticos, los coeficientes de variación, en el día y entre días, fueron de 5% y 1% para α -caroteno, 3% y 9% para all-trans- β -caroteno, 9% y 10% para palmitato de retinilo y 2% y 4% para luteína, respectivamente.

4.2.3.- Detección e identificación de compuestos en suero.

Los carotenoides se detectaron a 450 nm (excepto para fitoeno a 286 nm, fitoflueno a 370 nm y ξ -caroteno a 402 nm); retinol, retinol acetato y palmitato de retinilo a 325 nm, α - y γ -tocoferol se detectaron a 294 nm. La identificación de carotenoides en suero se realizó comparando los tiempos de retención con los mostrados por los patrones, co-elución al inyectar suero con patrones añadidos, determinación del espectro de absorción y longitudes de onda máxima (principal y mayor longitud de onda) y relación %III/II (Longitud de onda mayor/Longitud de onda máxima). Los datos se compararon con patrones disponibles y datos aportados en la bibliografía (Tabla 19).

La detección e identificación de formas "cis" se realizó por lectura simultánea del pico a 330-340 nm para la mayoría de los carotenoides - 360-370 nm para el licopeno, determinando la relación de absorbancia en región "cis"/436 nm y Q-ratio (longitud máxima/región "cis") y su comparación con datos de patrones y bibliografía.

4.2.4.- Cuantificación. Pureza de patrones y curvas de Calibrado.

Las concentraciones de las soluciones stock se calcularon corrigiendo las medidas gravimétricas sobre la base de los valores de absorptividad ($E 1\% 1\text{cm}$) publicados en la bibliografía (Tabla 20) y por inyección individual en el sistema de HPLC para su corrección por presencia de isómeros y/o otros picos presentes en el cromatograma.

Las soluciones stock de cada carotenoide se prepararon disolviendo 1-3 mg del compuesto en 50 ml de THF estabilizado con BHT (0.01%), las cuales se almacenaron protegidas de la luz a -20°C y bajo atmósfera de nitrógeno. Estas soluciones se diluían posteriormente hasta las concentraciones próximas a las detectadas en suero. Las soluciones de retinoides, d- α -tocoferol y acetato de d-

α -tocoferol se disolvieron en etanol hasta obtener concentraciones de 0.05-1 mg/ml. Estas soluciones eran desechadas cuando las lecturas espectrofotométricas mostraban una disminución de la pureza y, en cualquier caso, mezclas de todos los compuestos se preparaban cada mes (2 meses al utilizar Millenium Station). Diluciones de acetato de retinol (estándar interno) se prepararon semanalmente.

La determinación de las concentraciones de carotenoides en suero se realizó en base a curvas de patrones (externa) conteniendo los carotenoides mayoritarios presentes en suero (luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, licopeno, α - y β caroteno) y determinando área del pico frente a concentración inyectada. Para la cuantificación de retinoides y tocoferoles, se preparó una curva conteniendo retinol, palmitato de retinilo, α - y γ -tocoferol. Ambas curvas contenían acetato de retinilo y/o acetato de tocoferilo como standards internos permitiendo la corrección de las concentraciones de todos los compuestos por pérdidas o concentración de volumen y variaciones en la inyección. La cuantificación de cetocarotenoides, cis-luteína y palmitato de luteína se realizaron frente al patrón de luteína. La cuantificación de isómeros de β -caroteno y licopeno se realizaron frente al patrón de all-trans- β -caroteno y all-trans-licopeno, respectivamente, mientras que para anhidroluteína (I y II), cantaxantina, β -apo-carotenales y fitoeno se realizaron con curvas individuales.

Para generar las curvas de calibrado en ambos casos, se inyectaron 6-8 puntos a diferentes concentraciones que cubrían un rango suficientemente amplio al observado en suero. Los coeficientes de correlación entre área de cada pico y la concentración correspondiente del compuesto en la curva de calibrado variaba entre $r = 0.990 - 0.999$.

4.2.5.- Límite de detección en suero.

Utilizando 0.5 ml de suero y siguiendo el método de preparación de muestra descrito, las cantidades mínimas cuantificables (relación altura de pico/ruido de base =3) expresadas en µg/dl de suero en sistema III son: luteína 1,22; zeaxantina 0,88; β-criptoxantina 1,29; licopeno 1,40; α-caroteno 0,38; β-caroteno 0,56; retinol 2,76; α-tocoferol 55,94; γ-tocoferol 17,5 y palmitato de retinilo 1,74.

4.2.6.- Control de calidad.

El control de calidad de los análisis se realiza mediante la participación en el "Quality Assurance Programme on Fat-Soluble Vitamins" dirigido por National Institute of Standards and Technology (NIST) (Gaithersburg, MD, USA). Las muestras son analizadas tres veces al año e incluyeron muestras "ciegas" para controlar la precisión y exactitud, así como reproducibilidad a corto y largo plazo del método analítico.

4.3.- Método para la evaluación de la ingesta.

4.3.1.- Desarrollo de un Cuestionario de Frecuencias Semicuantitativo para la evaluación de la ingesta de carotenoides.

4.3.1.1.- Objetivos.

Los carotenoides son micronutrientes con una elevada variación intraindividual (Tangney y cols, 1987; Ascherio y cols, 1992; Hercberg y cols, 1994), aunque esta variación en la dieta se puede atenuar al utilizar métodos que evalúan el consumo habitual de alimentos (historia dietética, cuestionarios de frecuencia) (Bloemberg y cols, 1989). Los carotenoides tienen relativamente pocas fuentes dietéticas importantes. Así, un grupo reducido de alimentos puede explicar más del 90% de la variabilidad interindividual en la ingesta de carotenoides en países occidentales (Byers y cols, 1985; Striker y cols, 1991; Block, 1994). En nuestro país, el consumo de

frutas y verduras contribuye en más del 90% a la ingesta de carotenoides (Varela y cols, 1995) siendo un número reducido de frutas y hortalizas los que aportan > 95% de la ingesta individual de carotenoides a partir de frutas y verduras (Granado y cols, 1996).

En el presente estudio, se decidió utilizar como método de evaluación dietética un cuestionario de frecuencias semicuantitativo (asignando porciones estándar) debido a: 1) que la frecuencia de consumo explica la mayor parte de la variación observada en el consumo de alimentos (Willet, 1994), 2) la escasa mejora obtenida al introducir el tamaño de las porciones consumidas en los coeficientes de correlación para la validación con otros métodos de evaluación de ingesta (Willet, 1994) y evitar errores en la estimación de las porciones por los participantes (Garrow, 1995), y 3) la facilidad de cumplimentación, entrada de datos y bajo costo.

El cuestionario perseguía los siguientes objetivos:

- 1.- Obtener información (retrospectiva) sobre la ingesta reciente (15 días) de carotenoides a partir de frutas y hortalizas.
- 2.- Establecer rangos de ingesta de los carotenoides mayoritarios en suero y aplicarlo a la clasificación de individuos.
- 3.- Estudiar las relaciones entre ingesta de frutas y hortalizas, carotenoides específicos y sus niveles en suero.

4.3.1.2.- Selección de frutas y hortalizas

La selección de alimentos para su inclusión en el Cuestionario de Frecuencias Semicuantitativo (CFSC) se realizó en base a los siguientes criterios:

- 1.- Alimentos que fueran consumidos por un porcentaje elevado de la población.
- 2.- Alimentos cuyo consumo varía en frecuencia y cantidad entre la población.
- 3.- Alimentos que contribuyen significativamente a la ingesta de carotenoides a la dieta por su elevado contenido en carotenoides (ej: zanahorias), alta frecuencia de consumo (ej. naranjas) o consumo en gran cantidad (ej. patatas).

La inclusión de alimentos se basó en datos de consumo y compra en España obtenidos de las siguientes fuentes: Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición (INE, 1985, 1994), estudios basados en "cesta de compra" (MAPA, 1988, 1993), Evolución de los Hábitos Alimentarios en España (Moreiras y cols, 1990), Red de Distribución Nacional de frutas y verduras (MERCASA, 1993) y Encuesta de Nutrición de la Comunidad Autónoma de Madrid (Aranceta y cols, 1994).

4.3.1.3.- Diseño del Cuestionario (ver Apéndice I)

Un total de 35 verduras y 17 frutas fueron incluidas en el cuestionario como preguntas "cerradas" (consumo individualizado) así como preguntas "abiertas" sobre consumo de otras no especificadas y cuyo contenido de carotenoides pudiera ser significativo (ej. nispero). En conjunto, los alimentos incluidos suponen más del 97% del consumo total de frutas y hortalizas en España, tanto anual como estacionalmente (INE, 1995). Las hortalizas se agruparon según el color de la porción comestible siguiendo la clasificación en algunos estudios epidemiológicos (Le Marchand y cols, 1989), la posible utilidad en posteriores estudios nutricionales, así como la mayor facilidad al cumplimentar los cuestionarios, procesamiento e interpretación de los datos.

El cuestionario incluyó preguntas generales (fecha, sexo, edad, peso, altura, suplementos, tabaco...), cuestiones sobre consumo general y relevante que pudiera condicionar la biodisponibilidad de carotenoides (ej. consumo de grasa, proteínas, retinol preformado, alcohol,...) (Haraldsdóttir, 1993), además de la específica sobre fuentes dietéticas de carotenoides.

4.3.1.4.- Contenido en carotenoides en frutas y verduras.

El contenido de carotenoides de frutas (n=17) y verduras (n=22) utilizado para la cuantificación de la ingesta corresponde a los análisis realizados en alimentos españoles (Granado y cols, 1992; Olmedilla y cols, 1993, 1996b). Los valores utilizados en el cálculo de la ingesta fueron corresponden a alimentos crudos o hervidos en

agua - cuando se consumen tras procesos culinarios- y saponificados, con el fin de estimar la ingesta total de carotenoides disponibles para su absorción.

La calidad de los datos utilizados, evaluados por la Universidad de Wageningen (Holanda) en cuanto a representatividad de la muestra, manejo de muestras y control de calidad de los análisis, ha sido calificada como "altamente aceptables" (3% "top scored") (Poorvliet and West, 1993).

4.3.1.5.- Control de calidad, validación y reproducibilidad del cuestionario de frecuencias.

Como criterios de control de calidad y validación del CFSC, se utilizaron los siguientes:

1.- Control de calidad (Haraldsdóttir, 1993):

1.a.- Información complementaria: Peso, talla, consumo excesivo o rechazo de determinados alimentos, consumo de carne, pescado, lácteos, huevos.

1.b.- Preguntas de calibración y verificación no cuantitativa:

1.b.1.- Calibración: Preguntas "cruzadas" (consumo general vs consumo específico).

1.b.2.- Verificación no cuantitativa: ej. fecha, consumo estacional y disponibilidad en el mercado.

1.b.3.- Fiabilidad de las respuestas: Preguntas "irrelevantes" (ej. dificultad para responder el cuestionario.)

2.- Validación del cuestionario:

1) Se utilizó como método de validación del CFSC correlación con registros de 3 días (prospectivo) llevados a cabo dentro de la siguiente semana a la cumplimentación del Cuestionario, ya que ambos métodos comportan distintas fuentes de error (Garrow, 1995) y se asumen como representativos de la ingesta "habitual" (Freudenheim, 1987).

- 2) Correlación con niveles séricos de carotenoides en muestras obtenidas dentro de la semana, anterior o posterior, a la cumplimentación del cuestionario. Aunque son válidos cuando estos compuestos responden a la dieta (Jacques, 1993), se ha de asumir que dichos niveles responden de manera dosis-dependiente (Freudenheim, 1987).
- 3) Medias y distribución de ingestas frente a niveles séricos (referencia) así como % de población que se asigna a cada cuartil, en el mismo cuartil y en cuartiles opuestos (Garrow, 1995).

La reproducibilidad del método dietético en diferentes intervalos de tiempo, se llevó a cabo en sujetos control (n=67) los cuales cumplimentaron los cuestionarios y registros de 3 días con un intervalo de tiempo de 3 meses (n=55).

4.3.1.6.- *Procesamiento de los datos de ingesta.*

Para cuantificación de la ingesta de carotenoides se utilizaron los siguientes criterios:

- 1.- El número de piezas /raciones consumidas por semana se refirió a consumo diario tanto en el Cuestionario como en registros dietéticos.

- 2.- Se utilizaron raciones estándar aplicando el porcentaje de porción comestible.

- 3.- Distintas variedades de algunos alimentos se computaron promediando los valores de aquellas variedades con datos disponibles (ej. lechuga de "hoja alargada"/ "iceberg") o se redujeron a una única categoría tomando datos de la variedad disponible de mayor consumo (ej, manzana Golden, pera de agua, tomate de ensalada). Variedades cuyo contenido en carotenoides es significativamente distinto (pimiento rojo y verde) se cuantificaron individualmente.

- 4.- Alimentos específicos normalmente consumidos como platos mixtos o multicomponentes (ej. zanahorias, cebollas, lechuga, tomate natural),

se les asignó un valor cuantitativo medio obtenido a partir de medidas caseras y recetas.

5.- Los cuestionarios evaluados como "inconsistentes" en base a las preguntas "cruzadas" o cumplimentados de forma "incompleta", no se computaron.

6.- Como *control de calidad*, las entradas de datos de todos los cuestionarios y registros de dieta fueron realizadas por duplicado.

4.4.- Métodos estadísticos

Debido a que las distribuciones de concentración de carotenoides en la población no cumplían los criterios de normalidad (Test de Kolmogorov), se utilizaron métodos no paramétricos (U de Mann-Whitney para datos no emparejados y T de Wilcoxon para datos emparejados) para evaluar diferencias entre sexos y grupos, influencia del tiempo de evolución de la enfermedad y presencia o no de retinopatía, dieta, efecto del control metabólico y presencia de infecciones. La relación entre variables se estableció mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El grado de significación se estableció en $p < 0.05$.

Para el análisis de las interacciones entre variables y contribución relativa de cada variable, así como la evolución en el tiempo de las variables estudiadas se utilizaron modelos de regresión múltiple y logística ("paso a paso" y "emparejado"), ajustando o no por la variable sexo. Debido a la gran variación entre sujetos en las variables evaluadas en el estudio de seguimiento, la variación en el tiempo de estos parámetros se evaluó mediante ANOVA de medidas repetidas. El estudio de biodisponibilidad de β -caroteno y luteína así como la desaparición de carotenoides en suero tras dietas pobres en carotenoides, se evaluó mediante el cálculo de área bajo curva de concentraciones frente al tiempo (AUC) -tras corrección por valores basales- mediante la regla de la suma trapezoidal. Las diferencias entre grupos se estudió mediante métodos no paramétricos para datos no emparejados (U de Mann-Whitney). El estudio se llevó a cabo mediante los programas BMDP (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA, USA) y SPSS versión 7.5 (SPSS Inc. IL, USA).

TABLA 19.- Características espectrales utilizadas para la identificación de carotenoides, retinol y tocoferoles en suero.

Ref.	Compuesto	λ máxima (nm)	Solvente	% III/II (Q-ratio)	λ máxima (nm) HPLC (Sist. III) (*)
1	Retinol	325	Etanol		326
1	Acet. retinol	326	Etanol		328
1	Palm. retinol	326	Etanol		328
2	γ -tocoferol	297	Etanol		300
2	α -tocoferol	292	Etanol		295
3	ϵ,ϵ -caroten-3,3'-diona	420, 442, 472			418, 442, 473
3	3'-OH- ϵ,ϵ -caroten-3'ona	423, 442, 472			418, 442, 471
3	3-OH- β,ϵ -caroten-3'ona	423, 448, 476			449, 476
5	Luteína	422, 445, 474	Etanol	60	447, 476
4	13-cis-luteína	423, 453, 483	Hexano	(2.06)	(333),442, 469
5	Zeaxantina	428, 450, 478	Etanol	26	454, 481
4	13-cis-zeaxantina	433, 458, 487	Hexano	(2.02)	(343),450, 474
5	β -apo-14'-carotenal	392	Eter petróleo		406
5	β -apo-12'-carotenal	413	Eter petróleo		428
5	β -apo-10'- carotenal	434	Eter petróleo		452
5	β -apo-8'-carotenal	452	Eter petróleo		459
5	Cantaxantina	474	Etanol		476
3	Anhidroluteína I	446, 476			449, 476
3	Anhidroluteína II	448, 476			450, 478
3	Anhidroluteína III	466			467
5	α -criptoxantina	421, 445, 475	Hexano	60	449,478
5	β -criptoxantina	425, 449, 476	Eter petróleo	25	457,484
5	Licopeno	444, 470, 502	Eter petróleo	65	476,507
5	Neurosporeno	416, 440, 470	Hexano	-	418,444,474
5	γ -caroteno	437, 462, 494	Eter petróleo	40	467,496
5	ξ -caroteno	377, 399, 425	Hexano	103	382,404,428
5	α -caroteno	422, 445, 494	Eter petróleo	55	449,478
5	β -caroteno	425, 450, 477	Eter petróleo	25	457,483
5	Fitoflueno	331, 348, 367	Hexano	90	335, 353,370
5	Fitoeno	276, 286, 297	Hexano	10	286,300

Refs.- (1) Machlin, 1984; (2) Merck Index, 1983; (3) Khachick y cols, 1992, 1995b; (4) Valores proporcionados por Dr. Tóth (Hungria); (5) Britton, 1995. (*) Máxima en región ultravioleta.

TABLA 20.- Valores utilizados para la corrección espectrofotométrica de carotenoides, retinoides y tocoferoles.

<u>Compuesto</u>	<u>Solvente</u>	<u>λ (nm)</u>	<u>$E_{1\text{cm}}^{1\%}$</u>	<u>Ref.</u>
Retinol	Etanol	325	1835	1
Acetato de retinol	Etanol	326	1550	1
Palmitato de retinol	Etanol	328	975	1
α -tocoferol	Etanol	292	72	2
γ -tocoferol	Etanol	297	91	2
Luteína	Etanol	445	2550	3
Zeaxantina	Etanol	450	2540	3
Cantaxantina	Eter petróleo	466	2200	3
β -apo-8'-carotenal	Eter petróleo	457	2640	3
β -criptoxantina	Eter petróleo	452	2386	3
Licopeno	Eter petróleo	472	3450	3
γ -caroteno	Hexano	462	3100	3
α -caroteno	Eter petróleo	444	2800	3
β -caroteno	Eter petróleo	453	2592	3
Fitoeno	Hexano	285	1250	3

Refs.- (1)Merck Index , 1983; (2) Machlin, 1984; (3) De Ritter y Purcell, 1981.

RESULTADOS

5.- RESULTADOS.

5.1.- Control de calidad de los datos. precisión y exactitud.

La variabilidad, reproducibilidad y precisión del método cromatográfico se muestran en las tablas 21-23. La precisión y exactitud del método para los compuestos con valores certificados en material de referencia (SRM 968b) (retinol, α -tocoferol, β -caroteno, luteína y palmitato de retinilo) (NIST) es calificada con valores de 1 y 2, lo que corresponde a las desviaciones estándar de los valores asignados por el NIST. La variabilidad intra-laboratorio frente a la mostrada inter-laboratorios (F_{avg}) en análisis de duplicados "ciegos" fue < 0.05 , lo que implica un control "excelente" a corto plazo (NIST, Report RR XXXVIII, 1996).

5.2.- Status sérico, cuali y cuantitativo, de carotenoides, retinol y tocoferol en una población de pacientes con DMID.

5.2.1.- Análisis cualitativo.

Utilizando la metodología descrita (sistema III), los pacientes diabéticos mostraron un perfil de carotenoides, retinol, palmitato de retinilo, α -, γ - y δ -tocoferol en suero, cualitativamente idéntico al observado en sujetos control.

Los carotenoides presentes (sistema III) en la mayoría de los sujetos, se muestran en la tabla 24 y en la figura 9. En general, un total de 25-30 picos, incluyendo formas "cis" y posibles metabolitos, fueron detectados en la mayoría de los sujetos, aunque algunos no pudieron ser identificados. Determinados compuestos sólo se detectaron en algunos sujetos tras concentrar la muestra (p.e cantaxantina, fitoeno, fitoflueno, δ -tocoferol y palmitato de retinilo). El perfil de carotenoides y su identificación en suero se confirmó utilizando otros sistemas cromatográficos: a) Stahl y cols,

1993b y b) elución en gradiente con columnas C₃₀. No obstante, debido a la ausencia de estándares para algunos carotenoides y a la falta de otros métodos de identificación (NMR, LC-MS), la presencia de algunos compuestos debe ser considerada como tentativa (p.e. ceto-carotenoides).

En las condiciones ensayadas, no se detectó la presencia de otros carotenoides presentes en la dieta como epoxi-carotenoides (ej. neoxantina, violaxantina, licopeno-1,2-epóxido), anhidroluteína III y formas éster de xantofilas. A excepción de β -apo-8'-carotenal, identificado de forma tentativa en algún sujeto, no se observó la presencia de otros β -apo-carotenales.

La presencia de retinol se atribuyó a la forma trans ya que la posible presencia de cantidades mínimas de formas cis no eran resueltas por ninguno de los sistemas ensayados. γ -tocoferol fue detectado en la mayoría de los sujetos, mientras que δ -tocoferol (297 nm) sólo se presentó en algunos individuos.

Artefactos e interferencias analíticas.

Esta valoración se llevó a cabo utilizando el método descrito por Stahl y cols, (1992) y el utilizado para el presente trabajo (Olmedilla y cols, 1994; Olmedilla y cols, 1997). Los resultados muestran un perfil de carotenoides (formas trans y cis) cuali y cuantitativamente iguales en ambos métodos, excluyendo la posibilidad de formación de artefactos debido al método utilizado. Sólo en el caso del β -caroteno se detectó la formación de un 2-3% de 13-cis- β -caroteno durante el análisis cromatográfico.

Se han observado posibles interferencias de β -criptoxantina a elevadas concentraciones sobre α -tocoferol al co-eluir en la bajada del pico de α -tocoferol, lo que ha podido contribuir a la sobreestimación de concentraciones bajas de α -tocoferol. Otras

posibles interferencias por co-elución de distintos compuestos fueron: 5,6-dihidroxi-5,6-dihidro-licopeno (metabolito descrito en plasma) no pudo ser detectado, posiblemente al co-eluir en la región de los ceto-carotenoides; 9-cis-luteína y all-trans-zeaxantina; 9-cis-zeaxantina tampoco se detectó al no ser resuelto de la forma trans; 13-cis-zeaxantina y cantaxantina, cis- α -caroteno y all-trans- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno y fitoflueno, y palmitato de retinilo con 13/15-cis- β -caroteno. No se observó interferencia entre fitoeno y ésteres de colesterol.

5.2.2.- Análisis cuantitativo

5.2.2.1.- Población diabética. Comparación con valores de referencia.

En la tabla 25 se muestran los valores de los percentiles 5, 25, 50, 75 y 95 para la población diabética y el grupo control (población de referencia).

Diferencias entre sexos.-

Se obtuvieron diferencias significativas entre sexos para retinol (mayor en hombres) y para α - y β -caroteno (mayor en mujeres), tanto en diabéticos como en controles. β -criptoxantina fue mayor en mujeres sólo en el grupo control, y luteína en mujeres diabéticas, mientras que la relación α -tocoferol/colesterol fue mayor en hombres control.

Diferencias entre diabéticos y controles.-

Los diabéticos, tanto mujeres como hombres, mostraron menores niveles de retinol y mayores de β -caroteno mientras que α -tocoferol, β -criptoxantina y licopeno fueron significativamente distintos sólo

en hombres. El análisis multivariante (tabla 26), incluyendo todos los compuestos y la edad, entre el grupo control y diabético, identificó retinol, β -caroteno y licopeno como las variables significativamente diferentes entre ambos grupos. Cuando el análisis se llevó a cabo ajustando por sexo, retinol y β -caroteno se asociaron a ambos sexos mientras que licopeno entró en la ecuación sólo en el caso de los hombres.

Correlaciones entre compuestos en suero.-

Independientemente del grupo y sexo, los mayores coeficientes de correlación se obtuvieron para luteína y zeaxantina, y α - y β -caroteno ($r=0.63-0.74$). Valores de r entre 0.01-0.1 se observaron para retinol y carotenoides provitamínicos, mientras que α -tocoferol y retinol mostraron coeficientes entre 0.31-0.52, excepto en mujeres diabéticas. α -tocoferol presentó correlaciones significativas con luteína y zeaxantina de 0.32-0.44 excepto para luteína en hombres diabéticos. Las mujeres diabéticas mostraron correlaciones altas entre β -criptoxantina y zeaxantina ($r=0.54$) y entre β -criptoxantina y β -caroteno ($r=0.59$). Por último, los hombres diabéticos presentaron correlación entre α -caroteno y licopeno ($r=0.58$).

5.2.2.2.- Estudio familiar.

En la tabla 27 se muestra la media (intervalo de confianza al 95%), mediana y centiles 10 y 90 de los compuestos estudiados.

Diferencias entre sexos.-

Diferencias entre sexos, para ambos grupos, se observaron para retinol y α -caroteno, mientras que para β -caroteno y β -criptoxantina sólo fueron significativas en controles. No se

obtuvieron diferencias entre sexos para α -tocoferol, γ -tocoferol, α -tocof./colesterol o carotenoides no-provitamínicos.

Diferencias entre controles familiares y no-familiares.-

El análisis univariante no emparejado entre ambos grupos mostró diferencias para la mayoría de los compuestos, excepto para licopeno en ambos sexos, retinol y zeaxantina en hombres y γ -tocoferol en mujeres. No obstante, cuando se aplicó el análisis multivariante, todas las diferencias desaparecieron excepto para α -caroteno.

Diferencias entre diabéticos y controles no-familiares.-

Hombres y mujeres diabéticos mostraron niveles menores de retinol que sus respectivos controles. Sin embargo, mientras que las mujeres mostraron diferencias en γ -tocoferol, los hombres diabéticos presentaron niveles menores de α -tocoferol y α -tocof./colesterol y mayores de β -criptoxantina.

Diferencias entre diabéticos y controles familiares.-

La comparación (datos no emparejados) entre diabéticos y sus familiares en primer grado mostró diferencias significativas en retinol (menores en diabéticos) y carotenoides provitamínicos (mayores en diabéticos). No se observaron diferencias para carotenoides no-provitamínicos, α -tocoferol, γ -tocoferol y α -tocof./colesterol, en hombres ni en mujeres.

EL análisis de regresión múltiple (hombres + mujeres) (tabla 28) entre diabéticos y sus familiares mostró al retinol, β -caroteno y β -criptoxantina como variables asociadas. Al ajustar por sexo, el modelo reveló que retinol y β -caroteno estaban asociadas



sexos mientras que β -criptoxantina sólo se asociaba en hombres (tabla 28). Al aplicar este modelo a los controles no-familiares (hombres + mujeres), sólo retinol (y el sexo) aparecieron en el modelo. Al ajustar por sexo, el retinol se asoció en ambos sexos mientras que los carotenoides provitamínicos mostraron diferencias sólo en hombres. Los pacientes diabéticos se compararon con sus familiares dentro de cada familia (análisis emparejado). Tras ajustar por sexo y edad, se observaron las mismas diferencias excepto para α -caroteno en hombres (no significativo) y α -tocoferol en mujeres ($p < 0.05$). El análisis de regresión logística (condicional emparejado) sólo mostró retinol y β -caroteno como variables asociadas a la diabetes en ambos sexos.

Duración de la enfermedad y presencia de retinopatía.-

Cuando los resultados se evaluaron en función del tiempo de evolución de la enfermedad (< 10 años, > 10 años), sólo α -tocoferol mostró diferencias ($p = 0.037$), aumentando con el curso de la enfermedad, mientras que licopeno mostró un ligero descenso ($p = 0.09$) en este grupo.

La presencia de retinopatía ($n = 14$) estaba asociada a personas de mayor edad (todos con > 10 años de evolución), aunque los niveles de retinol no mostraron diferencias significativas en función de la presencia de esta complicación.

5.2.2.3.- Estudio de seguimiento.

A la entrada del estudio el retinol mostró correlaciones positivas bajas, aunque significativas ($p < 0.05$), con la edad ($r = 0.44$), ferritina ($r = 0.37$), y creatinina ($r = 0.39$), mientras que fueron negativas con la dosis de insulina ($r = -0.40$) y HbA1c ($r = -0.35$). La relación α -tocoferol/colesterol no mostró correlación significativa con ninguno de los parámetros evaluados, excepto con los lípidos. Correlaciones establecidas a lo largo del estudio entre

retinol y los parámetros evaluados, mostraron valores significativos para edad ($r=0.36$), BMI ($r=0.13$), triglicéridos ($r=0.16$), HbA1c ($r=-0.16$), cinc ($r=0.26$), ferritina ($r=0.34$), urea ($r=0.26$), creatinina ($r=0.27$) y la relación α -toc./col. ($r=0.19$). Por su parte, la relación α -toc./col. se correlacionó con la edad ($r=0.17$), HDL ($r=0.14$) y γ -tocoferol ($r=0.17$).

El análisis de regresión múltiple a la entrada del estudio, incluyendo las variables correlacionadas, mostró la edad como único parámetro que entraba en la ecuación. Al excluir la edad, ninguna de las variables mostró asociación significativa con los niveles de retinol, hecho observado para el estudio global durante el tiempo de seguimiento.

El efecto del control de la glucemia en la diabetes se evaluó atendiendo a parámetros bioquímicos (HbA1c, fructosamina y glucemia) conforme a los objetivos establecidos como "razonables" por la American Diabetes Association (1996c) (glucemia <155 mg/dl, HbA1c $<7.2\%$). Dada la estacionalidad y variabilidad de la ingesta y niveles séricos de carotenoides, el efecto del control glucémico se evaluó sobre el retinol y la relación α -toc./col., utilizando todos los valores obtenidos a lo largo del estudio. Retinol y la relación α -toc./col. no mostraron diferencias significativas conforme al "control" de la diabetes según estos criterios. Tampoco se observó ningún efecto cuando se evaluó según niveles de retinol ± 30 μ g/dl.

Durante el seguimiento, 5 sujetos presentaron microalbuminuria intermitente (>20 μ g/min/día). En el rango normal (microalbuminuria <20 μ g/min/día), el retinol sérico no mostró correlación con el retinol. Asimismo, varios sujetos presentaron diversas infecciones durante el estudio (Candidiasis, vaginitis, etc) asociándose con niveles menores de retinol (intra-sujeto), aunque éstos no fueron significativos.

La evolución en el tiempo de los parámetros evaluados mostró una tendencia (no significativa) a mejorar los valores de HbA1c y fructosamina (figura 10), sugiriendo un mejor control de la glucemia a nivel de grupo. No se observó ninguna variación en los niveles de retinol sérico ni en la relación α -toc./col. (figura 10), ni relación de ambos compuestos con parámetros de control glucémico (figura 11). El análisis intra-sujeto (ANOVA de medidas repetidas) sólo mostró variaciones en el BMI (tendencia a aumentar, $p < 0.05$), fructosamina (tendencia a disminuir, $p < 0.05$) y HbA1c (tendencia a disminuir, $p < 0.06$), sin afectar al retinol sérico ni a la relación α -toc./col..

5.3.- Ingesta dietética y niveles séricos de carotenoides.

5.3.1.- Relación ingesta/suero.

En el grupo de diabéticos a lo largo del seguimiento durante 2,5 años, se recogieron un total de 236 cuestionarios de frecuencia y 176 registros de 3-días distribuidos a lo largo de todo el año. De estos, fueron excluidos del análisis estadístico aquellos que presentaron "inconsistencias" en su cumplimentación, no tenían registros de 3-días o CFS en alguna de las medidas y/o no se disponía de muestra de sangre para el análisis, quedando un total de 145 casos con las tres medidas. En el grupo control, tras aplicar estos criterios de exclusión, se analizaron 67 casos en invierno de los cuales 55 fueron válidos en medidas repetidas (reproducibilidad).

La tabla 29 muestra los cuartiles de ingesta (mediante el CFS) y los niveles séricos de carotenoides en ambos grupos, ajustado por estación del año (invierno). Se muestran los resultados de hombres y mujeres de forma conjunta dado el bajo número de sujetos para el análisis al ajustar por sexo. Aunque las diferentes ingestas de carotenoides se reflejan en los niveles séricos entre ambos grupos, estas diferencias sólo mostraron significación estadística para la ingesta de α -caroteno y los niveles séricos de luteína y zeaxantina.

5.3.2.- Validación del cuestionario de frecuencias semicuantitativo.

Los coeficientes de correlación, porcentaje de individuos clasificados correctamente en cuartiles extremos y asignados a cuartiles opuestos, en ambas poblaciones, se muestra en la tablas 30 y 31. Tomando los niveles séricos de carotenoides como "valor de referencia", se observaron correlaciones significativas para todos los carotenoides, aunque estas dependieron del método utilizado, grupo de población y la estación del año. En general, se observaron mayores correlaciones, frente a niveles séricos y entre métodos de evaluación de ingesta, en diabéticos que en controles y en mujeres en ambos grupos (datos no mostrados).

De forma global, el CFS mostró mayores correlaciones frente al "método de referencia" (niveles séricos) que los registros de 3-días, siendo la β -criptoxantina el carotenoide que mayor coincidencia mostró con los niveles séricos, independientemente del sexo, grupo y método de evaluación. En general, el mismo hecho se observó al asignar a los sujetos a cuartiles extremos y opuestos de ambas distribuciones (ingesta y suero), siendo clasificados correctamente un mayor número de diabéticos que de controles, especialmente en el cuartil inferior. El porcentaje de sujetos clasificados en cuartiles opuestos fue similar en ambos grupos en el caso de luteína, zeaxantina y α -caroteno, mientras que en el grupo de diabéticos menos sujetos se asignaron erróneamente en el caso de β -caroteno y más en el de licopeno.

5.3.3.- Reproducibilidad del método. Variaciones estacionales en la ingesta.

La reproducibilidad del método se evaluó en medidas repetidas de ingesta en el grupo control con un intervalo de 3 meses (invierno y primavera). Los niveles de carotenoides en suero no mostraron correlación en medidas repetidas para ninguno de los carotenoides, ni

tampoco entre las medidas de ingesta por ambos métodos, excepto para α -caroteno al utilizar el CFS (tabla 32).

Aunque la ingesta individual de carotenoides no mostró correlación entre ambas medidas, alrededor de 45-70% de los individuos fueron asignados a iguales cuartiles extremos en ambas ocasiones (tabla 33). El porcentaje menor correspondió a β -criptoxantina y el mayor a β -caroteno. El número de sujetos clasificados en cuartiles opuestos en medidas repetidas varió entre 0% (luteína y β -caroteno) y 7% (licopeno).

La ingesta de carotenoides en diferentes estaciones del año mostró variaciones estacionales en ambos grupos (tabla 34), siendo sólo significativas para β -criptoxantina (en ambos grupos) y α -caroteno (en diabéticos). En el grupo de diabéticos, se evaluó la incidencia de variaciones estacionales en los niveles séricos, observándose diferencias significativas sólo para licopeno y β -criptoxantina.

5.4.- Dieta "pobre" en carotenoides. Aclaramiento de carotenoides en suero.

La ingesta de carotenoides en ambos grupos, a partir de frutas y hortalizas durante la dieta "pobre" en carotenoides, se muestra en la tabla 35 y en la figura 12. El porcentaje de ingesta de carotenoides a partir de frutas y verduras fue < 5% en ambos grupos respecto al grupo control (Proyecto AIR, EU) y diabético respectivamente (ajustado por estación del año), excepto para zeaxantina. Los niveles séricos de carotenoides (expresados como porcentaje frente a concentraciones basales), tras seguir una dieta "pobre" en carotenoides, se muestran en la figura 13. Los porcentajes finales alcanzados y la "vida media" estimada para los distintos carotenoides se muestran en la tabla 36.

El porcentaje para β -caroteno se estimó a partir del día 7 del estudio, una vez que se recuperaron los niveles séricos previos a la administración de la cápsula. Para α -caroteno, se utilizó también el día 7 como basal incluso aunque la mayoría de los sujetos no recuperaron las concentraciones iniciales. Para los carotenoides evaluados, diabéticos y controles mostraron curvas de "aclaramiento" superpuestas, no observándose diferencias entre grupos en ningún punto a lo largo del tiempo ni en las AUC (negativas) calculadas frente a valores basales. En ambos grupos, y para todos los carotenoides evaluados, las curvas mostraron dos pendientes distintas reflejando dos ritmos de desaparición en suero; uno rápido al inicio de la dieta (días 0-7) y otro más lento (día 7 en adelante). En ninguno de los grupos, se observaron cambios en las concentraciones séricas de retinol tras la dieta "pobre" en carotenoides.

5.5.- Biodisponibilidad de α - + β -caroteno y luteína.

5.5.1.- Respuesta en "TRL".

De los sujetos que realizaron el estudio, sólo un control no mostró respuesta en TRL tras administración de α -+ β -caroteno, aunque no se le excluyó del análisis final al responder a la administración de luteína. En el estudio con α -+ β -caroteno, dos sujetos (un control y un diabético) fueron excluidos del análisis estadístico final al presentar hiperlipemia en ayunas mientras que en el estudio con luteína, un sujeto diabético fue excluido por la misma causa.

Tras la **administración de α -+ β -caroteno**, se observó un retraso en la aparición de carotenoides y ésteres de retinilo en TRL en ambos grupos que, junto con el hecho de que la mayoría de los sujetos de ambos grupos mostraran el mayor incremento en TRL tras la ingestión de la comida (a las 6 horas), determinó que no

se recuperaran los niveles basales, especialmente en el grupo de diabéticos (figuras 14-16). Ambos grupos mostraron una gran disparidad en las respuestas en TRL, la cual se correlacionó con los niveles de triglicéridos basales en los diabéticos, en ambos estudios ($r > 0.8$, $p < 0.01$).

En ninguno de los sujetos (diabéticos y controles), a ninguno de los intervalos de tiempo de recolección de muestras, se observó la presencia de β -apo-carotenales, indicativos de rotura excéntrica de α -/ β -caroteno, ni aumento de 9-cis- β -caroteno (suministrado en cápsulas).

La respuesta en TRL (AUC 0-8 horas) a α -caroteno y β -caroteno fue similar entre grupos, obteniéndose incrementos relativos para β -caroteno y α -caroteno parecidos a su concentración en la cápsula, aunque los diabéticos "reflejaron" mejor la composición de la cápsula mientras que los controles mostraron una absorción relativa mayor para β -caroteno. Los diabéticos mostraron AUC de ésteres de retinilo (palmitato y totales), α -caroteno y β -caroteno mayores que los controles aunque no se observaron diferencias significativas para las respectivas AUC entre grupos, independientemente de la inclusión o no de los sujetos con hiperlipemia en ayunas y/o del control que no mostró respuesta con α -+ β -caroteno (tabla 37). El palmitato de retinilo fue la forma éster predominante en ambos grupos, contribuyendo alrededor del 65% al total de ésteres cuantificados (periodo 0-8 horas) (figura 16).

Las curvas de concentración en TRL frente al tiempo mostraron perfiles distintos en ambos grupos con un aumento continuo en el grupo de diabéticos (figura 14-16). Las concentraciones máximas fueron alcanzadas de forma simultánea en ambos grupos (excepto para α -caroteno) y fueron mayores en controles que en diabéticos (excepto para α -caroteno).

El porcentaje de absorción de la dosis total (α -+ β -caroteno) se estimó asumiendo una bioequivalencia en la capacidad de conversión a retinol igual para ambos carotenoides, un factor de conversión de 1:1 para β -caroteno y un volumen plasmático de 3.5 L para todos los sujetos. Este porcentaje de absorción fue similar para ambos grupos (6,7% en controles, 9% excluyendo el sujeto sin respuesta, y 8,4% en diabéticos). De ésta proporción, aproximadamente un 58% en controles (49-72%) y un 62% en diabéticos (51-74%) se convirtió a retinol. La absorción de α -caroteno intacto (sin transformar) fue del 1,6% y 2,6% para controles y diabéticos, respectivamente. Para β -caroteno (calculado frente al β -caroteno total, 8,2 mg), el porcentaje de absorción (sin transformar) fue, aproximadamente, del 3% en ambos grupos.

La actividad relativa de conversión a retinol se estimó mediante la relación AUC de ésteres de retinol totales / AUC de α -+ β -caroteno, considerándose una relación alta como indicativo de una conversión eficiente (Van Vliet y cols, 1995). Se obtuvieron valores similares en ambos grupos (1,53 en controles, 1,77 en diabéticos). Aunque el porcentaje de absorción total de la dosis mostró relación con parámetros de control glucémico (mayor AUC a mayores valores de HbA1c y fructosamina), la eficacia de conversión no se relacionó con el control de la diabetes.

La **administración de luteína** (en forma de ésteres) provocó un aumento de trans-luteína y de la relación luteína/cetocarotenoides, durante las 8 h posteriores a la administración de la cápsula. No se detectaron formas éster y no se observaron cambios significativos en los niveles de anhidroluteína en ninguno de los grupos. La concentración máxima y AUC para luteína fueron mayores en controles que en diabéticos aunque ambos grupos se comportaron igual frente al tiempo (figura 17). Comparativamente, a lo largo del periodo evaluado (0-8 horas), se obtuvieron AUC para luteína menores que para β -

caroteno (en ambos grupos), aunque la cantidad de luteína suministrada fue mayor que la β -caroteno. Asumiendo un volumen plasmático de 3.5 L, el porcentaje de absorción de la dosis durante el periodo de 8 horas fue <1,5% en ambos grupos. Aunque el AUC para luteína se correlacionó con los niveles de triglicéridos basales ($r>0.9, p<0.01$), no se relacionó con el control de la diabetes. En ninguno de los grupos, la respuesta en el primer estudio (α - $+$ β -caroteno) tuvo valor predictivo sobre la respuesta en el segundo (luteína).

5.5.2.- Respuesta en plasma.

Las concentraciones (AUC) de carotenoides, palmitato de retinol y triglicéridos frente al tiempo mostraron una gran variabilidad entre los sujetos en ambos grupos (tabla 38). En el periodo de 0-8 horas tras administrar la cápsula, los sujetos diabéticos mostraron valores de AUC mayores para α -caroteno y palmitato de retinilo, algo menores para β -caroteno e iguales para luteína, aunque en ningún caso las diferencias alcanzaron significación estadística (figuras 18-21). En este periodo, los diabéticos mostraron concentraciones máximas mayores de α -caroteno y luteína, y menores de β -caroteno y palmitato de retinilo.

La respuesta de triglicéridos en plasma fue mucho menor en diabéticos que en controles ($p<0.05$) durante el estudio con α - $+$ β -caroteno, mientras que fue similar en el caso de la luteína. Asimismo, las respuestas de triglicéridos intra-sujeto en ambos estudios fueron similares en los controles, mientras que en el grupo de diabéticos, tres tuvieron AUCs negativas durante el estudio con α - $+$ β -caroteno y los seis mostraron AUCs positivas en el estudio de luteína. La mayoría de los sujetos, en ambos grupos, mostraron una mayor respuesta de triglicéridos en el segundo estudio (luteína) que en el primero (α - $+$ β -caroteno). Así, al relacionar las AUCs (periodo

0-8 horas) para cada uno de los compuestos y el AUC de triglicéridos en cada caso, los diabéticos mostraron valores muy superiores para α -caroteno, β -caroteno y palmitato de retinol, y fueron similares para la luteína.

La relación AUC α -caroteno / AUC β -caroteno en plasma así como de las concentraciones máximas alcanzadas fue mayor en diabéticos que en controles. Durante el estudio con α - β -caroteno, en ningún grupo se observaron cambios en los niveles séricos de retinol más allá de los atribuibles a las variaciones del método.

Durante el periodo 0-6 días después de la suplementación con dosis única, las concentraciones máximas en suero se alcanzaron a la vez en ambos grupos para luteína, β -caroteno (24 horas) y α -caroteno (48 horas) (figuras 22-24). Tras ajustar por concentraciones iniciales, los diabéticos mostraron incrementos mayores de α -caroteno, menores de β -caroteno e iguales de luteína.

El perfil en plasma/suero a lo largo del tiempo mostró una subida continua para luteína hasta alcanzar los máximos (24 horas) en ambos grupos, mientras que para α -caroteno y β -caroteno se observaron bajadas en plasma, especialmente en controles, y posterior subida hasta las 24-48 horas. A los seis días tras la administración de la cápsula, los niveles de β -caroteno retornaron a valores basales mientras que los de α -caroteno y luteína permanecieron por encima de los basales, aunque sin mostrar significación estadística.

TABLA 21.- Control de calidad de los análisis. Precisión (reproducibilidad entre años) y exactitud frente a Material de Referencia Certificado (*).

<u>Compuesto</u>	<u>µg/dl</u>	<u>C.V (%)</u>	<u>% Desviac. frente SRM</u>
Retinol	34.0	8	+15
"	51.6	4	+0.4
"	84.5	4	-5
α-tocoferol	860	6	+20
"	1019	8	+1
"	1786	9	+0.3
β-caroteno (total)	24.9	17	-2
"	66.6	9	+6
Luteína	5.6	19	-9
Palmitato de retinol	8.7	4	-12
Licopeno (total) (#)	35.3	2	--
(trans) (#)	17.3	10	--
α-caroteno (#)	3.9	6	--
β-criptoxantina (#)	5.8	6	--
"	18.0	7	--
Zeaxantina (#)	5.7	40	--
γ-tocoferol (#)	233	4	--
"	381	6	--

(*)Material de Referencia SRM 968b (NIST, EEUU).

(#) Valores no certificados en el SRM 968b.

TABLA 22.- Variabilidad (CV) "en el día" y a largo plazo (1 año) del método analítico (sistema III) (*).

<u>Compuesto</u>	<u>"en el día"</u>			<u>Reproducibilidad (1 año)</u>		
	<u>Media (n=2)</u>	<u>DT</u>	<u>CV (%)</u>	<u>Media (n=2)</u>	<u>DT</u>	<u>CV (%)</u>
Retinol	55	0	0	52	4.6	8.8
Palm. retinol	10.5	0.7	6.7	9	2.0	29
α-tocoferol	772	2	0.4	758	23	3
γ-tocoferol	161	2.1	1.3	169	15	8.8
δ-tocoferol	17	1.4	8.3	18	2.5	14
β-caroteno	15	0	0	15.3	0.5	3.7
β-caroteno (trans)	14.5	0.7	4.9	14.7	0.5	3.9
α-caroteno	2.1	0.9	45	2.0	0.6	32
Licopeno	64.5	0.7	1	59.3	8	15
Licopeno (trans)	31.5	2	6.7	29.3	4	13.8
β-criptoxantina	4.8	0.4	10	4.5	0.5	12.4
α-criptoxantina	1.4	0.3	26	1.2	0.3	26
Luteína	11	0	0	10.7	0.6	5.4
Zeaxantina	3	0.1	4.7	3.6	1.1	31.6
Lut.+ Zeax.	13.5	0.7	5.2	14	1	7.1

(*) Resultados de muestras "ciegas" por duplicado "en el día" (Round Robin 38) distribuidas por el NIST. Para evaluar la reproducibilidad -"entre días"- el mismo suero fue analizado meses después (Round Robin 39). Concentraciones expresadas en µg/dl de suero.

TABLA 23.- Esquema temporal de análisis de muestras y reproducibilidad entre años (CV %) del método analítico para muestras "ciegas" distribuidas en distintos años (*).

Distribución temporal del estudio							
1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	
←		Población de referencia / Población diabética				→	
←		Estudio Familiar		→			
		←		Estudio de Seguimiento		→	
						←Biodisponibilidad→	
Reproducibilidad (media (DS), CV% (*))							
	<u>1992/1996</u>	<u>1993/1696</u>	<u>1994/1995</u>	<u>1997</u>			
Retinol	71 (4), 6%	60 (2), 5%	87 (16), 17%	27.4 (-), -6%			
α-tocoferol	690 (38), 6%	630 (28), 5%	2006 (87), 4%	688 (-), -3%			
γ-tocoferol	214 (40), 19%	290 (49), 17%	363 (4), 1%	179 (-), 5%			
β-caroteno (total)	62 (0.3), 0.5%	44 (3), 6%	108 (12), 11%	24,3 (-), 1%			
" (trans)	61 (2), 3.5%	--	96 (9), 10%	21,7 (-), -2%			

(*). Fat-Soluble Assurance Programme (NIST). Concentraciones expresadas en µg/dl de suero.

TABLA 24.- Identificación de carotenoides en suero. Absorción máxima según su orden de elución en sistema III (*).

Nº	Compuesto	λ máxima (nm)	%III/II	λ "cis"/ λ máx
1	ϵ,ϵ -caroten-3,3'-diona	418, 442, 471	-	-
2	3'-OH- ϵ,ϵ -caroten-3-ona	418, 442, 471	-	-
3	3-OH- β,ϵ -caroten-3'-ona	423, 447, 472	-	-
4	(all-E)-Luteína	423, 447, 476	57	0.06
5	(all-E)-Zeaxantina	454, 481	25	0.09
6	(13-Z)-luteína	(333), 442, 469	-	0.43
7	(13-Z) zeaxantina ?	(343), 447	-	0.47
8	No identificado	447, 471	101	-
9	No identificado	(352), 430, 457, 493	88	-
10	(all-E)-Anhidroluteína I	447, 476	61	-
11	(all-E)-Anhidroluteína II	447, 476	16	-
12	No identificado	445, 473	132	-
13	No identificado	428, 449, 476	28	-
14	(all-E)- α -criptoxantina	423, 449, 478	65	0.06
15	(all-E)- β -criptoxantina	428, 457, 481	20	0.09
16	(all-E)-licopeno	450, 476, 507	66	0.08
17	(9-Z)- ó (5-Z)-licopeno	(367), 450, 476, 507	65	0.09
18	(13-Z)-licopeno	(363), 449, 471, 503	44	0.41
19	(15-Z)-licopeno	(363), 442, 469, 500	6	0.57
20	Neurosporeno	418, 445, 469	103	-
21	γ -caroteno	440, 467, 496	36	0.05
22	ξ -caroteno a)	382, 404, 428	93	-
	b)	382, 404, 428	75	-
	c)	382, 404, 430	61	-
23	(all-E)- α -caroteno	420, 449, 478	70	0.04
24	(all-E)- β -caroteno	425-430, 457, 483	-	0.09
25	Fitoflueno	335, 352, 370	108	-
26	13-cis- β -caroteno	(340), 422, 449, 476	-	0.62
27	Fitoeno	288, 300	-	-

(*) Máximos mostrados durante análisis cromatográfico (sistema III). (all-E) refiere forma "all-trans"; (-Z) isómero "cis" en la posición especificada. Valores entre paréntesis indican absorción máxima en región ultravioleta.

TABLA 25.- Valores de referencia ($\mu\text{g}/\text{dl}$) para retinol, α -tocoferol y carotenoides en suero de sujetos control y diabéticos insulino-dependientes.

	CONTROL									
	HOMBRES					MUJERES				
	<u>5%</u>	<u>25%</u>	<u>50%</u>	<u>75%</u>	<u>95%</u>	<u>5%</u>	<u>25%</u>	<u>50%</u>	<u>75%</u>	<u>95%</u>
Retinol	32.4	44.7	53.3	61.0	75.3	28.9	37.8	44.1	53.3	69.9
α -tocofof.	790	990	1230	1480	1980	760	1010	1200	1440	1780
α -toc./col.	3.85	5.01	5.62	6.36	7.56	4.06	4.83	5.46	6.03	7.13
β -caroteno	3.60	6.98	11.59	16.1	29.6	4.67	9.66	14.9	23.6	43.9
α -caroteno	0.86	2.68	2.52	3.76	7.84	0.97	2.15	3.44	5.37	12.1
β -criptox.	3.70	9.95	15.2	26.0	55.6	5.31	11.6	21.7	35.9	79.8
Luteina	4.43	7.40	10.6	14.8	24.9	4.43	7.96	10.5	15.3	25.1
Zeaxantina	1.14	2.27	3.47	4.55	7.50	0.60	2.27	3.13	5.11	8.30
Licopeno	6.01	12.3	18.8	26.3	47.1	5.74	12.3	19.3	30.1	49.5
	DIABETICOS									
	HOMBRES					MUJERES				
	<u>5%</u>	<u>25%</u>	<u>50%</u>	<u>75%</u>	<u>95%</u>	<u>5%</u>	<u>25%</u>	<u>50%</u>	<u>75%</u>	<u>95%</u>
Retinol	23.5	34.9	41.8	49.0	63.3	24.3	29.5	36.7	42.7	53.0
α -tocoferol	570	870	1015	1340	1746	790	1000	1134	1440	1810
α -toc./col	4.13	4.63	5.17	6.36	8.84	3.60	4.40	5.34	6.20	7.32
β -caroteno	2.42	9.66	14.8	24.2	34.4	6.66	12.9	19.3	29.5	53.0
α -caroteno	0.43	1.61	2.95	4.83	8.21	0.75	2.68	3.49	6.44	14.6
β -criptox.	3.26	11.1	18.9	33.7	86.7	6.52	11.6	24.2	55.3	84.0
Luteina	3.07	7.4	10.2	14.2	17.8	4.60	8.53	11.0	15.9	26.8
Zeaxantina	0.80	2.27	3.07	4.55	6.99	1.25	2.27	3.35	4.55	6.93
Licopeno	4.13	14.0	22.5	31.7	75.3	7.90	12.9	22.7	31.1	49.9

TABLA 26.- Análisis de regresión logística condicional entre sujetos control y diabéticos insulino-dependientes.

	HOMBRES			MUJERES		
	β -Coef.	SE	Sig.	β -Coef.	SE	Sig.
Retinol	-0.076	0.01	<0.0001	-0.085	0.01	<0.0001
β -caroteno	0.033	0.02	0.066	0.024	0.01	0.012
Licopeno	0.021	0.010	0.046			

TABLA 27.- Niveles de retinol, α -tocoferol v carotenoides ($\mu\text{g/dl}$) en diabéticos (DMID),

familiares no diabéticos (F) y controles no familiares (NF).

	HOMBRES				MUJERES			
	Media (95% IC)	Mediana	10%	90%	Media (95% IC)	Mediana	10%	90%
RETINOL								
DMID	43.5 (38.4-48.4)	40.1 *†‡	32.1	63.3	36.0 (33.2-39.0)	36.4 †‡	26.6	43.3
NF-control	54.7 (52.7-57.0)	55.0 *	39.2	69.6	48.1 (45.8-50.1)	46.7	34.9	62.7
F-control	51.8 (48.1-54.4)	50.7 *	32.7	72.2	43.0 (40.4-45.0)	40.7 §	29.5	59.9
α-TOCOF.								
DMID	1163 (1025-1296)	1098 †	810	1559	1240 (1120-1365)	1249	848	1589
NF-control	1339 (1279-1413)	1270	952	1761	1326 (1266-1374)	1292	982	1701
F-control	1180 (1107-1249)	1111 §	801	1675	1128 (1068-1187)	1072 §	762	1718
γ-TOCOF.								
DMID	55 (43-68)	53	21	87	56 (46-65)	50 †	31	85
NF-control	43 (37-49)	36	23	74	33 (26-40)	33	17	54
F-control	53 (47-58)	49	23	89	54 (47-60)	49 §	24	82
LUTEINA								
DMID	10.8 (9.1-12.5)	9.7	6.3	15.3	12.5 (9.7-15.3)	11.4	5.7	21.6
NF-control	13.6 (11.9-14.8)	11.4	5.7	22.7	13.6 (12.5-15.3)	12.5	6.8	21.6
F-control	10.2 (9.1-11.4)	9.1 §	5.1	17.0	11.4 (9.7-13.1)	9.1 §	5.7	18.8
ZEAXANTIN								
DMID	3.4 (2.8-4.0)	3.4	2.3	5.1	3.4 (2.8-4.6)	4.0	1.1	6.3
NF-control	4.0 (3.4-4.5)	3.4	1.1	6.8	4.0 (3.4-4.5)	3.4	1.7	8.0
F-control	3.4 (3.4-4.0)	3.4 *	1.7	5.7	3.4 (2.8-3.4)	2.8 §	1.1	5.7
LICOPENO								
DMID	22.5 (18.3-26.8)	23.6	8.9	38.1	21.5 (17.2-26.3)	20.9	10.7	38.7
NF-control	22.0 (19.9-25.2)	18.8	7.5	37.6	24.1 (22.0-27.4)	22.0	7.0	45.1
F-control	20.4 (17.2-22.5)	18.8	7.5	40.8	20.9 (17.7-22.0)	18.3	7.5	40.8

β -CRIPTOX.								
DMID	30.4 (22.7-38.7)	26.0 † ‡	9.9	54.2	31.0 (23.2-38.7)	27.6 ‡	11.1	59.7
NF-control	21.6 (18.8-24.3)	17.7 *	6.1	39.8	33.2 (25.4-37.6)	24.9	10.0	63.0
F-control	18.8 (14.4-21.6)	13.3 * §	5.5	36.5	26.0 (21.6-31.0)	17.1 §	5.5	61.9
α -CAROT.								
DMID	3.2 (2.7-3.8)	3.2 * ‡	1.6	5.4	4.8 (3.8-6.4)	4.3 ‡	2.7	9.7
NF-control	4.4 (3.2-4.8)	3.2 *	1.1	7.5	4.8 (4.3-5.4)	3.8	1.6	9.7
F-control	2.7 (2.2-2.7)	2.2 * §	1.1	4.3	3.8 (3.2-4.3)	2.7 §	1.1	6.4
β -CAROTENO								
DMID	16.6 (13.4-19.9)	15.6 ‡	7.5	28.4	23.6 (18.3-29.5)	22.0 ‡	7.0	50.5
NF-control	14.5 (12.9-16.6)	12.9 *	4.8	26.3	20.4 (17.7-22.5)	16.6	7.5	41.3
F-control	11.8 (10.2-13.4)	10.2 * §	4.3	21.5	17.2 (15.0-19.9)	12.9 §	4.8	32.7

Mann-Whitney U test: $p < 0.05$. *Diferencia significativa entre sexos dentro del grupo. † Diferencia significativa frente grupo no-familiar, ajustado por sexo. ‡ Diferencia significativa frente a grupo familiar, ajustado por sexo. § Diferencia significativa frente al grupo no familiar, ajustado por sexo.

TABLA 28.- Análisis multivariante entre grupos (estudio familiar).

Análisis de regresión logística condicional emparejada (Datos emparejados).

	<u>Familiares vs DMID</u>					
	<u>Hombres</u>			<u>Mujeres</u>		
	<u>β-Coef.</u>	<u>SE</u>	<u>Sig.</u>	<u>β-Coef.</u>	<u>SE</u>	<u>Sig</u>
Retinol	-0.067	.028	.018	-0.127	.048	.009
β -Carot.	0.186	.070	.008	0.079	.039	.042

Análisis de regresión múltiple (paso a paso)

(Datos no emparejados)

	<u>Familiares vs DMID</u>					
	<u>Hombres</u>			<u>Mujeres</u>		
	<u>β- Coef.</u>	<u>SE</u>	<u>Sig.</u>	<u>β- Coef.</u>	<u>SE</u>	<u>Sig</u>
Retinol	-0.048	.019	.012	-0.073	.026	.005
β -Caroteno	0.064	.033	.054	0.037	.016	.020
β -Criptox.	0.029	.013	.021	-	-	NS

No-familiares vs DMID

	<u>No-familiares vs DMID</u>					
	<u>Hombres</u>			<u>Mujeres</u>		
	<u>β- Coef.</u>	<u>SE</u>	<u>Sig.</u>	<u>β- Coef.</u>	<u>SE</u>	<u>Sig</u>
Retinol	-0.106	.028	.000	-0.175	.039	.000
β -Caroteno	0.097	.045	.032	-	-	NS
β -Criptox.	0.043	.016	.007	-	-	NS
α -caroteno	-0.545	.204	.008	-	-	NS

TABLA 29.- Ingesta de carotenoides ($\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$) obtenida mediante CFS (invierno) y niveles séricos en sujetos control (n=67) y diabéticos (n=44).

	<u>INGESTA</u>						P
	<u>Control</u>			<u>DMID</u>			
	Q25	Q50	Q75	Q25	Q50	Q75	
Luteína	721	1343	2100	584	1370	2048	NS
Zeaxantina	87	148	205	68	93	181	NS
Licopeno	765	2216	3291	1275	1785	3236	NS
β -criptoxantina	359	700	1077	431	779	1186	NS
α -caroteno	207	416	666	64	223	424	<0.03
β -caroteno	1409	2112	3326	967	1668	2657	NS

	<u>NIVELES SERICOS</u>				P
	<u>CONTROL</u>		<u>DMID</u>		
	Media \pm SD	Mediana	Media \pm SD	Mediana	
Luteína	15,9 \pm 8,7	15,5	11,5 \pm 5,4	10,9	<0.001
Zeaxantina	4,9 \pm 2,5	4,7	3,6 \pm 1,7	3,5	<0.001
Licopeno	29,0 \pm 16,7	32,1	21,5 \pm 14,5	25,0	NS
β -criptoxantina	22,3 \pm 17,3	22,8	27,7 \pm 23,8	26,8	NS
α -caroteno	3,7 \pm 2,6	3,7	2,6 \pm 3,8	3,2	NS
β -caroteno	19,8 \pm 12,4	18,7	15,8 \pm 13,0	16,4	NS

TABLA 30.- Correlación entre ingesta de carotenoides y niveles séricos en sujetos control y DMID(*)

	<u>CFS/Suero</u>		<u>3-dias/Suero</u>		<u>CFS/3-dias</u>	
	Control	DMID	Control	DMID	Control	DMID
Luteina	0.12 (-0.02)	0.39***	0.14 (-0.22)	0.18*	0.05 (0.11)	0.43***
Zeaxantina	-0.11 (-0.14)	0.31**	0.13 (0.05)	0.10	0.22 (0.15)	0.37***
β -criptox.	0.59** (0.49***)	0.70***	0.55*** (0.37**)	0.60***	0.62*** 0.70***	0.59***
Licopeno	0.29* (0.22)	0.20*	0.37** (0.25)	0.20*	0.28* 0.22	0.22*
α -caroteno	0.26* (0.42**)	0.51***	0.02 (-0.12)	0.21*	0.19 (0.01)	0.23*
β -caroteno	0.00 (0.29*)	0.48***	-0.05 (0.18)	0.15	0.05 (0.03)	0.28***

(*) Coeficiente de correlación de Spearman; Grupo control evaluado en invierno (n=67) y, entre paréntesis, evaluado en primavera (n=50); Grupo DMID evaluado a lo largo de todo el año (n=135); *<0.05; ** \leq 0.01; *** \leq 0.001.

TABLA 31.- Porcentaje de sujetos asignados al mismo/opuesto cuartil de las distribuciones (niveles séricos como referencia) mediante CFS en el grupo control y DMID (*).

	<u>Q-1 (%)</u>		<u>Q-4 (%)</u>		<u>Cuartiles opuestos (%)</u>	
	Control	DMID	Control	DMID	Control	DMID
Luteina	18	46	47	47	13	10
Zeaxantina	29	40	18	40	16	14
β -criptoxantina	53	58	59	67	3	1
Licopeno	29	54	47	31	6	15
α -caroteno	47	47	47	51	7	4
β -caroteno	12	57	41	44	13	3

(*) Grupo control (n=67); Grupo DMID (n=143).

TABLA 32.- Reproducibilidad entre ingesta y niveles séricos de sujetos control (n=55) en medidas repetidas (*).

	<u>CFS-1/CFS-2</u>	<u>3-días-1/3-días-2</u>	<u>Suero-1/Suero-2</u>
Luteína	-0.07	0.02	-0.22
Zeaxantina	-0.03	-0.03	0.03
β -criptoxantina	0.16	-0.02	0.07
Licopeno	-0.02	0.26	0.32
α -caroteno	0.41 **	-0.13	-0.16
β -caroteno	0.20	0.00	0.10

(*) Coeficiente de correlación de Spearman; **<0.01 ; Invierno (1), primavera (2).

TABLA 33.- Porcentaje de sujetos (n=55) asignados a cuartiles extremos de ingesta en medidas repetidas utilizando CFS.

	<u>Q-1 (%)</u>	<u>Q-4 (%)</u>	<u>Cuartiles opuestos</u>
Luteína	67	57	0
Zeaxantina	58	47	5
β -criptoxantina	29	60	4
Licopeno	43	64	7
α -caroteno	62	64	2
β -caroteno	75	64	0

TABLA 34.- Variaciones estacionales en la ingesta ($\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$) y niveles séricos ($\mu\text{g}/\text{dl}$) de carotenoides en sujetos con DMID y controles ().

	INGESTA (mediana)				SUERO (DMID, mediana)			
	<u>Primav.</u>	<u>Verano</u>	<u>Otoño</u>	<u>Invierno</u>	<u>Primav.</u>	<u>Verano</u>	<u>Otoño</u>	<u>Invierno</u>
Luteína	883 (1587)	724	873	1370 (1343)	11,3	10,8	11,1	10,9
Zeaxant.	106* (149)	62	82	93 (148)	4,4	3,0	3,0	3,5
licopeno	1785 (2981)	2073	1785	1785 (2216)	27,3	39,0††	27,0	25,0
β -cript.	450 (288)	152	428‡	779‡ (700)‡	17,2	16,4	13,6	26,8†
α -carot.	215 (439)	217	285‡	223 (416)	3,1	3,1	3,5	3,2
β -carot.	1251 (2652)	1235	1687	1667 (2112)	20,3	17,2	16,0	16,4

Población diabética: Primavera (n=38); Verano (n=22); Otoño (n=45); Invierno (n=44); * Diferente de invierno; † Diferente de primavera, verano y otoño; ‡ Diferente de verano; § Diferente de verano; † Diferente de primavera, verano y otoño; †† Diferente de otoño e invierno.

TABLA 35.- Ingesta de carotenoides (mediana; $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$) durante la "dieta pobre" en carotenoides (*).

	<u>DMID (n=10)</u>	<u>Controles (n=8)</u>
Luteína	72 (5%)	51 (4%)
Zeaxantina	18 (19%)	16 (11%)
β -criptoxantina	12 (2%)	5 (2%)
Licopeno	0 (0%)	0 (0%)
α -caroteno	0.2 (0%)	0.7 (0%)
β -caroteno	33 (2%)	18 (2%)

(*) § frente a grupo diabético y control (), respectivamente, ajustado por estación del año (invierno) (Tabla 29).

TABLA 36.- Carotenoides en suero (%) tras una dieta "pobre" en carotenoides (#).

	<u>Días de dieta</u>		<u>% final alcanzado(*)</u>		<u>p</u>	<u>Vida media (**)</u> (días)	
	<u>Control</u>	<u>DMID</u>	<u>Control</u>	<u>DMID</u>		<u>Control</u>	<u>DMID</u>
	Luteína	15	15	62		65	NS
Zeaxantina	15	15	66	58	NS	>21	>21
β-criptox.	21	21	44	46	NS	17-18	17-18
Licopeno	21	21	35	33	NS	10	10
(total)							
α-caroteno	11	11	59	55	NS	12-13	12-13
β-caroteno	11	11	52	57	NS	12-14	12-14
(total)							

(#) Control (n=8), DMID (n=10). (*) Porcentaje frente a concentración a la entrada del estudio. (**) Tomado como 50% de concentraciones basales. Estimada a partir de ajuste exponencial o curvas de regresión logarítmica.

TABLA 37.- Concentración frente al tiempo en "TRL" (*).

	<u>CONTROL</u>		<u>DMID</u>		<u>p</u>
	<u>AUC</u> (µg/dl h)	<u>Cmáx. (t)</u> (µg/dl)	<u>AUC</u> (µg/dl h)	<u>Cmáx. (t)</u>	
α-caroteno	0.21 ± 0.19 (0.009-0.41)	0.73 (7h)	0.34 ± 0.38 (0.05-1.02)	0.92 (8h)	NS
β-caroteno	0.85 ± 0.80 (-0.21-1.68)	2.45 (7h)	0.92 ± 0.83 (0.20-2.34)	1.95 (7h)	NS
Palm. Retinol	1.22 ± 1.08 (0.0-2.52)	4.41 (7h)	1.55 ± 2.0 (0.32-5.55)	3.40 (7h)	NS
Total esterres retinol	1.72 ± 1.69 (0.0-3.96)	6.59 (7h)	2.31 ± 2.99 (0.49-8.29)	5.25 (7h)	NS
Luteína	0.49 ± 0.20 (0.30-0.82)	1.27 (8h)	0.34 ± 0.22 (0.08-0.69)	0.93 (8h)	NS

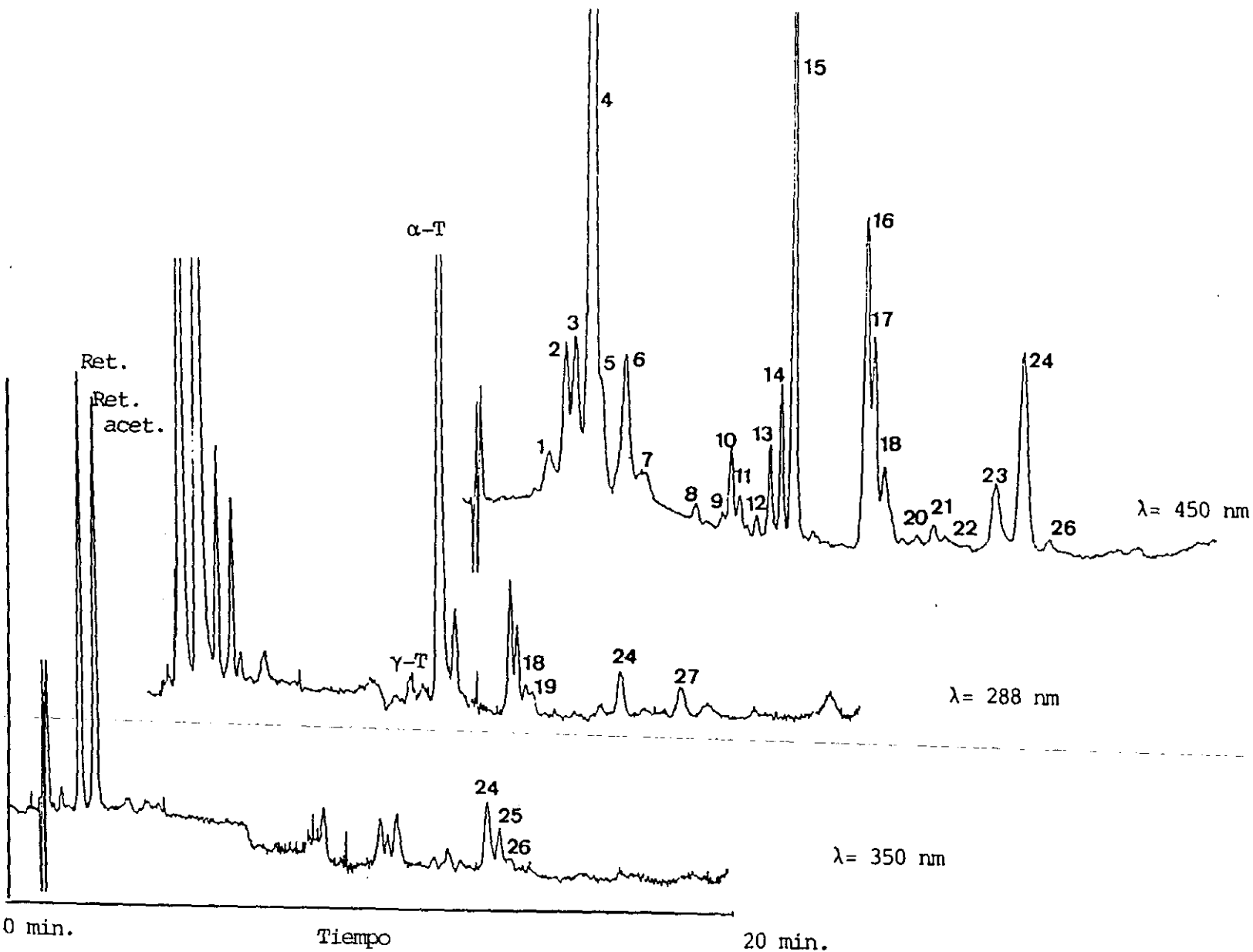
(*) Sujetos con hiperlipemia excluidos (Control (n=4 con α-+β-caroteno, n=5 con luteína), DMID (n=6 en ambos estudios)).

TABLA 38.- Biodisponibilidad de carotenoides en plasma/suero.

	<u>CONTROL</u>				<u>DMID</u>			
	<u>α-car.</u>	<u>β-car.</u>	<u>Palm.ret</u>	<u>Luteína</u>	<u>α-car.</u>	<u>β-car.</u>	<u>Palm.ret</u>	<u>Luteína</u>
Niveles basales (1)	0.62	8.77	1.72	5.60	2.11	14.0	0.72	9.76
AUC (*) Triglicer.		36		20		5		23
AUC (**) 0-8 horas	0.36 \pm 0.34	0.76 \pm 1.22	0.69 \pm 1.93	1.18 \pm 0.78	0.57 \pm 0.50	0.67 \pm 1.36	2.91 \pm 2.7	1.21 \pm 0.82
Cmáx. (0-8 horas)	1.58 (8h)	3.68 (7h)	6.17 (7h)	3.39 (9h)	1.75 (8h)	2.93 (8h)	5.47 (7h)	5.21 (9h)
Cmáx. (#) suero	2.79 (48 h)	6.80 (24 h)	-	8.74 (24 h)	3.34 (48 h)	4.96 (24 h)	-	9.00 (24 h)
AUC/AUC (trigl.) (0-8 h) (##)	10	21	19	59	114	134	582	52

Sujetos con hiperlipemia excluidos (Control (n=4 con α -+ β -caroteno, n=5 con luteína), DMID (n=6 en ambos estudios. (1) Concentración (μ g/dl) en ayunas, antes de la ingestión de la cápsula ; (*) mg/dl.h; (**) μ g/dl.h; (#) μ g/dl, corregido por valor basal; (##) ng/mg. AUCs no significativas entre grupos, excepto para triglicéridos en el estudio de α + β -caroteno (p<0.05).

Fig. 9.- Cromatograma de un suero, obtenido mediante sistema III. (ver sección Métodos).



Nº	Compuesto
1	ϵ, ϵ -caroten-3, 3'-diona
2	3'-OH- ϵ, ϵ -caroten-3-on
3	3-OH- β, ϵ -caroten-3'-on
4	(all-E)-Luteína
5	(all-E)-Zeaxantina
6	(13-Z)-luteína
	(13-Z) zeaxantina ?
8	No identificado
9	No identificado
10	(all-E)-Anhidroluteína
11	(all-E)-Anhidroluteína
12	No identificado
13	No identificado
14	(all-E)- α -criptoxantina
15	(all-E)- β -criptoxantina
16	(all-E)-licopeno
17	(9-Z)- ó (5-Z)-licopeno
18	(13-Z)-licopeno
19	(15-Z)-licopeno
20	Neurosporeno
21	γ -caroteno
22	ξ -caroteno
23	(all-E)- α -caroteno
24	(all-E)- β -caroteno
25	Fitoflueno
26	13-cis- β -caroteno
27	Fitoeno

Fig. 10.- Evolución en el tiempo

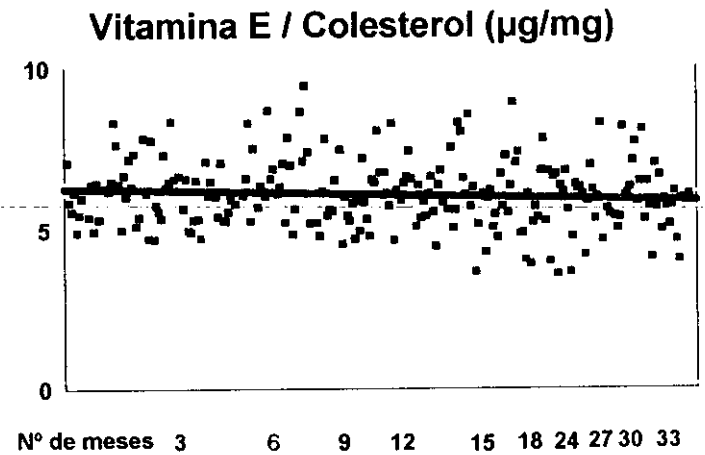
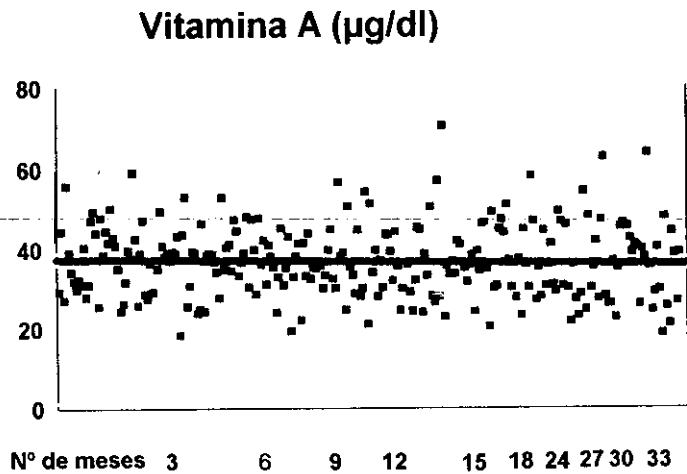
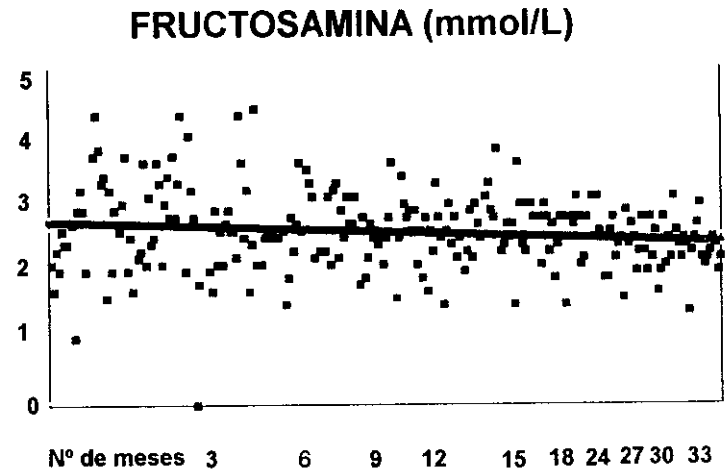
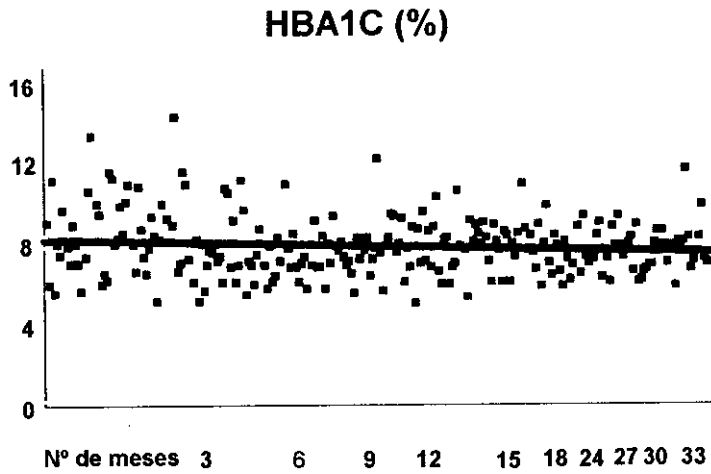


Fig. 11.- Retinol y Vitamina E/colesterol en relación con HBA1C y Fructosamina

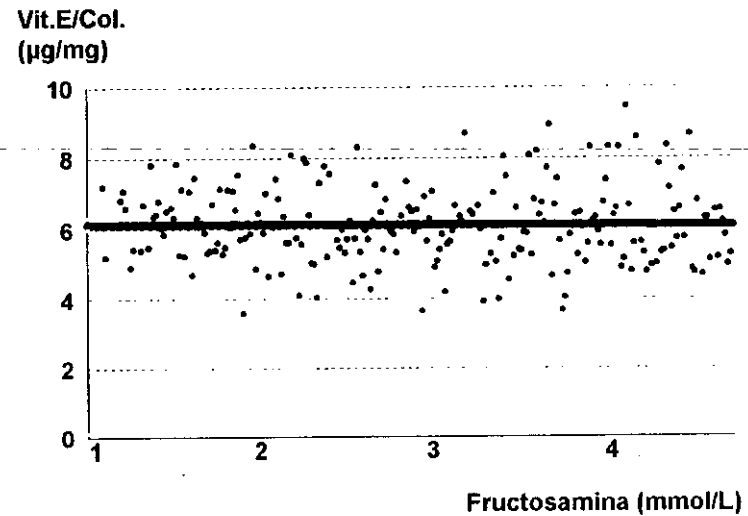
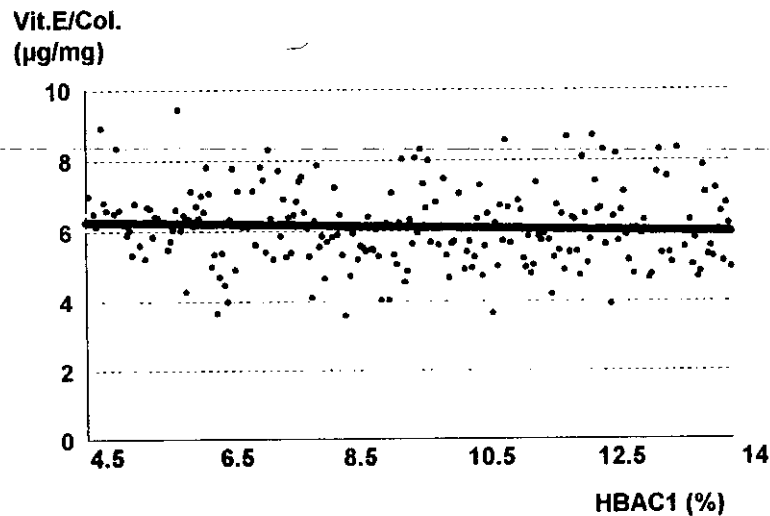
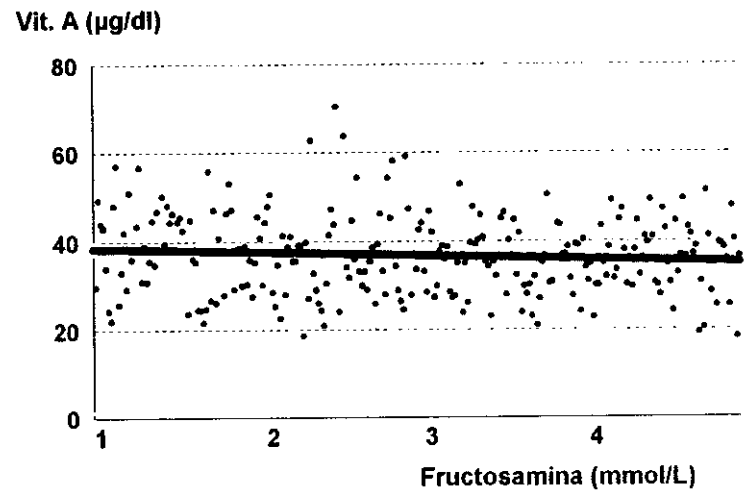
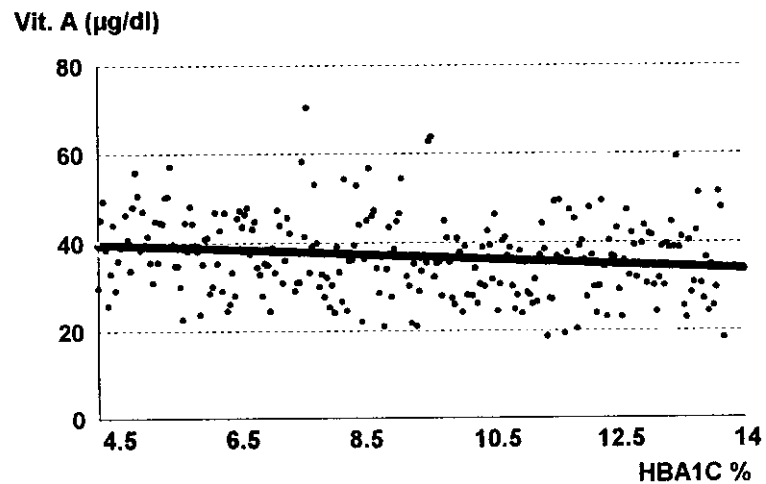


Fig. 12.- DIETA POBRE EN CAROTENOIDES

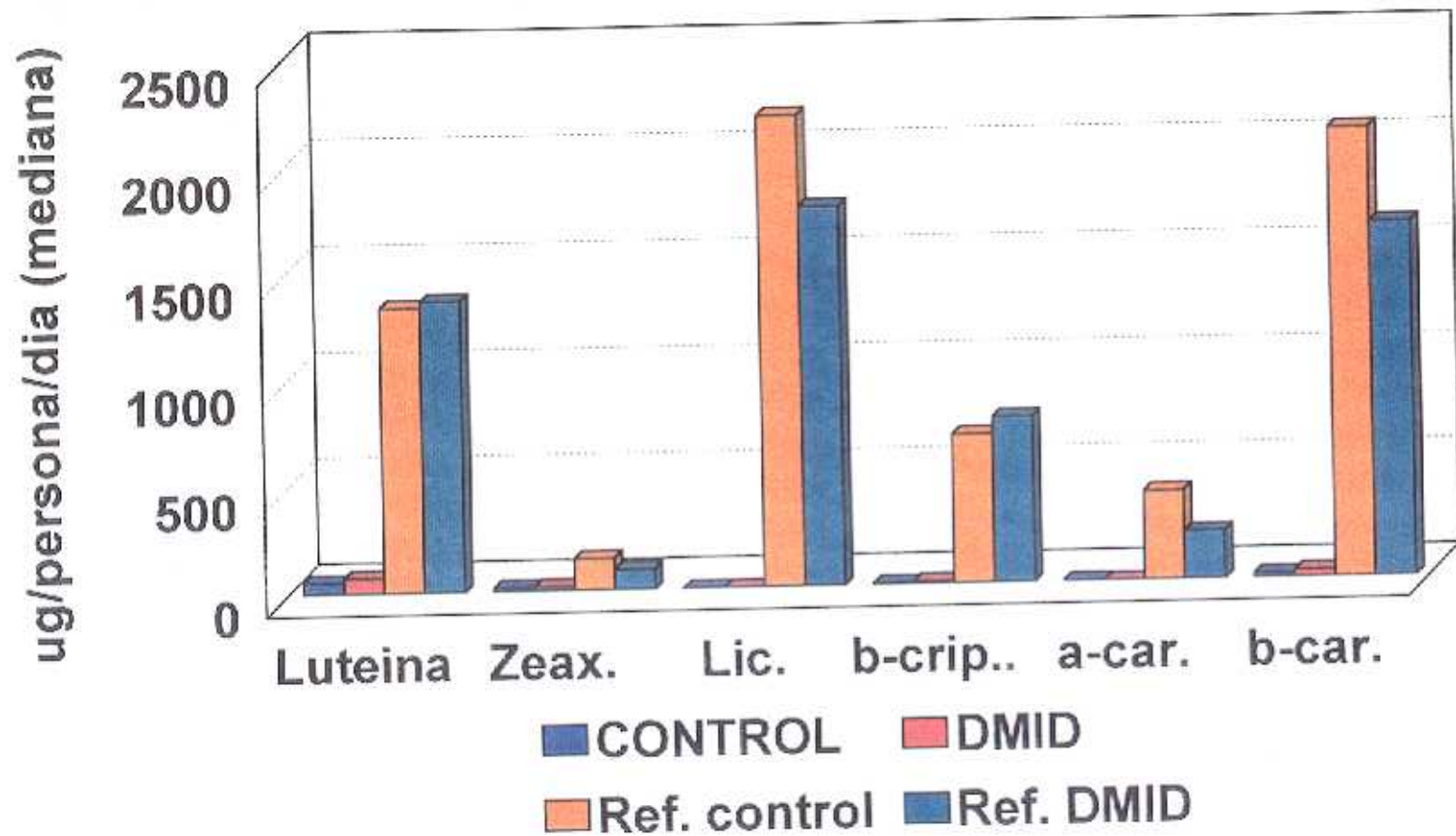
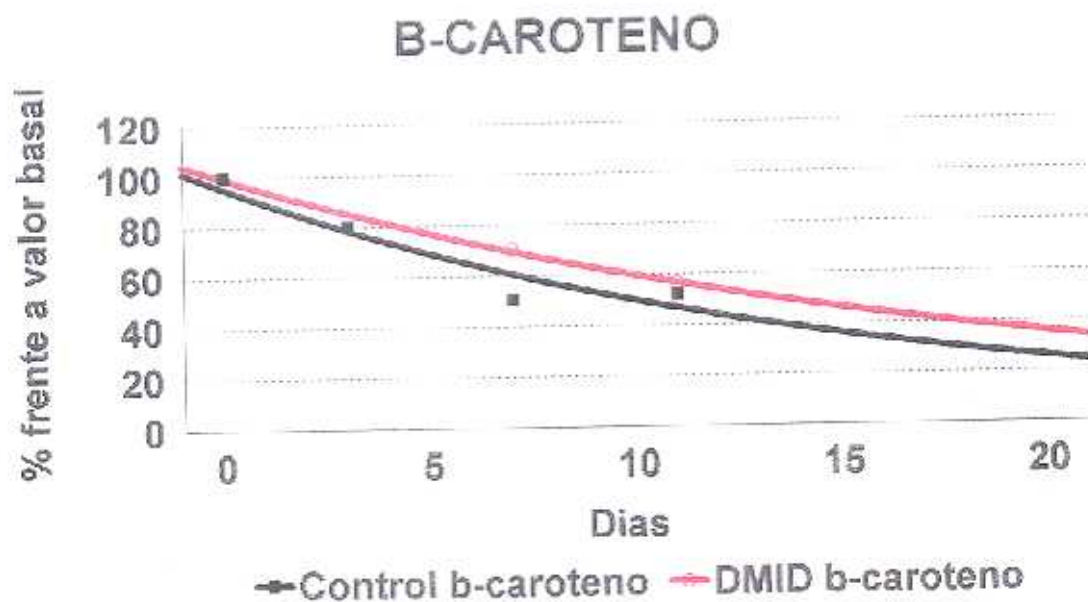
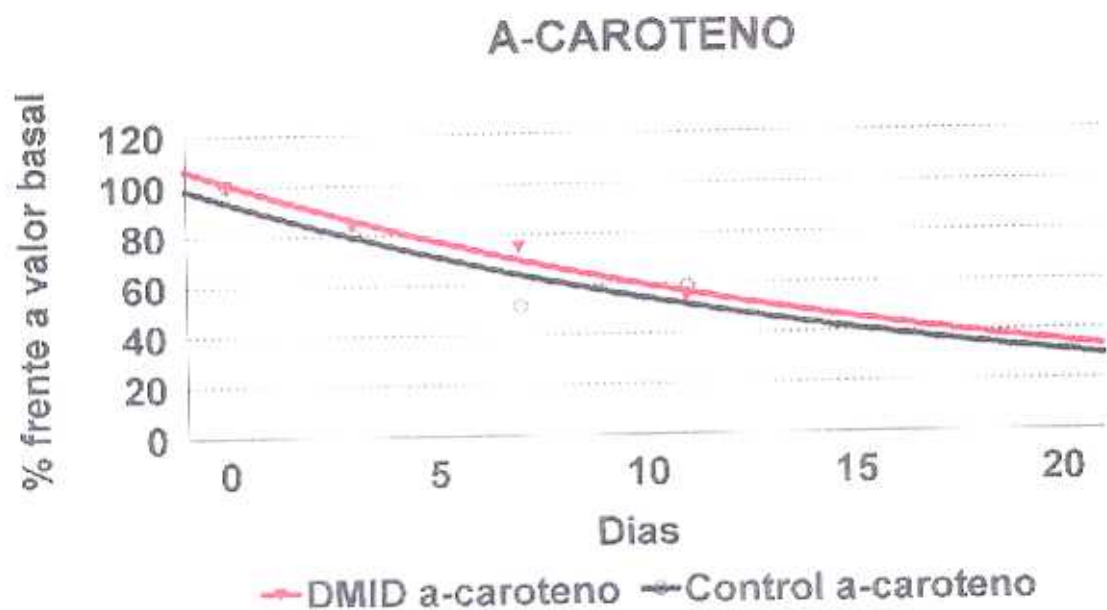
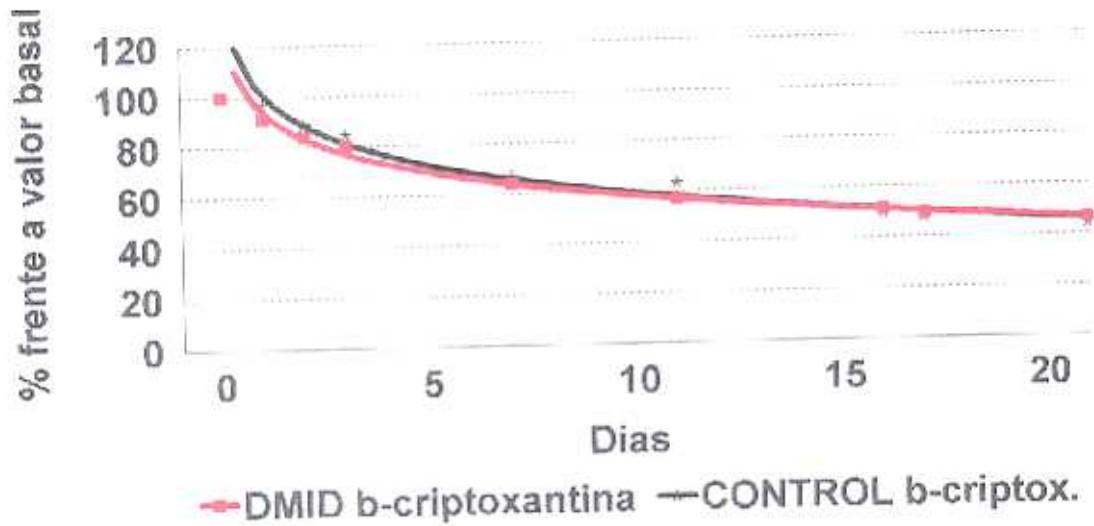


Fig.13 . - Carotenoides séricos durante una dieta pobre en carotenoides.

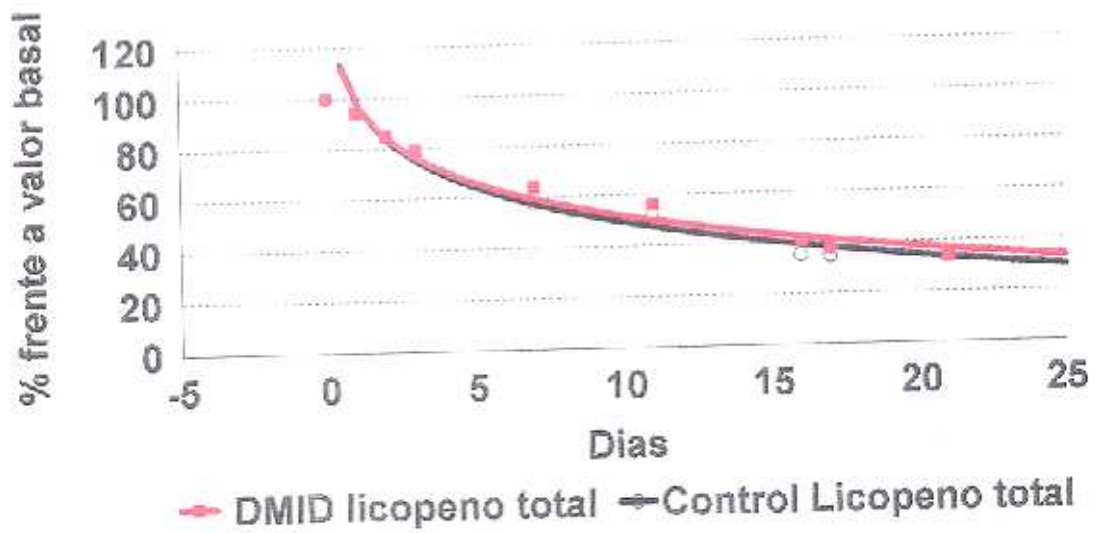


Ajuste exponencial ;IDDM (n=10); CONTROL (N=8)

B-CRIPTOXANTINA

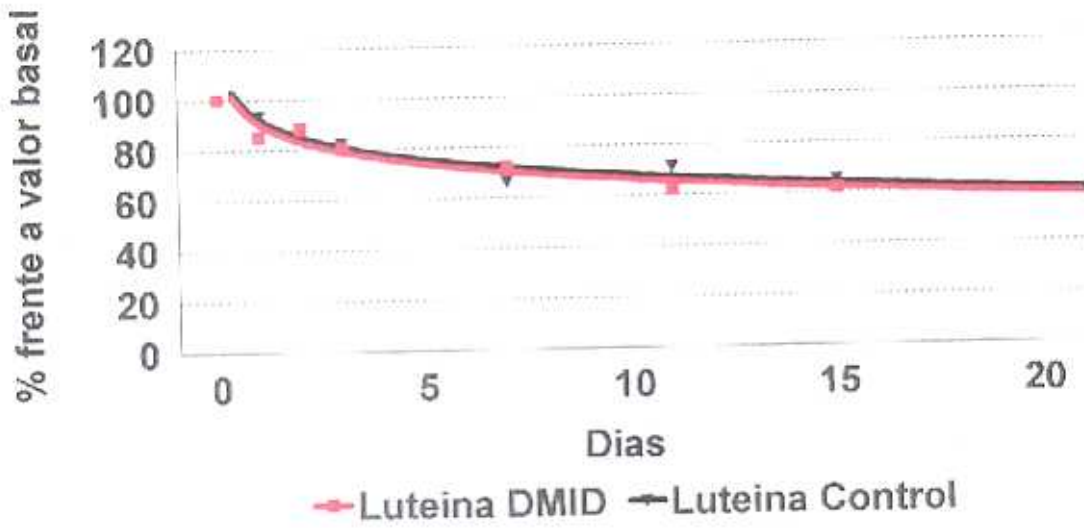


LICOPENO TOTAL

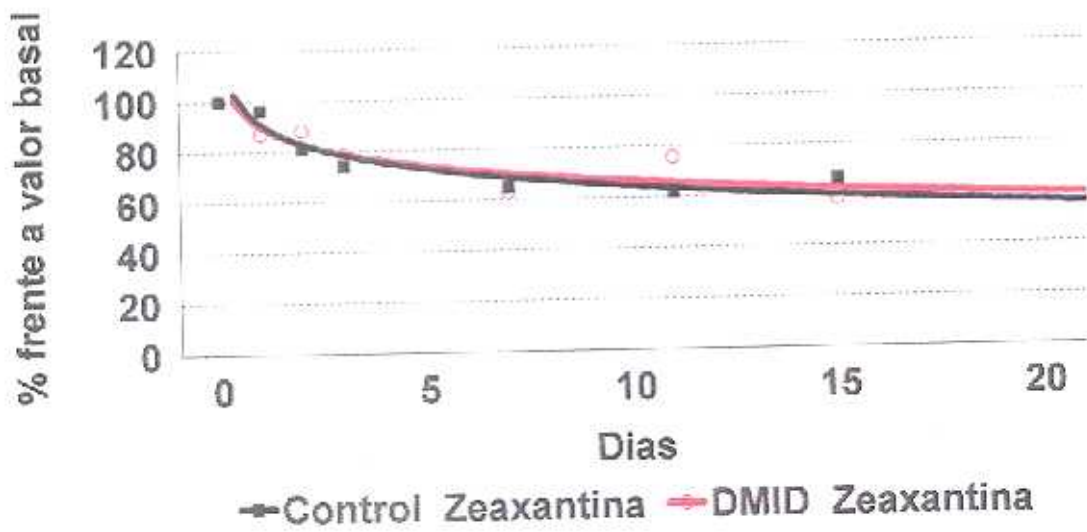


Ajuste por regresion logaritmica ;IDDM (n=10); CONTROL (n=8)

LUTEINA



ZEAXANTINA



Ajuste por regresion logaritmica ;DMID (n=10); CONTROL (n=8)

Fig. 14.- Respuesta de a-caroteno en "TRL"

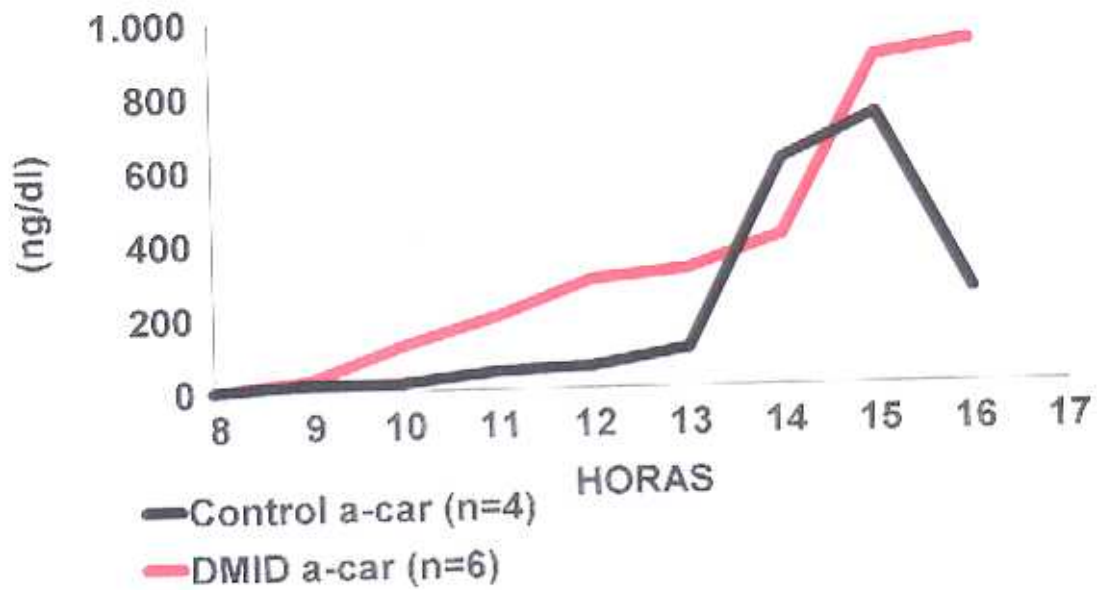


Fig. 15.- Respuesta de b-caroteno en "TRL"

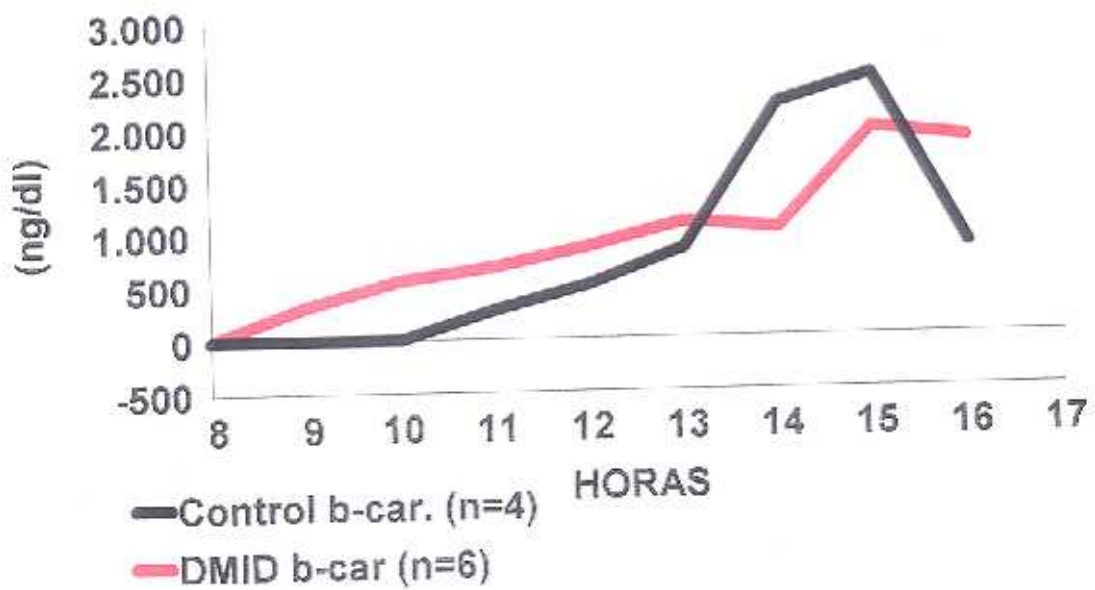


Fig. 16.- Respuesta de esteres de retinilo en "TRL"

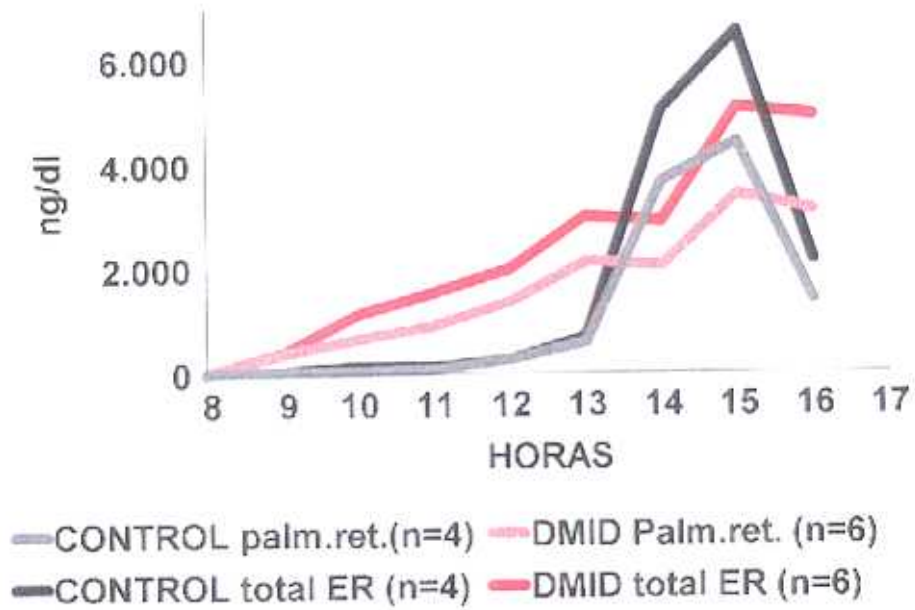


Fig. 17.- Respuesta de luteina en "TRL"

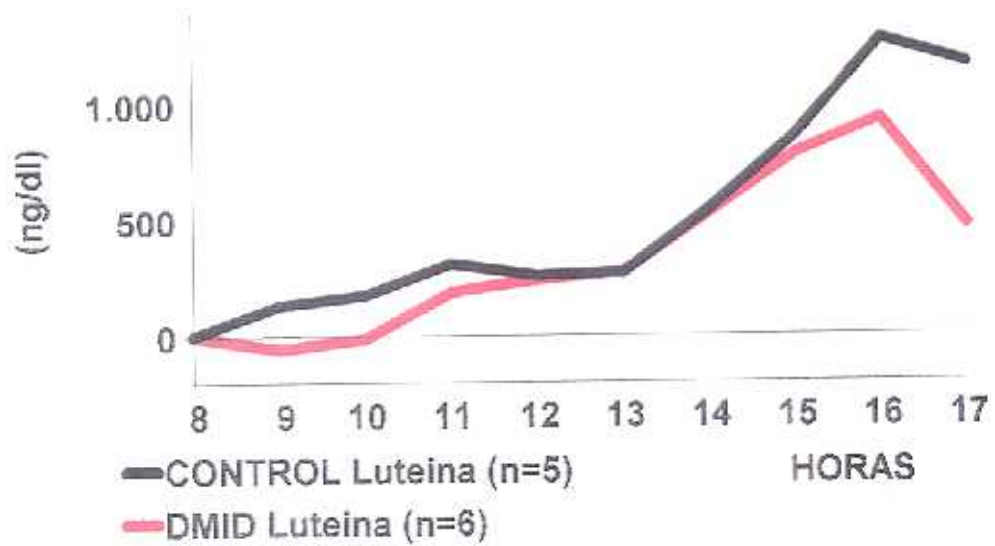


Fig. 18.- Respuesta de b-caroteno en suero
(AUC 0-8 horas)

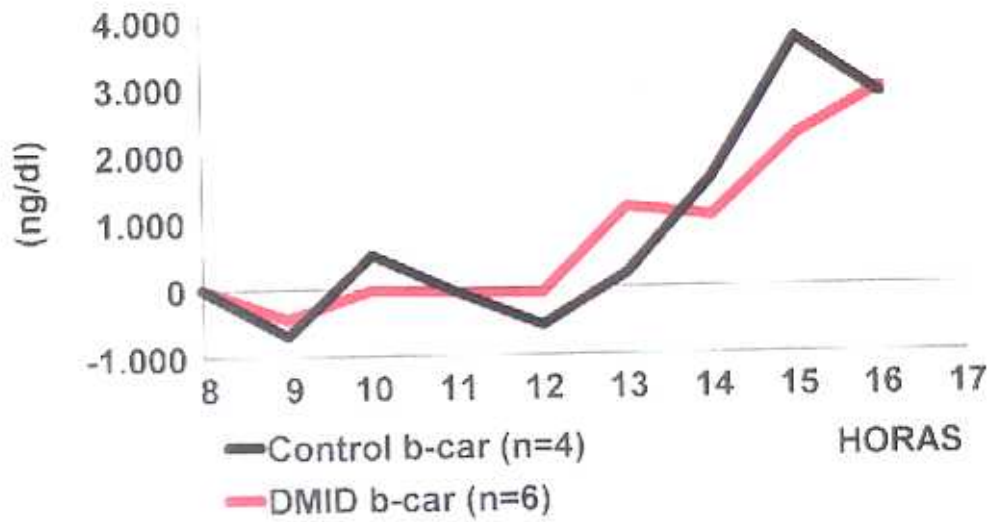


Fig 19.- Respuesta de a-caroteno en suero
(AUC 0-8 horas)

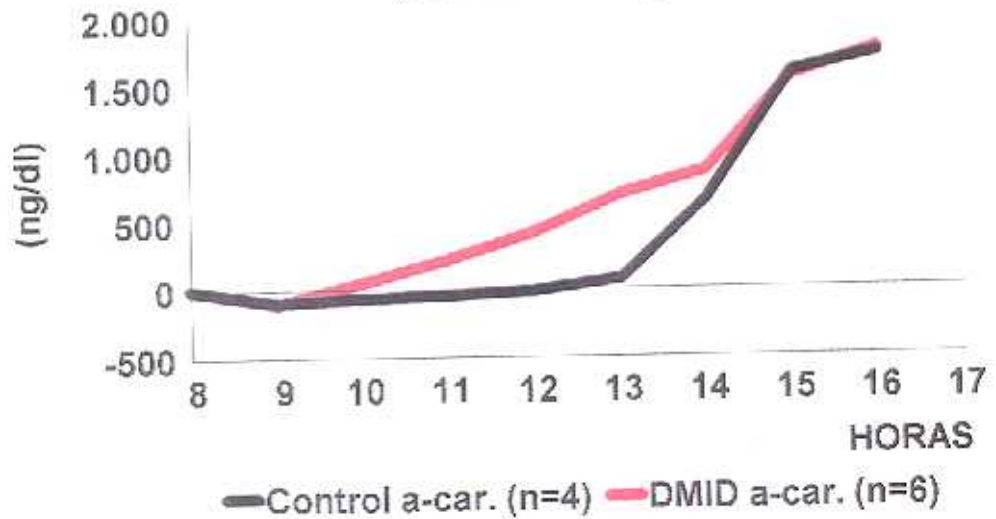


Fig. 20.- Respuesta de palmitato de retinilo en suero

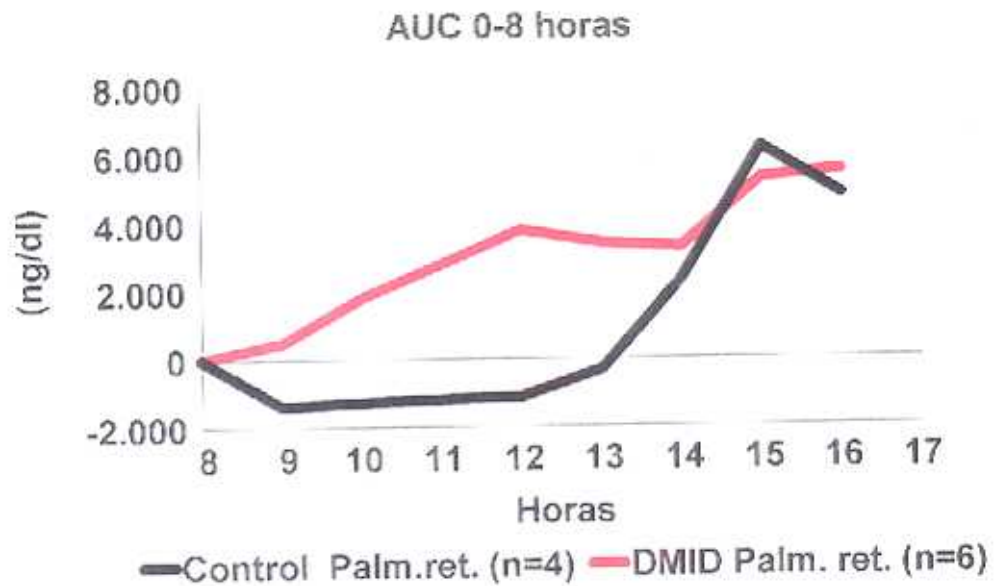


Fig. 21.- Respuesta de luteína en suero

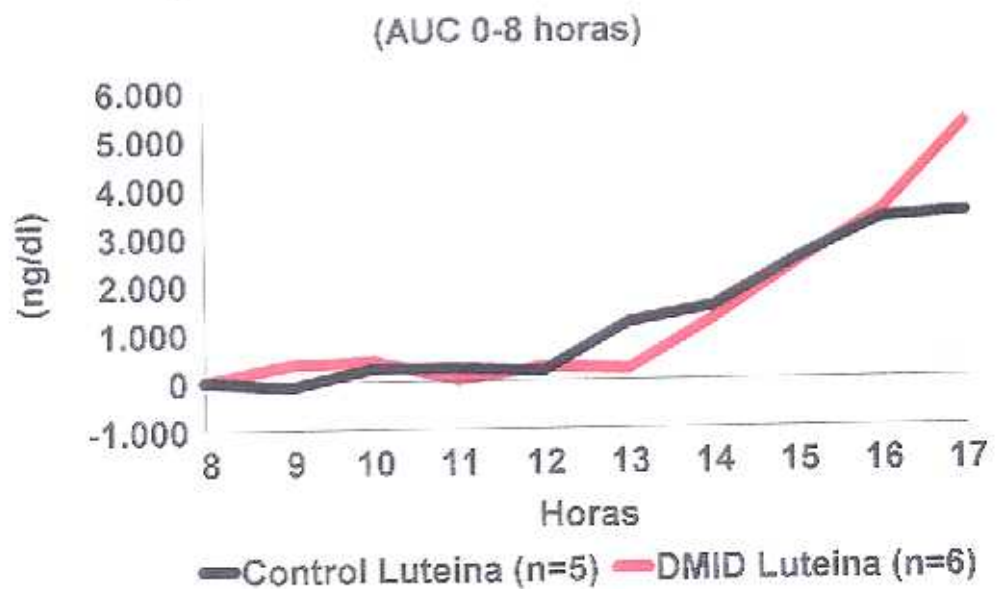


Fig. 22.- Respuesta de b-caroteno en suero

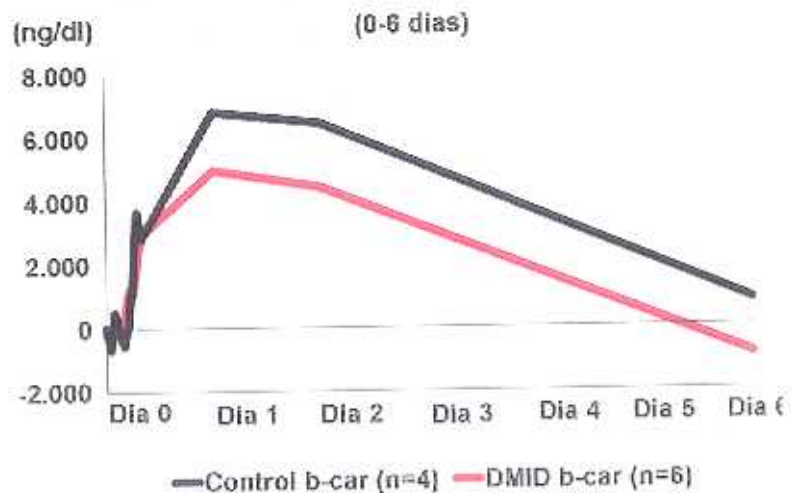


Fig. 23.- Respuesta de a-caroteno en suero

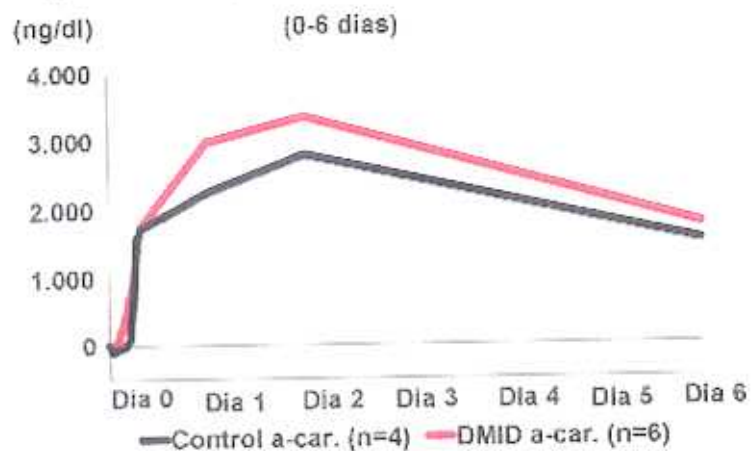
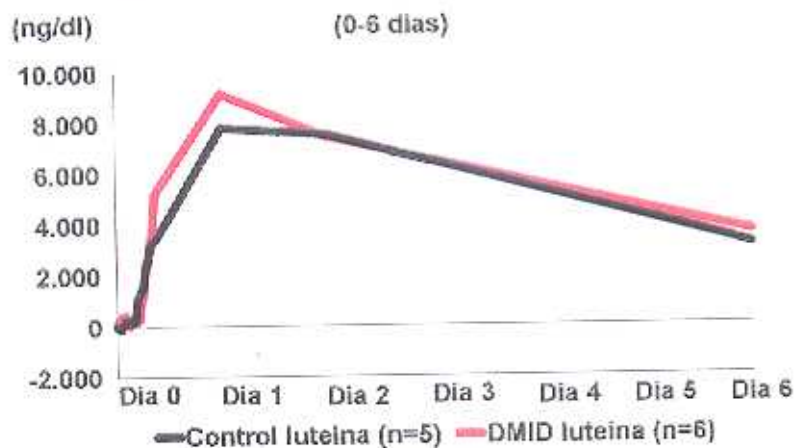


Fig. 24.- Respuesta de luteína en suero



DISCUSIÓN

6.- DISCUSION

6.1.- Control de calidad de los análisis.

Para interpretar correctamente las concentraciones de carotenoides, retinol y α -tocoferol, establecer rangos de referencia y detectar grupos de riesgo en una población, se debe utilizar un método validado y conocer la distribución de los compuestos en la población.

La utilidad del método analítico depende de la incertidumbre de la medida (variabilidad del método) y de la distribución del "analito" en la población (Sharpless y Duewer, 1995). La precisión y exactitud del método empleado en este trabajo, a lo largo del tiempo del estudio, a concentraciones típicas de la población donde pueden tener un significado clínico (valores altos o bajos), están en general calificadas por el National Institute of Standards and Technology (NIST) (EEUU) como "excepcional" y "aceptable" (± 1 o 2 SD) para los compuestos con valores certificados (retinol, α -tocoferol, β -caroteno, luteína y palmitato de retinilo).

La distribución de concentraciones de estos compuestos en dos poblaciones es una combinación de artefactos de medida, muestreo de la población y diferencias intrínsecas de las poblaciones (Sharpless y Duewer, 1995). El método analítico utilizado mostró para retinol y α -tocoferol una variabilidad muy baja en el rango completo de concentraciones. No obstante, la exactitud (% desviación frente a valores certificados) mostró valores de entre +15-20% a concentraciones bajas de ambos compuestos en materiales de referencia. Dada la distribución observada de estos compuestos en las poblaciones, este hecho afectaría a un porcentaje bajo de sujetos control mientras que en sujetos diabéticos provocaría una subestimación de la prevalencia de valores marginales de retinol (< 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$) en la población diabética. En el caso del α -tocoferol, esto afectaría a un porcentaje bajo de ambas poblaciones (percentil 5%).

Para el β -caroteno, la exactitud frente al valor certificado fue -2% y la variabilidad dentro del año < 4% a concentraciones próximas a la mediana de todos los grupos. Aunque el coeficiente de variación entre años fue >10% a concentraciones próximas a las medianas de los grupos, su posible efecto podría estar atenuado al afectar a una proporción de sujetos similar en ambos grupos (ajustados por sexo) y por el análisis aleatorizado de los grupos a lo largo del tiempo.

A concentraciones bajas tanto la reproducibilidad como la exactitud mostraron valores altos para determinados compuestos. Así, para α -caroteno, α -criptoxantina y zeaxantina se obtuvieron coeficientes muy variables (5-45%). Este hecho se puede relacionar con las bajas concentraciones encontradas en los sueros certificados, próximas al límite de detección, que fueron utilizados para establecer la reproducibilidad, a interferencias con otros compuestos y, en algunos casos, a pérdida de resolución de los compuestos a esas concentraciones (ej. luteína/zeaxantina). Aunque esto parece afectar por igual a todos los grupos, sin embargo, la presencia o ausencia de diferencias estadísticas pueden ser debidas, al menos en parte, a efectos de medida y no necesariamente a diferencias propias de las poblaciones.

El análisis aleatorizado de las muestras (controles y diabéticos) y los valores de reproducibilidad y exactitud analítica obtenidos, permiten establecer, con un grado de certidumbre razonable, que las diferencias observadas para la mayoría de los compuestos analizados son debidas a variaciones intrínsecas de las poblaciones estudiadas excepto, posiblemente, para α -caroteno y zeaxantina. En el estudio familiar, dado que la recolección de la muestra y el análisis se realizó el mismo día para cada familia, las diferencias observadas dependen sólo de la baja variabilidad analítica en el día y, por tanto, estas diferencias reflejan variaciones intrínsecas en la distribución de los compuestos entre grupos.

6.2.- Grupos de población.

Independientemente de los artefactos de medida, sesgo en el muestreo y diferencias propias de la población (Sharpless y Duewer, 1995), la variabilidad intraindividual es otro factor que determina los niveles de carotenoides en sujetos y su distribución en la población, afectando su interpretación y comparación con otros grupos (Van den Berg, 1993a, Olmedilla y cols, 1994).

En el estudio descriptivo (controles vs diabéticos), las poblaciones se establecieron mediante muestreo aleatorio simple (voluntarios). Los sujetos en ambos grupos de población pertenecían a la misma localización geográfica (Madrid) y presentaban una distribución de edad similar. Asimismo, los sujetos fueron seleccionados aleatoriamente a lo largo del año, ajustando la estacionalidad como factor determinante de los niveles de carotenoides en suero (Olmedilla y cols, 1994). Aunque la proporción de fumadores no se pudo ajustar entre grupos y sexos, las diferencias observadas sugieren que este no fue un factor determinante en la distribución de las concentraciones en los grupos (ver más adelante).

Por otro lado, el hecho de que diferencias similares entre sexos y entre grupos (controles vs diabéticos) han sido descritas en otros grupos de población ("validación externa") (Thurnham y cols, 1988; Ito y cols, 1990; Rojas-Hidalgo y Olmedilla, 1993; Basu y cols, 1989; Krempf y cols, 1991; Martinoli y cols, 1993) y la ausencia de criterios estrictos en la inclusión de los sujetos, hace que los grupos estudiados puedan ser considerados representativos y, posiblemente, las diferencias observadas extrapolables a una población mayor.

En el estudio familiar, se asumió la existencia de caracteres genéticos compartidos y patrones alimentarios similares. Además, se realizó la extracción y análisis de sangre tanto del diabético como del familiar en la misma época del año y día, lo cual anula prácticamente la variabilidad analítica. Así, el efecto del muestreo de la población se comprobó al estudiar el grupo control no-familiar y controles familiares. Al comparar ambos grupos, el análisis univariante mostró diferencias en la mayoría de los compuestos mientras que el estudio

multivariante eliminó estas diferencias excepto para el α -caroteno. Asimismo, al comparar el grupo no-familiar con los diabéticos, desaparecen las diferencias en los carotenoides provitamínicos (excepto β -criptoxantina en hombres) lo que puede relacionarse, dada la baja variabilidad analítica, con factores poblacionales (mayor desviación estándar en el grupo no-familiar). Al igual que en el estudio de valores de referencia, el análisis multivariante reveló mayores niveles de carotenoides provitamínicos asociados a la diabetes, especialmente en hombres.

6.3.-Prevalencia de valores marginales y "óptimos" en sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente.

En el estudio de los grupos de referencia, se evaluó en 123 sujetos diabéticos la prevalencia de niveles marginales y "óptimos" para retinol, α -tocoferol /colesterol y β -caroteno, compuestos para los cuales se han sugerido niveles "óptimos o adecuados" para la prevención de deficiencias y enfermedades crónicas.

No se encontraron niveles deficientes de vitamina A y E ($< 10 \mu\text{g}$ retinol /dl; $< 0.5 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol/dl}$) ni en controles ni en diabéticos. Concentraciones marginales de retinol ($20\text{-}30 \mu\text{g/dl}$) se observaron en el 2% de hombres control y 5% de las mujeres control, algunos de los cuales pertenecían a individuos muy jóvenes en los cuales se pueden considerar normales (Machlin, 1984; 1991). Por el contrario, en el grupo de diabéticos, una mayor proporción de sujetos se encuentran en estos rangos, siendo las mujeres el grupo de mayor riesgo (aproximadamente el 9% de hombres y el 23% de mujeres). Es posible que estos porcentajes sean algo mayores dada la sobreestimación de los niveles de retinol en el rango bajo de la distribución.

En el rango bajo de vitamina E ($0.5\text{-}0.7 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol/dl}$) se hallaron aproximadamente el 10% de hombres diabéticos y el 3% de las mujeres diabéticas y de controles (hombres y mujeres). No obstante, al considerar la relación $\alpha\text{-tocoferol/colesterol}$, prácticamente todos los sujetos presentaron relaciones $> 2.5 (\mu\text{g/mg})$, valor considerado en

general como adecuado (Machlin, 1984, 1991). Sin embargo, de acuerdo con Keller y Salked (1988), cocientes entre 2.2 y 3.8 son considerados como marginales, por lo que sólo un 2-3% de los controles y el 5% de las mujeres diabéticas estarían en este rango, mientras que los hombres diabéticos tendrían valores >3.8 .

La asociación entre una ingesta y/o niveles séricos elevados de estos compuestos y un riesgo relativo mínimo de muerte prematura por enfermedad cardiovascular, cáncer y otras enfermedades degenerativas, ha llevado a algunos autores a proponer valores de concentración "óptima" deseable para estos compuestos en sangre (Keller y Salked, 1988; Gey, 1994).

Según la distribución de retinol en estos grupos, sólo el 2% de hombres y mujeres diabéticas mostrarían niveles considerados como "óptimos" ($>57 \mu\text{g/dl}$) frente al 35% de hombres y 15% de mujeres control. Respecto al β -caroteno, un mayor porcentaje de la población diabética (30% hombres, 42% mujeres) frente al grupo control (13% hombres, 30% mujeres) mostrarían concentraciones séricas "óptimas" ($>21 \mu\text{g/dl}$) según Gey y cols (1994). Por el contrario, menos del 4% en ambos grupos estarían dentro de esta categoría de acuerdo a los valores de Keller y Salked (1988) ($>64 \mu\text{g/dl}$). Respecto a la relación α -tocoferol/colesterol (parámetro que muestra de forma más consistente la correlación inversa con enfermedad coronaria), y tomando como referencia el valor de 5.2 (Keller y Salked, 1988; Gey, 1994), aproximadamente $\geq 50\%$ de los sujetos, tanto controles como diabéticos, presentan relaciones superiores a este valor, indicando que más de la mitad de la población estudiada presenta una situación de bajo riesgo cardiovascular conforme a éste parámetro.

6.4.- La diabetes mellitus como determinante del status sérico de carotenoides, retinol y tocoferoles.

La concentración de carotenoides en suero está determinada tanto por la ingesta dietética como por factores no dietéticos. Los estudios de prevalencia llevados a cabo (valores de referencia, estudio familiar) muestran, en general, niveles mayores de carotenoides provitamínicos en

la población diabética y menores de retinol, mientras que carotenoides no-provitamínicos, α - y γ -tocoferol y la relación α -tocoferol/colesterol, no se diferencian. Asimismo, el análisis multivariante mostró de forma consistente al retinol y β -caroteno como variables asociadas a la diabetes, mientras que α -caroteno, β -criptoxantina y licopeno sólo se asociaron a la diabetes en hombres. En general, estos resultados coinciden con lo descrito por otros autores en sujetos con DMID (ver tabla 13).

Teniendo en cuenta que los pacientes con diabetes y sus familiares comparten factores genéticos y, posiblemente, patrones dietéticos, las diferencias entre grupos pudieran indicar una alteración del metabolismo de carotenoides en estos sujetos como se apuntó en los años 1930-1940 (Ralli y cols, 1935; Murrill y cols, 1941). Sin embargo, los mayores niveles de carotenoides provitamínicos en diabéticos pueden reflejar un mayor consumo de determinadas frutas y verduras (p.e. zanahoria, naranjas), incluso dentro del mismo hogar. No obstante, mientras que esto pudiera explicar las diferencias en β -criptoxantina (dado que el 85% de su ingesta depende del consumo de naranjas en invierno y primavera), no parece probable en el caso de β -caroteno, determinado en la población española sólo en un 25% por el consumo de zanahorias y en más del 50% por verduras y tomate (Granado y cols, 1996). Así, el hecho de que los niveles de luteína y licopeno (aportados por verduras y tomate) no varían entre estos grupos, sugiere que la ingesta dietética no es tan distinta entre grupos como para explicar todas las diferencias encontradas en las concentraciones séricas de carotenoides. Por otra parte, los análisis multivariantes mostraron a β -criptoxantina y licopeno como variables asociadas a la diabetes sólo en hombres, lo que sugiere la presencia de patrones dietéticos distintos entre sexos.

El hábito tabáquico se ha asociado con menores niveles de determinados carotenoides en suero (ver tabla 10). Sin embargo, éste no parece ser un determinante de las diferencias encontradas en el estudio familiar puesto que los menores niveles de α -, β -caroteno y β -criptoxantina no se presentan en los grupos con mayor proporción de fumadores como sería de esperar.

Los mayores niveles de carotenoides en diabéticos pueden reflejar mayores concentraciones de lipoproteínas (específicamente, LDL) como sus transportadores en sangre. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de lípidos entre grupos y la relación β -caroteno/LDL fue mayor en diabéticos que en sus familiares control, ajustados por sexo, lo que indica que mayor cantidad de β -caroteno por mg de LDL se transporta en diabéticos. Asimismo, si los mayores niveles fueran un efecto paralelo de los niveles de lípidos, cabría esperar que otros compuestos transportados de forma preferente en las mismas lipoproteínas (p.e. licopeno, α -tocoferol) también mostraran diferencias entre grupos, hecho que no se observó en el presente estudio.

El grupo de pacientes diabéticos presentan niveles más bajos de retinol (aunque no valores de deficiencia) como se ha descrito desde los años 40 (Murrill y cols, 1941; Mosenthal y cols, 1944; Kimble y cols, 1946). Este hecho no parece determinado por una menor ingesta de retinol-equivalentes dada la presencia de mayores niveles de carotenoides provitamínicos en este grupo. Así, podría estar asociado a una alteración en el metabolismo de carotenoides (Ralli y cols, 1935; Murrill y cols, 1994; Krill y cols, 1997), deberse a una alteración de la síntesis de RBP (Basu y cols, 1989; Basu y Basualdo, 1997) y/o menores niveles de transtiretina (Gebre-Medhin y cols, 1985) la cual podría afectar la formación del complejo con RBP-retinol y/o aumentar la excreción de RBP.

Aunque en el estudio familiar no se evaluó la presencia de microalbuminuria en los sujetos, ninguno de los diabéticos estaba en hemodiálisis o mostraba signos de retención de nitrógeno, presentando niveles de creatinina sérica, urea y urato dentro de la normalidad. De acuerdo con otros autores (Martinoli y cols, 1993; Ha y cols, 1996), si los pacientes diabéticos hubieran presentado macroalbuminuria o fallo renal, sería de esperar que mostrasen niveles más altos de retinol que los controles.

Por otro lado, como se observó en el estudio de seguimiento, con valores normales de microalbuminuria, el retinol no mostró relación con ésta variable. Es posible que en los estudios de referencia y familiar, algunos de los pacientes desarrollaran signos tempranos o intermedios de

nefropatía -con microalbuminuria intermitente dependiente de la hiperglucemia- mostrando niveles menores de retinol bajo estas condiciones (Martinoli y cols, 1993). Sin embargo, cabe señalar que la excreción urinaria de albúmina y RBP son indicadores distintos de la función renal (función glomerular y tubular, respectivamente) y que la diabetes insulino-dependiente puede afectar la función tubular incluso en presencia de una función glomerular normal (Dubrey y cols, 1997), pudiendo existir una mayor excreción de RBP, incluso en ausencia de microalbuminuria (Catalano y cols, 1993; Dubrey y cols, 1997).

Las concentraciones de retinol menores en diabéticos pudieran reflejar una respuesta de fase aguda, episodios de fiebre o infecciones, las cuales disminuyen las concentraciones de albúmina y transtiretina séricas y aumentan la excreción de RBP (Thurhnam, 1990; Stephensen y cols, 1994). En los estudios de prevalencia, no se determinaron proteínas de fase aguda (p.e. proteína C reactiva), aunque los sujetos estaban, aparentemente, libres de infección y fiebre y mostraron niveles de albúmina en el rango normal. Asimismo, aunque en el estudio de seguimiento, la presencia de infecciones (con o sin períodos febriles) se asoció, con valores de retinol sérico intra-sujeto más bajos, parece poco probable que los menores valores de retinol observados se puedan relacionar con una mayor presencia de infecciones en pacientes diabéticos.

Respecto al α -tocoferol, en sujetos diabéticos se han descrito tanto niveles elevados como normales (ver tabla 13) lo que puede reflejar la inclusión de sujetos con hiperlipidemia y/o heterogeneidad de los grupos analizados, y un mal control de la diabetes (Holler y cols, 1993; Mooradian y cols, 1994; Ndahimana, 1996), dado que al estandarizar con colesterol, los niveles no son diferentes de aquellos mostrados por sujetos normolipémicos (Vandewoude y cols, 1987; Tsai y cols, 1994). En el presente estudio, α -tocoferol, γ -tocoferol y la relación α -tocoferol/colesterol no fueron diferentes entre los sujetos diabéticos y sus familiares en primer grado, ni fueron asociados a la diabetes mellitus en los modelos de regresión múltiple.

6.4.1.- Tiempo de evolución de la enfermedad y presencia de retinopatía.

Los sujetos con más de 10 años de evolución de la enfermedad mostraron niveles de α -tocoferol ligeramente más elevados y menores de licopeno. Concentraciones elevadas de α -tocoferol, junto con niveles altos de retinol, han sido descritos en diabéticos con nefropatía (Martinoli y cols, 1993) y menores de licopeno en sujetos con fallo renal crónico (Ha y cols, 1996). Aunque los resultados obtenidos en nuestro estudio pudieran relacionarse con la presencia de alteraciones renales en estos sujetos, esto no parece probable ya que no presentaron concentraciones séricas elevadas de retinol asociadas a nefropatía (Martinoli y cols, 1993).

Mientras que diferencias en el perfil lipídico podrían explicar los mayores niveles de α -tocoferol en el grupo con más de 10 años de evolución, esto no explicaría los menores de licopeno dado que ambos compuestos presentan una distribución similar en lipoproteínas. En nuestro estudio, los menores niveles de licopeno podrían ser debidos a un sesgo estacional en la selección de los sujetos dado que una mayor proporción de sujetos fueron seleccionados en primavera en el grupo de más de 10 años, mientras que en el grupo de menos de 10 años, más sujetos se seleccionaron en verano, coincidiendo con una mayor ingesta de alimentos ricos en licopeno (Granado y cols, 1996).

Por otro lado, la presencia de retinopatía se asoció a sujetos de mayor edad y tiempo de evolución de la enfermedad, aunque no se observaron cambios significativos en el retinol sérico.

6.4.2.- Control de la glucemia en la diabetes mellitus insulino-dependiente.

A lo largo del tiempo en tratamiento intensivo, los valores de fructosamina y HbA1c mostraron una tendencia a disminuir, acercándose a valores de referencia, aunque los niveles de retinol y la relación α -

tocoferol/colesterol no mostraron cambios significativos. Aunque el retinol sérico mostró una correlación negativa con HbA1c y la dosis total de insulina/día, pero no con la fructosamina, al establecer puntos de corte basados en objetivos razonables de control de la enfermedad (glucemia <155 mg/dl y HbA1c <7.2%) (ADA, 1996c), no se observaron cambios significativos en los niveles de retinol ni en la relación α -tocoferol/colesterol, y ninguno de los parámetros se asoció al retinol en modelos de regresión múltiple. Estos resultados sugieren que el control glucémico en la diabetes, según estos parámetros y los puntos de corte establecidos, no parece ser un factor determinante de los niveles de retinol ni de la relación α -tocoferol/colesterol en suero en este grupo.

Por otro lado, los niveles más bajos de retinol en diabéticos podrían relacionarse con un status bajo de proteínas, hierro o zinc (Machlin, 1991; Basu y Basualdo, 1997). En el estudio de seguimiento, los sujetos diabéticos no mostraron signos bioquímicos de status nutricional deficiente aunque, de forma individual y temporalmente, algunos presentaran valores bajos en suero de cinc y/o ferritina. Aunque, el retinol se relacionó con ferritina (indicador de status nutricional de hierro) y cinc (cofactor en la síntesis de RBP), ninguna de estas variables se asoció como determinante de los niveles séricos de retinol en modelos multivariantes.

Por último, la ausencia de variaciones significativas en la relación α -tocoferol/colesterol, en función del control de la enfermedad y a lo largo del tiempo, puede deberse a la utilización de ésta relación, como medida más fiable del status de vitamina E, y a los criterios de inclusión establecidos para este estudio y que han podido contribuir a una mayor homogeneidad del grupo de diabéticos evaluados, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Mooradian y cols, 1994; Vandewoude y cols, 1987; Tsai y cols, 1994).

6.5.- Correlaciones entre compuestos en suero.

En el análisis de las poblaciones control y diabética, se encontraron correlaciones altas (>0.6 , $p<0.0001$), independientemente del sexo y de la presencia de diabetes, para α -/ β -caroteno y luteína/zeaxantina, siendo similares a los observados en otros estudios (Ascherio y cols, 1992). Estas correlaciones pueden ser debidas a la presencia simultánea de estos carotenoides en frutas y verduras de frecuente consumo (Granado y cols, 1992; Hart y Scott, 1995; Olmedilla y cols, 1996c). Sin embargo, luteína y β -caroteno, carotenoides presentes de forma invariable en verduras (Granado y cols, 1992; Olmedilla y cols, 1996), presentaron una correlación baja (<0.30) lo que puede estar relacionado con la capacidad provitamínica A del β -caroteno.

Valores relativamente altos ($r>0.50$) se observaron para licopeno/ α -caroteno en hombres diabéticos y β -criptoxatina/ β -caroteno y zeaxantina en mujeres diabéticas. Correlaciones similares a las observadas entre licopeno/ β -caroteno han sido descritas por Ascherio (1992) quien sugiere, dada la ausencia de correlación dietética, un nexo absorptivo o metabólico entre ambos carotenoides. No obstante, en nuestra población, el consumo de tomate contribuye de forma significativa a la ingesta de ambos carotenoides (Granado y cols, 1996). Este hecho, junto con el aumento de absorción de licopeno en presencia de β -caroteno (Johnson y cols, 1997), pueden explicar, en parte, la correlación observada.

Correlaciones entre 0.01-0.1 para retinol y cada uno de los carotenoides provitamínicos se pueden explicar a partir del control homeostático del retinol en plasma (Gey y cols, 1994; Ascherio y cols, 1992). Retinol y α -tocoferol mostraron valores de 0.31-0.52, excepto en mujeres diabéticas, ligeramente superiores a las observadas por otros autores (Tee y cols, 1994). α -tocoferol se correlacionó con luteína y zeaxantina en todos los grupos excepto con luteína en hombres diabéticos (0.09, $p<0.5$). Dado que tocoferoles y carotenoides son transportados por lipoproteínas, aunque con distinta distribución (Johnson y cols 1992; Traber y cols, 1994), se podrían esperar similares correlaciones para otros carotenoides vehiculizados por las mismas partículas, aunque éstas fueron menores.

En general, las correlaciones observadas entre sexos y entre grupos (ajustados por sexo) parecen indicar que la relación entre estos compuestos en suero no está asociada con problemas metodológicos (Sharpless y Duewer, 1995) sino que reflejan diferencias entre grupos debidas a hábitos dietéticos y/o efectos metabólicos.

6.6.- La dieta como determinante del status sérico de carotenoides.

6.6.1- Validación y reproducibilidad del CFS.

En la **validación** de los métodos de ingesta, se utilizó como referencia los niveles séricos de carotenoides - considerados como marcadores bioquímicos- ya que presentan errores de medida independientes (Van't Veer, 1993), y aunque estos marcadores no representen medidas directas de exposición dietética dada la variación intra- e inter-individual en la biodisponibilidad de nutrientes (Van Vliet y cols 1996; De Pee y West, 1996; Parker, 1997).

Las correlaciones obtenidas con ambos métodos indican, globalmente, una mejor relación entre niveles séricos e ingesta evaluada con el CFS que con registros de 3 días, en ambos grupos, lo que puede deberse a un número insuficiente de días registrados. Diferentes estudios han encontrado correlaciones significativas entre ingesta de algunos carotenoides y suero usando cuestionarios de frecuencia (Coates, 1991; Ascherio, 1992) mientras que otros no evidenciaron relación para licopeno, β -caroteno y luteína y zeaxantina (Coates, 1991; Ascherio, 1992; Forman, 1993; Kaardinal, 1995). Las correlaciones observadas fueron mayores en diabéticos y en mujeres (en ambos grupos) lo que pudiera relacionarse con una mayor fiabilidad en la evaluación de la ingesta en estos sujetos y/o una diferente biodisponibilidad debido al consumo de distintos alimentos en estos grupos. Así, las bajas correlaciones para licopeno podrían estar relacionadas con la menor biodisponibilidad de este carotenoide a partir de fuentes no procesadas (Stahl y cols, 1992a) así como con una mayor variabilidad en el contenido de licopeno de las principales fuentes en la dieta (Granado y cols, 1997; Olmedilla y cols, 1998).

Además de los factores implicados en la relación dieta-suero (variación inter-individual en la absorción y entre carotenoides, diferentes matrices de alimentos, tipo de procesamiento, etc), la gran variabilidad intra e inter-individual tanto en el consumo como en los niveles séricos de vitaminas, hace que las correlaciones entre ingesta y suero sean, en el mejor de los casos, modestas (Boltón-Smith y cols, 1991). En el presente estudio, se obtuvieron valores "aceptables" de correlación ($>0.5-0.6$; Jarvinen, 1996) para β -criptoxantina, en ambos sexos y grupos, mientras que para otros carotenoides sólo se obtuvieron en el grupo de diabéticos utilizando el CFS. En general, la menor correlación para β -caroteno y luteína puede relacionarse con el mayor número de frutas y verduras que aportan estos carotenoides, así como con la capacidad provitamínica del β -caroteno, mientras que para α -caroteno y β -criptoxantina, la mayor correlación se deba, posiblemente, al menor número de alimentos que aportan estos carotenoides. Asimismo, variaciones estacionales en el consumo de frutas y verduras también afectan las correlaciones con suero debido a que las fuentes son distintas y pueden afectar la biodisponibilidad de los carotenoides (Scott, 1996), hecho observado para β -caroteno, α -caroteno y licopeno en el grupo control.

En general, el CFS asignó correctamente en cuartiles extremos un mayor número de diabéticos que de controles, especialmente en el cuartil inferior, excepto para β -criptoxantina la cual mostró la mejor correlación con el suero, coincidiendo con lo descrito por Forman y cols. (1993). En el caso de luteína, zeaxantina, β -caroteno (en controles) y licopeno (en diabéticos), el porcentaje de sujetos asignados a cuartiles opuestos fue el esperado por el azar (Garrow, 1995). Este hecho puede indicar tanto que el método utilizado no es válido para estimar la exposición real a estos compuestos, discriminando los sujetos según su ingesta, como a que los niveles séricos no reflejan la ingesta real de manera dosis-dependiente.

En la evaluación de la **reproducibilidad** del CFS (ingesta en invierno y primavera en el grupo control), se observó ausencia de correlación entre las medidas repetidas de la ingesta lo que puede indicar una baja reproducibilidad del método utilizado, incapacidad de

los sujetos para reflejar su consumo de alimentos y/o variaciones en el consumo de alimentos (Jarvinen, 1996). Sin embargo, estas variaciones se presentaron tanto en la ingesta como en los niveles séricos de carotenoides lo que parece indicar que esta falta de reproducibilidad se debe a cambios dietéticos que se reflejan en los niveles séricos de carotenoides.

Aunque, no se puede descartar un "efecto de aprendizaje" en este grupo, que implicaría un aumento de la variabilidad intra-individual, aumento de errores y correlaciones disminuídas (Goldbohm y cols, 1995), la baja proporción de sujetos asignados a cuartiles opuestos en medidas repetidas, parece indicar tanto que una elevada proporción de sujetos mantienen sus patrones dietéticos a lo largo del tiempo así como que el método (CFS) es razonablemente útil para identificar sujetos en rangos extremos de ingesta, independientemente de las variaciones estacionales en el consumo de determinados alimentos.

6.6.2.- Ingesta dietética y niveles séricos de carotenoides.

Los CFS suelen sobreestimar la ingesta, especialmente de frutas y hortalizas, aunque son válidos para clasificar ingesta dietéticas entre grupos y sujetos (Block, 1992). Así, los resultados observados no proporcionan necesariamente medidas cuantitativas sino, más bien, cualitativas de ingesta entre grupos.

Los sujetos control mostraron ingestas de carotenoides mayores que los diabéticos, excepto para luteína y β -criptoxantina y los niveles séricos reflejaron los patrones dietéticos entre grupos, excepto para luteína. La falta de coincidencia en las diferencias significativas entre dieta y suero pudiera estar relacionada con errores de medida dietética (especialmente en controles), interferencias en suero (p.e. luteína/zeaxantina), el bajo número de sujetos en los grupos y/o una alta variabilidad en las concentraciones séricas.

Los valores de consumo individual de carotenoides sugieren una ingesta diferente de determinados alimentos en ambos grupos (p.e. naranjas, zanahorias) e igual de otros (p.e. verduras) aunque su efecto

sobre los niveles séricos no parece dosis-dependiente. Sin embargo, los mayores niveles de carotenoides en suero indican un mayor aporte en la dieta, independientemente de la sobreestimación de la ingesta mediante el uso de CFS, la menor correlación entre ingesta y suero en el grupo control y/o la diferente biodisponibilidad a partir de distintos alimentos. Asimismo, en el estudio con diabéticos a lo largo del tiempo, las variaciones en la ingesta de carotenoides en distintas épocas del año se reflejaron en los niveles séricos, coincidiendo con observaciones previas en nuestra población (Granado y cols, 1996; Olmedilla y cols, 1994).

Por otro lado, tras dietas "pobres" en carotenoides, tanto los sujetos diabéticos como controles presentaron descensos significativos de todos los carotenoides en suero, coincidiendo con lo descrito por otros autores respecto a que los niveles séricos reflejan la ingesta a corto plazo (Rock y Swenseid, 1992a; Bowen y cols, 1993; Yeum y cols, 1996). El ritmo de desaparición en suero presentó dos velocidades distintas y coincide con lo descrito en otros estudios (Rock y cols, 1992a; Stahl y cols, 1992a), sugiriendo la presencia de dos reservas corporales con velocidades de recambio diferentes (Rock y cols, 1992a).

El ritmo de desaparición en suero fue distinto para los diferentes carotenoides y se relacionó, en parte, con las concentraciones séricas iniciales (más rápido a mayor concentración). No presentó diferencias entre diabéticos y controles, alcanzándose porcentajes finales similares para todos los carotenoides y valores de vida media de carotenoides en suero iguales para ambos grupos y similares a los descritos en la bibliografía (ver tabla 8b).

En conjunto, estos resultados indican la dieta como un factor determinante de las diferencias en carotenoides séricos entre los grupos analizados, sin descartar el efecto de otros factores (p.e. biodisponibilidad) en la relación dosis-dependiente entre ingesta y suero. Asimismo, en ausencia de su aporte en la dieta, el ritmo de desaparición de carotenoides en suero, y recambio de las reservas corporales, es independiente de la presencia de diabetes insulino-dependiente.

6.7.- Biodisponibilidad de carotenoides.

En los estudios de biodisponibilidad, el área de concentraciones frente a tiempo (AUC) proporciona una medida de la cantidad de nutriente absorbido a partir del tracto gastrointestinal (Kostic y cols, 1995), especialmente en fracciones de lipoproteínas ricas en triglicéridos - "TRL"- (Van Vliet y cols, 1995). Asimismo, el perfil de la curva frente al tiempo puede proporcionar información sobre velocidad de absorción, mientras que la concentración máxima alcanzada y el tiempo requerido para alcanzarla dan idea del momento en que la velocidad de absorción y desaparición se igualan. Sin embargo, cabe resaltar que estos parámetros (AUC, concentración máxima y tiempo para alcanzarla, vida media) son farmacológicos y que su aplicación al estudio de nutrientes no es totalmente comparable dada la presencia endógena de esos nutrientes.

La respuesta en TRL a la administración de carotenoides mostró una gran variabilidad entre sujetos en cada grupo, coincidiendo con lo descrito en otros estudios (Stahl y cols, 1995; Van Vliet y cols, 1995; Kostic y cols, 1995; Wingerath y cols, 1995; Jonhson y cols, 1997; Gärtner y cols, 1997; Pateau y cols, 1997). Como ha sido señalado por Van Vliet y cols (1995), la comparación cuantitativa de los distintos estudios de biodisponibilidad descritos en la bibliografía es poco útil debido a la gran variabilidad en los diseños utilizados (dosis, patrón de comidas, cantidad de grasa, esquema de la toma de muestras, características de los sujetos, tipo de muestra evaluada (TRL, suero)).

En el presente estudio, la ausencia de 9-cis- β -caroteno, β -apo-carotenales (indicadores de rotura excéntrica) o formas éster de luteína en TRL y plasma durante el período de 8 horas tras la administración de las cápsulas, coinciden con lo descrito por otros autores (Khachick y cols, 1991; Stahl y cols, 1993a; Stahl y cols, 1995; Wingerath y cols, 1995; You y cols, 1996).

Cualitativamente, ambos grupos se comportaron de forma similar aunque los diabéticos mostraron una mayor absorción relativa de α -caroteno frente a β -caroteno (AUCs y C.máx), tanto en TRL como suero, reflejando mejor la composición de la cápsula administrada. Aunque estas

diferencias no fueron significativas, pueden estar relacionadas con una absorción, incorporación a quilomicrones y/o utilización preferencial como sustratos precursores de retinol. Asimismo, el aumento de all-trans-luteína y de la relación luteína/cetocarotenoides observada en TRL en ambos grupos parece indicar que los cetocarotenoides no se forman durante la absorción de luteína y/o preparación de la muestra sino posteriormente "in vivo", lo que concuerda con lo observado en otros estudios de suplementación con luteína (Khachick y cols, 1995a; Olmedilla y cols, 1997a).

Al comparar con estudios de biodisponibilidad similares, se observó un retraso en la respuesta en la mayoría de los sujetos de ambos grupos, posiblemente relacionado con el protocolo utilizado (patrón típico de comidas y sin periodo de ayunas durante las 8 horas de estudio), provocando un retraso en el vaciamiento gástrico y en la lipemia postprandial debido a la cantidad y tipo de grasa (40 g de aceite de oliva) administrada con la cápsula (Fielding y cols, 1996; Borel y cols, 1997). La concentración máxima de carotenoides, ésteres de retinilo y triglicéridos coincidió en el tiempo y se presentó, en ambos grupos, inmediatamente después de ingerir la comida coincidiendo con lo descrito por Fielding y cols (1996) quienes apuntan que este tipo de respuesta sugiere la liberación de quilomicrones preformados (en la primera comida), más que el procesamiento completo de la grasa en el lumen intestinal.

El porcentaje estimado de absorción de $\alpha+\beta$ -caroteno en TRL durante el periodo de 8 horas no se diferenció entre grupos (8-9%, excluyendo al sujeto control que no respondió), y coincide con lo descrito en sujetos con diabetes (tipo MODY) (Ramachandran, 1973). Sin embargo, este porcentaje es algo menor al descrito en otros estudios (Van Vliet y cols, 1995; Novotny y cols, 1995) debido, posiblemente, al retraso observado en la respuesta. De la cantidad absorbida, aproximadamente un 60% apareció como ésteres de retinol (% de conversión) en ambos grupos. Aunque estas estimaciones son meras aproximaciones y deben considerarse como tentativas, los valores son bastante similares a los descritos en otros estudios (Goodman y cols, 1966; Blomstrad y Werner, 1967; Van Vliet y cols, 1995).

El perfil de la curva de concentraciones frente al tiempo fue diferente para α -+ β -caroteno y luteína. La menor absorción relativa de luteína frente a α -+ β -caroteno y el perfil de absorción frente al tiempo observado (en ambos grupos), indica diferentes cinéticas de absorción para estos carotenoides (Kostic y cols, 1995; Van Vliet, 1996; Pateau y cols, 1997) y puede estar relacionado con la capacidad provitáminica A, estructura química y transferencia entre lipoproteínas para ambos carotenoides (Kübler y von Renersdorf, 1993; Pateau y cols, 1997; Parker, 1997).

La respuesta con luteína (en TRL y plasma) fue similar en ambos grupos mostrando un aumento continuo a lo largo del estudio lo que coincide con lo observado en suero por Kostic y cols (1995). Sin embargo, la respuesta con α -+ β -caroteno en TRL mostró un perfil a lo largo del tiempo distinto según los grupos. Los diabéticos mostraron un aumento constante durante las 8 horas mientras que los controles presentaron una curva de absorción más definida en el tiempo, retornando a valores próximos al basal al final del período de 8 horas. Aunque esta diferencia pudiera indicar una velocidad más lenta de absorción y/o incorporación en sangre de los carotenoides provitáminicos en los diabéticos, es posible que este perfil en el tiempo refleje el aclaramiento más lento de quilomicrones en sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente (Georgopoulos, 1994; Georgopoulos y Saudek, 1994).

Estos autores, utilizando ésteres de retinilo como marcador de lipoproteínas de origen intestinal, observaron un aumento de partículas de origen intestinal (correspondientes a quilomicrones residuales) hasta 10 horas en el periodo post-prandial (Georgopoulos y Saudek, 1994). Este efecto es independiente del control glucémico de la enfermedad y estaría relacionado con la vía de administración de insulina (subcutánea) provocando una mayor insulinemia periférica y una menor estimulación de receptores LDL o LRP hepáticos (Georgopoulos, 1994). Por otro lado, el comportamiento similar de ambos grupos en el estudio con luteína, podría deberse a la diferente cinética de absorción de este carotenoide, así como su posible transferencia a otras lipoproteínas que no reflejan directamente el metabolismo lipídico post-prandial (p.e. HDL).

La velocidad de absorción condiciona el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima así como la recuperación de niveles basales. Esto podría explicar, en parte, las mayores AUCs con menores C.máx observadas en fracciones TRL de diabéticos y hace probable que las AUC para α - $+$ β -caroteno y ésteres de retinilo en diabéticos estén subestimadas, lo que implicaría que estos sujetos presentan mayor absorción en comparación con los controles.

En plasma, las AUCs observadas durante el periodo 0-8 horas fueron diferentes a los encontrados en TRL. Sin embargo, hay que señalar que los niveles plasmáticos, incluso en el periodo 0-8 horas, no reflejan fenómenos de absorción y/o conversión a retinol (Van Vliet, 1996). Por otro lado, mientras las C.máx alcanzadas a las 24-48 horas para α -caroteno y luteína entre grupos coinciden con lo observado en los estudios de prevalencia, esto no ocurre con el β -caroteno. No obstante, las C.máx observadas a las 24-48 horas reflejan niveles alcanzados tras suplementación con dosis única y es posible que para el β -caroteno no sean totalmente comparables a los niveles alcanzados tras ingestas prolongadas (p.e. dieta habitual). Cabe señalar que las concentraciones séricas a las 24-48 horas tras la administración de cápsulas, indican el recambio hepático a través de las VLDL o múltiples compartimentos hepáticos (Parker, 1996a) y que los niveles plasmáticos reflejan variaciones en diferentes puntos del metabolismo de carotenoides - absorción intestinal, liberación y aclaramiento en plasma, distribución a tejidos y liberación de depósitos corporales- que puede ser diferente entre carotenoides (Jonhson y cols, 1997).

La respuesta en plasma se asoció con los niveles de triglicéridos en ayunas. Aunque en ambos estudios el protocolo seguido fue igual, la lipemia post-prandial en los diabéticos durante el estudio de α - $+$ β -caroteno fue baja debido a las AUC negativas en algunos sujetos. Así, al relacionar la AUC de α -, β -caroteno y ésteres de retinilo con el AUC para triglicéridos, esta relación fue superior en diabéticos mientras que ambos grupos se comportaron igual en el caso de luteína. Este hecho, junto con la presencia de respuesta de α -, β -caroteno y ésteres de retinilo en diabéticos incluso con lipemias "negativas", pudiera indicar una mayor eficacia de absorción de estos carotenoides en diabéticos.

En este sentido, el control de la glucemia puede ser un determinante de la mayor absorción de carotenoides provitamínicos, posiblemente, a través de su repercusión sobre el metabolismo lipídico post-prandial (Georgopoulos, 1994; Georgopoulos y Saudek, 1994), coincidiendo con lo observado en diabéticos con un mal control de la enfermedad (Head, 1921; Rabinowitch, 1930; Mosenthal, 1941; Cohen, 1958; Emerson, 1966). Sin embargo, los menores niveles de retinol, en el grupo de diabéticos evaluado, no parecen estar relacionados con el control glucémico ni deberse a una alteración en la conversión a retinol de carotenoides (Ralli, 1935; Murrill y cols, 1941; Hoerer y cols, 1974; Krill y cols, 1997) sino, posiblemente, asociados a factores genéticos (Krill y cols, 1997) y a fenómenos de transporte y/o eliminación (Basu y cols, 1989; Gebre-Medhin y cols, 1985; Catalano y cols, 1993; Dubrey y cols, 1997).

Por último, la biodisponibilidad de algunos carotenoides implica tanto su absorción como su conversión a retinol (Parker, 1997). En conjunto, los resultados sugieren posibles diferencias en la absorción de carotenoides provitamínicos pero no en su conversión a retinol o en carotenoides sin actividad provitamínica A. El diferente comportamiento de los diabéticos pudiera indicar una diferente biodisponibilidad de carotenoides con o sin actividad provitamínica A respecto a los controles, coincidiendo con lo reflejado en los estudios descriptivos. Aunque el número de sujetos es comparable al de otros estudios de biodisponibilidad, la gran variabilidad observada y el reducido número de sujetos por grupo hace que estos resultados deban considerarse como tentativos y pendientes de confirmación en un número mayor de sujetos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Los sujetos con diabetes mellitus insulino-dependiente presentan un perfil de carotenoides en suero cualitativamente igual que los sujetos control. De forma cuantitativa, presentan mayores niveles de carotenoides provitaminicos (α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina) e iguales de no-provitaminicos (luteína, zeaxantina y licopeno).
- 2.- Las diferencias en el perfil de carotenoides entre grupos no se deben a variabilidad analítica o sesgo en el muestreo sino, más bien, relacionadas con patrones dietéticos distintos.
- 3.- El cuestionario de frecuencias semicuantitativo diseñado es útil para clasificar sujetos en rangos extremos de ingesta y en distintas épocas del año. La mayor correlación entre ingesta y niveles séricos de carotenoides en diabéticos puede estar en relación con la mayor fiabilidad de las respuestas así como con una mayor biodisponibilidad en estos sujetos.
- 4.- La diabetes insulino-dependiente no modifica la tasa de aclaramiento de carotenoides y/o el recambio de carotenoides de depósitos corporales ni la vida media en suero, aunque estos sujetos parecen presentar una mayor eficacia de absorción de carotenoides con actividad provitaminica A, posiblemente, en relación con el control de la glucemia.
- 5.- La diabetes mellitus insulino-dependiente constituye un factor de riesgo para un status sérico marginal (pero no deficiente) de retinol, especialmente, en mujeres. Este hecho no se debe a un menor aporte en la dieta ni a una alteración en la capacidad de conversión de carotenoides provitaminicos a retinol sino, posiblemente, relacionado con fenómenos de transporte y/o eliminación.

6.- La normalización de los parámetros de control glucémico, tiempo de evolución de la enfermedad y presencia de retinopatía no modifican el status sérico de retinol.

7.- La diabetes mellitus insulino-dependiente no parece ser un determinante de indicadores del status sérico de vitamina E (relación α -tocoferol/colesterol) y no constituye un factor de riesgo para un status bajo de vitamina E.

8.- La mayor frecuencia de status sérico marginal de retinol en diabéticos puede estar relacionado con una mayor prevalencia y severidad de infecciones en este grupo.

9.- Las concentraciones de carotenoides y la relación α -toc./col. observada en diabéticos, como parte del status sérico de antioxidantes, no apoyan la hipótesis de un status antioxidante liposoluble bajo en estos sujetos.

10.- En base a estos resultados, la utilización de algunos de estos compuestos en la prevención de las complicaciones a largo plazo de la diabetes parece, cuando menos, prematura. Cabe señalar, sin embargo, que los niveles séricos de estos compuestos pueden no reflejar de forma fiable la situación en tejidos y que, tanto la hiper- como hipoglucemia en estos sujetos, puede modificar la actividad de estos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

ADA (American Diabetes Association): "Office guide to diagnosis and clasification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance" (Position Statement). Diabetes Care, 19 (Suppl. 1):S4-S7, 1996a.

ADA (American Diabetes Association): "Implications of the Diabetes Control and Complications Trial" (Position Statement). Diabetes Care 19 (Suppl. 1): S50-S52, 1996b.

ADA (American Diabetes Association): "Standards of medical care for patients with diabetes mellitus" (Position Statement). Diabetes Care 19 (Suppl. 1): S8-S15, 1996c.

ADA (American Diabetes Association): "Clinical Practice Recommendations 1997. Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus". Diabetes Care 19, suppl.1.; s16-s19, 1997.

Ahmed, C; Leo, M.A; Lieber, C.S: "Interactions between alcohol and β -carotene in patients with alcoholic liver disease". Am. J. Clin. Nutr., 60: 430-436, 1994.

Alberti-Fidanza, A; Porrini, M:" Improved Methods for dietary Appraisal". Bibl. Nutr. Dieta, 51: 49-52, 1994.

Anderson, J.W; Ferguson, S.K; Karaunos, D., et al : " Mineral and vitamin status on high-fiber diets: Long-term studies of diabetic patients". Diabetes Care 3, (1): 38-40, 1980

Aranceta, J; Pérez, C; Amela, C, et al: " Encuesta de Nutrición de la Comunidad de Madrid". Dirección General de Prevención y Promoción de la Salud. Comunidad de Madrid. Consejería de Salud. 1994.

Ascherio, A; Stampfer, M; Colditz, GA; et al : "Correlations of vitamin A and E intakes with plasma concentrations of carotenoids and tocopherols among American men and women. J.Nutr. 122: 1792-1801, 1992.

ATBC (α -tocopherol, β -carotene) Cancer Prevention Study Group. "The effect of vitamin E and β -carotene in the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers". N. Engl. J. Med., 330; 1029-35. 1994.

Azzi, A; Boscoboinik, D; Marilley, D, et al : "Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl.): 1337S-1347S, 1995.

Baker, DW; Campbell, RK. "Vitamin and mineral supplementation in patients with diabetes mellitus". Diabetes Educ. 18(5), 420-427, 1992.

Baker, H; Handelman, G.J; Short, S et al: "Comparison of plasma α - and γ -tocopherol levels following chronic oral administration of either all-rac- α -tocopheryl acetate or RRR- α -tocopheryl acetate in normal adult male subjects". Am. J. Clin. Nutr., 43: 382-387, 1986.

Basu, T.K; Tze, W.J.; Leichter, J. Serum vitamin A and retinol-binding protein in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Am.J.Clin.Nutr. 50; 329-331, 1989.

Basu, T,K; Basualdo, C:"Vitamin A homeostasis and Diabetes medllitus". Nutrition, 13 (9): 804-806, 1997.

Bauerfeind, J.D.(Ed):"Carotenoids as colorants and vitamin A precursors". Academic Press. Gainesville (Florida). 1981.

Behrens, WA; Madere, R:" α - and γ -tocopherol concentrations in human plasma". J. Am. Coll. Nutr., 5; 91-96. 1986.

Bendich, A; Machlin, L.W; "The safety of β -carotene". Nutr, Cancer 11: 207-214, 1988.

Bendich, A; Olson, J.A: "Biological actions of carotenoids". FASEB J. 3: 1927-1932, 1989.

Bertram, J.S.:"The chemoprevention of cancer by dietary carotenoids: Studies in mouse and human cells". Pure Appl. Chem., 66:1025-1032, 1994.

Bertram, J.S; Bortkiewicz, H:" Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells". Am. J. Clin. Nutr., 62 (suppl) 1327S-1337S, 1995.

Bertram, J.S; King, T; Bortkiewicz, H, et al:" Dietary carotenoids and their metabolites as potential cancer preventive agents". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 88 (abstract) ,1996.

Bieri, J.G; Brown, E.D; Smitt, J.C:" Determination of individual carotenoids in human plasma by HPLC". J. Liquid Chromatog., 8: 473-484, 1985.

Biesalski, H.K:" Antioxidative vitamine in der Praventio". Dtsch. Arztenblatt 92: A1316-1321, 1995.(citado en Traber y Sies, 1996)

Biesalski, H. K:"Bioavailability of vitamin A". Eur. J. Clin. Nutr., 51 (Suppl. 1): S71-S75, 1997.

Block, G:"Nutrient sources of provitamin A carotenoids in the American diet". Am. J. Epidemiol., 139:290-293, 1994.

Bloemberg, B.P.M; Kromhout, D; Obermann-De Boer, G.L, et al:"The reproducibility of dietary intake data assessed with the cross-check history method". Am. J. Epidemiol., 130: 1047-1056, 1989.

Blomhoff, R; Green, M.H; Norum, K.R:"Vitamin A: Physiological, and biochemical processing". Ann. Rev. Nutr., 12: 37-59, 1992.

Blomhoff, R:"Overview of vitamin A metabolism and function". In: Vitamin A in health and disease. R. (Ed). Marcel Dekker, New York. pp: 1-37, 1994.

Blomstrand, R; Werner, B:" Studies on intestinal absorption of radioactive β -carotene and vitamin A in man". Scand. J. Clin. Lab. Inves., 19: 339-345, 1967.

Bloomgarden, Z.T : "Antioxidants and Diabetes". Diabetes Care 20: 670-673, 1997.

Blot, W.J; Li, J.Y; Taylor, P.R, et al:" Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population". J. Natl. Cancer Inst., 85: 1483-1492, 1993.

Boeck, W.C; Yater, W.M. "Xanthemia and xanthosis (carotinemia): A clinical study". J.Lab.Clin.Med. 14; 1129-1143, 1929.

Bone, R.A; Landrum, J.T: "Distribution of macular pigments, zeaxanthin and lutein, in human retina". Methods Enzymol., 213: 360-366, 1992.

Borel, P; Dubois, C; Mekki, N., et al: "Dietary triglycerides, up to 40g/meal, do not affect preformed vitamin A bioavailability in humans". Eur. J. Clin. Nutr., 51: 717-722, 1997.

Bowen, PE; Mobarhan, S; Henderson, H., et al: "Hipocarotenemia in patients fed with comercial liquid diets". J.P.E.N., 12, 484-89. 1988.

Bowen, P.E; Mobarhan, S; Smith, J.C. Jr:" Carotenoid absorption in humans". Methods Enzymol., 214: 3-16, 1993.

Brady, W.E; Mares-Perlman, J.A; Bowe, P, et al: "Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors". J. Nutr., 126: 129-137, 1996.

Britton, G:"UV/VIS Spectroscopy". In: Carotenoids. Vol. 1B. Spectroscopy. Britton, G; Liaaen-Jensen, S; Pfander, H (Eds). Birkhauser, Basel. 1995.

Brown, ED; Micozzi, MS; Craft, NE et al: "Plasma carotenoids in normal men after a single ingestion of vegetables or purified β -carotene . Am. J. Clin. Nutr., 49:339-45, 1989.

Brownlee, M: "Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications". *Diabetes Care*, 15: 1835-1843, 1992.

Brubacher, G,B; Weiser, H: "The vitamin A activity of β -carotene". *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 55: 5-15, 1985.

Bunce, G.E; Kiroshita, J; Horwitz, J: "Nutritional factors in cataracts". *Ann. Rev. Nutr.*, 10, 233-254. 1990.

Burton, G.W; Traber, M.G: "Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability". *Ann. Rev. Nutr.*, 10: 357-382, 1990.

Byers, T; Marshall, J; Fiedler, R, et al: "Assessing nutrient intake with an abbreviated dietary interview". *Am. J. Epidemiol.*, 122: 41-50, 1985.

Carsky, J; Durackovaz, Z; Muchová, J, et al: "Antioxidative enzymes in polymorphonuclear leukocytes and Diabetes Mellitus". *International Symposium on Antioxidants and Disease Prevention: Biochemical, Nutritional and Pharmacologic Aspects. Stockolm (Sweden), 30 Junio- 3 Julio, 1993.*

Carughi, A; Harper, F.G: "Plasma carotenoid concentrations before and after supplementation with a carotenoid mixture". *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 896-899, 1994.

Catalano, C; Winocour, P.H.; Gillespie, S., et al: "Effect of posture and acute glycaemic control on the excretion of retinol-binding protein in normoalbuminuric insulin-dependent diabetic patients". *Clinical Science* 84; 461-467, 1993.

Caye-Vaugien, C; Krempf, M; Lamarche, P., et al: "Determination of alpha-tocopherol in plasma, platelets and erythrocytes of type I and type II diabetics patients by HPLC". *Internat. J.Vit.Nutr.Res.* 60, 324-330, 1990.

Ceriello, A; Giugliano, D; Quatraro, A., et al: "Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications?". *Diabetes Care*, 14; 68-72, 1991.

Chug-Ahuja, J.K; Holden, J.M; Forman, M.R, et al: "The development and application of a carotenoid database for fruits, vegetables and selected multicomponent foods". *J. Am. Diet. Assoc.*, 93: 318-323, 1993.

Clevidence, B.A; Bieri, J.G: "Association of carotenoids with human plasma lipoproteins". *Methods Enzymol.*, 214: 33-46, 1993.

Coates,RJ; Eley, JW; Block, G et al: "An evaluation of a food frequency questionnaire for assessing dietary intake of spscific carotenoids and vitamin E among Black women". *Am. J. Epidemiol.*, 134; 658-71. 1991.

Cohen, L: "Observations on carotenemia". *Ann. Int. Med.*, 48 (2): 219-227, 1958.

Cohn, W: "Bioavailability of vitamin E". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51 (Suppl. 1): S80-S85, 1997.

Collette, C, Pares-Herbute, N; Monnier, L.H, et al: "Platelet function in type I diabetes: Effects of supplementation with large doses of vitamin E". *Am. J. Clin. Nutr.*, 47: 256-261, 1988.

Craft, N.E; Brown, E.D; Smith, J.C: "Effects of storage and handling conditions on concentrations of individual carotenoids, retinol and tocopherol in plasma". *Clin. Chem.*, 34: 44-48, 1988.

Craft, N.E: "Antidote for on-column losses of carotenoids". *Carotenoid News*, 3: 4, 1993.

Davie, S.J; Gould, B.J; Yudkin, J.S: "Effect of vitamin C on glycosylation of proteins". *Diabetes* 41: 167-173, 1992.

DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) Research Group: "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus". *N. Eng. J. Med.*, 329: 977-986, 1993.

De Pee, S; West, C.E: "Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: A review of literature". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50 (Suppl. 3): 38S-54S, 1996.

De Pee, S; Yuniar, Y; West, C. E. et al : "Evaluation of biochemical indicators of vitamin A status in breast-feeding and non-breast-feeding Indonesian women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 66:160-167, 1997.

De Ritter, R; Purcell, A.E; In: "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors". Bauerfeind, J.C (ed). Academic Press. London: pp 883-916, 1981.

Dimitrov, N.Y; Meyer, C; Ulley, D.E, et al: "Bioavailability of β -carotene in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 48: 298-304, 1988.

Dimitrov, N.D; Ulley, D.E: "Bioavailability of carotenoids". In: *Carotenoids: Chemistry and biology*. Krinsky, N.I; Mathews-Roth, M; Taylor, R.F (Eds). Plenum Press, New York. pp269-279, 1989.

Diplock, AT. "Optimal intake of antioxidant vitamins and carotenoids for disease prevention". *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 63, pp 322 (abstract), 1993.

Drewnowski, A; Rock, C.L; Henderson, S.A, et al: "Serum β -carotene and vitamin C as biomarkers of vegetable and fruit intakes in a community-based sample of French adults". *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 1796-1802, 1997.

Dubrey, S.W.; Beetham, R; Miles, J; Noble, M.I.M; Rowe, R; Leslie, R.D.G. Increased urinary albumin and retinol-binding protein in type I diabetes. *Diabetes Care*, 20(1); 84-89, 1997.

El-Gorab, M.I; Underwood, B.A; Loerch, J.D:" The roles of bile salts in the uptake of β -carotene and retinol by rat everted gut sacs". *Biochim. Biophys. Acta* 401: 265-277, 1975.

Emerson, K: "Trastorno del metabolismo de los pigmentos". En: *Medicina Interna*. Harrison T.R. (Ed). La Prensa Médica Mexicana. México. 1966.

Erdman, J.W; Bierer, T.L.; Gugger, E.T. "Absorption and transport of carotenoids. In: "Carotenoids in human health". *Ann. New York Acad. Sci.* vol.691, pp. 76-85, 1993.

Farrè, R; Ruiz, C; Alegria, A., et al.: "Trace elements and antioxidant metalloenzymes in patients with type I diabetes". (Abs.) VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research. p. 194. Barcelona (Spain), October 1-5, 1996.

Fauré, P; Corticelli, P; Richard, M.J, et al: "Lipid peroxidation and trace elements in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy". *Clin. Chem.*, 39/5: 789-793, 1993.

Fauré, P; Benhamou, P.Y; Perard, A., et al:"Lipid peroxidation in insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: effects of an oral zinc supplementation". *Eur.J.Clin.Nutr.* 49; 282-288, 1995.

Fernández-Bañares, F; Giné, J.J.; Cabré, E., et al: "Factors associated with low values of biochemical vitamin parameters in healthy subjects". *Internat. J.Vit.Nutr.Res.*, 63; 68-74, 1993.

Fidanza, F:"Nutritional status assessment in perspective". *Bibl. Nutr, Dieta*, 51:9-18, 1994.

Fielding, B.A; Callow, J; Owen, R., et al: "Postprandial lipemia: The origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals". *Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 36-41, 1996.

Flagg, E; Slaton, A.E; Sowell, A.L; et al: "Asociations between body weight and serum levels of carotenoids among participants in the Reno diet heart study". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 66 (abstract) , 1996.

Food and Nutrition Board. "Raciones Dietéticas Recomendadas". 10th ed. Washington, DC: National Academy Press. Edición en español. 1991.

Forman, MR; Lanza, E; Yong, LCh, et al: "The correlation between two dietary assessments of carotenoid intake and plasma carotenoid concentrations: Application of a carotenoid food-composition database". Am. J. Clin. Nutr., 58:519-24, 1993.

Forman, M.R; Beecher, G; Muesing, R, et al: "The fluctuation of plasma carotenoid concentrations by phase of the menstrual cycle. A controlled diet study". Am. J. Clin. Nutr., 64: 559-565, 1996.

Freudenheim, JO.L; Jonhson, N.E; Wardrop, R : "Misclassification of nutrient intake of individuals and groups using one-, two-, three- and seven-day records". Am. J. Epidemiol., 126 (4): 703-713, 1987.

Fuller, C.J; Parker, R.S; Spielman, A., et al: "Carotenoid-depletion diet for use in long-term studies". J. Am. Diet. Assoc., 93:812-814, 1993.

Fuller, C.J; Chandalia, M; Garag, A, et al: " RRR- α -tocopheryl acetate supplementation at pharmacologic doses decreases LDL oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus". Am. J. Clin. Nutr., 63: 753-759, 1996.

Gaby, Sk; Bendich, A; Singh, VN., et al: "Vitamin intake and health. A scientific review". Marcel Dekker, Ind. New York, pp.10, 1991.

Garewall, H: "Antioxidants in oral cancer prevention". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl.): 1403S-1417S, 1995.

Garrow, J.S: "Validation of methods for estimating habitual diet: Proposed guidelines". Eur. J. Clin. Nutr., 49:231-232, 1995.

Gartner, Ch; Stahl, W; Sies, H: " Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to β -carotene in the human". Int. J. Vit. Nutr. Res., 66: 119-125, 1996.

Gartner, Ch; Stahl, W; Sies, H : "Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes". Am. J. Clin. Nutr., 66: 116-122, 1997.

Gaziano, JM; Hennekens, Ch: "The role of β -carotene in the prevention of cardiovascular disease". Ann.N. Y. Acad. Sci., 691:148-156, 1993.

Gaziano, J.M; Johnson, E.J; Russell, R. M, et al: " Discrimination in absorption or transport of β -carotene isomers afetr oral supplementation with either all-trans- or 9-cis- β -carotene". Am. J. Clin. Nutr., 61: 1248-1252, 1995.

Gebre-Medhin, M; Ewald, U; Tuvemo, T: "Reduced serum proteins in diabetic children on a twice-daily insulin schedule". Acta Paediatr Scand 74; 961-965, 1985.

Georgopoulos, A: "Are chylomicrons remnants involved in the atherogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus?". J. Lab. Clin. Med., 123: 640-646, 1994.

Georgopoulos, A; Saudek, C.D: "Intraperitoneal insulin delivery decreases the levels of chylomicron remnants in patients with IDDM". Diabetes Care 17 (11): 1295-1299, 1994.

Gerster, H: "Antioxidants vitamins in cataract prevention". Z. Ernährungswiss, 28; 56-75. 1989.

Gerster, H: "Potential role of beta-carotene in the Prevention of cardiovascular Disease". Internat. J. Vit. Nutr. Res., 61; 277-291, 1992.

Gey, F; Brubacher, GB; Stahelin, HB: " Plasma levels of antioxidants vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer". AM. J. Clin. Nutr., 45; 1368-77. 1987.

Gey, K.F: "Optimum plasma levels of antioxidants micronutrients". Bibl. Nutr. Dieta, 51:84-99, 1994.

Gisinger, C; Jeremy, J; Speiser, P., et al: "Effect of vitamin E supplementation on platelet thromboxane A2 production in type I diabetic patients. Double-blind crossover trial". Diabetes, 37; 1260-1264, 1988.

Giugliano, D; Ceriello, A; Paolisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. Diabetes Care 19(3), 257-267, 1996.

Glover, J: "The conversion of β -carotene into vitamin A". Vitam. Horm.(USA) 18: 371-386, 1960.

Goldbohm, R.A; van't Veer, P; van den Brandt, P.A, et al: "Reproducibility of a food frequency questionnaire and stability of dietary habits determined from five annually repeated measurements". Eur. J. Clin. Nutr., 49: 420-429, 1995.

Goodman, D.S; Blomstrand, R; Werner, , B, et al: " The intestinal absorption and metabolism of β -carotene in man". J. Clin. Invest., 45: 1615-1623, 1966.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I., et al: "An improved HPLC method for the separation of fourteen carotenoids, including 15-/13- and 9-cis-a-carotene isomers, phytoene and phytofluene". J. Liq Chromatogr 14(13), 2457-2475, 1991.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I., et al: "Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables". J. Agric. Food Chem 40, 2135-2140, 1992.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I., et al: "Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet". *Eur.J.Clin.Nutr.* 50(4); 246-250, 1996.

Granado, F; Olmedilla, B; Blanco, I., et al: "Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: A user's point of view". *Crit. Rev. Food Sci. & Nutr.* 37(7): 621-633, 1997.

Gouterman, I.H; Sibrack, L.A: "Cutaneous manifestations of diabetes". *Cutis* 25: 45-63, 1980.

Green, M.H; Green, J.B: "Dynamics and control of plasma retinol". In: *Vitamin A in health and disease*. R. (Ed). Marcel Dekker, New York. pp: 119-135, 1994.

Griesmacher, A; Kindhauser, M; Andert, S.E, et al: "Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus". *Am. J. Med.*, 98: 469-475, 1995.

Griffiths, A.J; Humphreys, S.M; Clark, M.L., et al: "Immediate metabolic availability of dietary fat in combination with carbohydrates". *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 53-59, 1994.

Handelman, GJ; Epstein, WL; Peerson, J., et al: "Human adipose α -tocopherol and γ -tocopherol kinetics during and after 1-y of α -tocopherol supplementation". *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 1025-32. 1994.

Handelman, G.J; Packer, L; Cross, C.E: "Destruction of tocopherols, carotenoids and retinol in human plasma by cigarette smoke". *Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 559-565, 1996.

Haller, J; Weggemans R,M; Lammi-Keefe, C.J., et al (SENECA Investigators): "Changes in the vitamins status of the elderly Europeans: Plasma vitamins A, E, B6, B12, folic acid and carotenoids". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50 (Suppl.): S32-S46, 1996.

Hallfrisch, J; Muller, D.C; Singh, V.N. Vitamin A and E intakes and plasma concentrations of retinol, β -carotene, and α -tocopherol in men and women of the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Am.J.Clin.Nutr.*, 60: 176-182, 1994.

Haraldsdóttir, J: "Minimizing errors in the field: Quality control in dietary surveys". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 47 (Suppl. 2): S19-S25, 1993.

Hart, D.J; Scott, J, K: "Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the U.K". *Food Chem.*, 54: 101-111, 1995.

Hathcock, J.N: "Vitamins and minerals: Efficacy and safety". *Am. J. Clin. Nutr.*, 66:427-437, 1997.

Haskell, M.J; Handelman, G.J; Peerson, J.M. et al: "Assessment of vitamin A status by the deuterated-retinol-dilution technique and comparison with hepatic vitamin A concentration in Bangladeshi surgical patients". *Am. J. Clin. Nutr.*, 66: 67-74, 1997.

Head, G.D: "Carotenemia". *Arch. Int. med.*, 28: 268-273, 1921.

Henderson, CT; Mobarhan, S; Bowen, P et al: "Normal serum response to oral β -carotene in humans". *J. Am. Coll. Nutr.*, 8:625-35, 1989.

Hendricks, H.F.J:"Retinoid (vitamin A) metabolism". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50 (Suppl. 3): 5S-7S, 1996.

Hennekens, C:"Lack of effect of long-term supplementation with β -carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 55 (abstract) , 1996.

Hercberg, S; Preziosi, P; Galan, P, et al:" Vitamin status of a healthy French population: dietary intakes and biochemical markers". *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 64: 220-232, 1994.

Heymann, W. Carotenemia in diabetes. *J.A.M.A.* 106; 2050-2052, 1936.

Hoerer, E; Dreyfuss, F; Herzberg, A: "Carotenoids, skin colour and diabetes mellitus". *Acta Diabet. Lat.*, 12: 202-207, 1974.

Hollander, D; Ruble, P.E. Jr:" β -carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport". *Am. J. Physiol.*, 235: E686-E691, 1978.

Holler, C; Ulberth, F; Osterode, W., et al: "Selenium-status and serum levels of the antioxidant vitamins all-trans retinol, ascorbic acid and α -tocopherol in diabetic patients with and without retinopathy". Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability. U. Schlemmer (Ed). Bundesforschungsanstalt für Ernährung: pp 235-238, 1993.

Hoppe, P.P; Paust, J; Luddecke, E; Brode, E et al:" Deuterium-labeled β -carotene as a tool to measure β -carotene bioavailability and vitamin A formation in humans". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 37 (abstract) , 1996.

Horton, E.S; Napoli, R: " Diabetes mellitus". Chapter 44. In: *Present knowledge in nutrition*". 7th Ed. E. E. Ziegler, L.J. Filer (eds). ILSI Press, Washington, D.C. 1996.

Hunter, D.J; Willet, W:" Vitamin A and cancer : Epidemiological evidence in humans". In: *Vitamin A in health and disease*. R. (Ed). Marcel Dekker, New York. pp: 561-585, 1994.

Hymans van den Bergh and Snapper: Die Farbstoff des Blutserums, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 110:540, 1913 (citado en Head y Johnson, 1921).

Hymans van den Bergh and Müller, P: Das lipochrome Pigment in Blutserum und Organen, Xanthosis, Hyperlipochromämie, Biochem. Ztschr. 108: 279 (May), 1920. (citado en Head y Johnson, 1921).

INE (Instituto Nacional de Estadística): La Nutrición en España". INE. Madrid. 1985.

INE (Instituto Nacional de Estadística): "Encuesta de Presupuestos Familiares 1990-1991". Vol. 2. Madrid: INE, 1994.

Isler, O (Ed): "Carotenoids". Birkhauser. Basel. 1971.

Ito, Y; Ochiai, J; Sasaki, R, et al: "Serum concentrations of carotenoids, retinol and α -tocopherol in healthy persons determined by high performance liquid chromatography". Clin, Chim. Acta, 194:131-144, 1990.

Jacques, PF; Hartz, SC; Chylack LT et al: "Nutritional status in persons with and without cataracts: Blood vitamin and mineral status". Am. J. Clin. Nutr., 48:152- , 1988.

Jacques, P.F; Sulsky, S.I; Sadowski, J.A: " Comparison of micronutrient intake measured by a dietary questionnaire and biochemical indicators of micronutrient status". Am. J. Clin. Nutr., 57: 182-189, 1993.

Jarvinen, R; Knekt, P; Seppanen, R, et al: " Dietary determinants of serum β -carotene and serum retinol". Eur. J. Clin. Nutr., 47: 31-41, 1993.

Jarvinen, R: " Epidemiological follow-up study on dietary antioxidants vitamins". (Tesis Doctoral). The Social Insurance Institution. Finland. Studies in Social Security and Health 11. 1996.

Johnson, EJ; Russell, RM: "Distribution of orally administered β -carotene among lipoproteins in healthy men". Am. J. Clin. Nutr., 56:128-35, 1992.

Johnson, E.J; Qin, J; Krinsky, N.I., et al: "Ingestion by men of a combined dose of β -carotene and lycopene does not affect the absorption of β -carotene but improves that of lycopene". J. Nutr., 127: 1833-1837. 1997.

Johnson, E.J; Quin, J; Krinsky N.I., et al: " Ingestion by men of a combined dose of β -carotene and lycopene does not affect the absorption of β -carotene but improves that of lycopene" J. Nutr., 127: 1833-1837, 1997.

Kähler, W; Kuklinski, B; Rühlmann, C., et al: "Diabetes mellitus - eine mit Freien Radikalen assoziierte Erkrankung. Resultate einer adjuvanten antioxidantiensupplementation". *Innere Medizin*, 48; 223-232, 1993.

Kaplan, LA; Lau, JM; Stein, EA: "Carotenoid composition, concentrations and relationships in various human organs". *Clin. Physiol. Biochem.*, 8:1-10, 1990.

Kardinal, AA.F.M; van't Veer, P; Brants, H.A.M , et al: "Relation between antioxidant vitamins in adipose tissue, plasma and diet". *Am J. Epidemiol.*, 141: 440-450, 1995.

Karpen, C.W; Cataland, S; O'Dorisio, T.M. et al: "Production of 12-hydroxy-eicosapentaenoic acid and vitamin E status in platelets from type I human diabetic patients". *Diabetes*, 34: 526-531, 1985.

Kawamura, M; Heinecke, J.W; Chait, A: "Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway". *J.Clin. Invest.* 94; 771-778, 1994.

Kayden, HJ; Traber, MG: "Absorption, lipoprotein transport and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans". *J.Lipid Res.*, 34; 343-58. 1993.

Keller, H.E; Salked, R.M.: "Bereichswerte von Analysenparametern für den Vitaminstatus". *ROCHE Report No. B-106 334*. 1988.

Khachik, F; Beecher, GR; Goli, MB. Et al: "Separation, identification and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography". *Pure Appl.Chem.* 63, 71-80, 1991.

Khachick, F; Beecher, G; Goli, M.B, et al: "Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma". *Anal. Chem.*, 64: 2111-2122, 1992.

Khachick, F; Beecher, G. R; Cecil Smith, J: "Lutein, lycopene and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer". *J. Cel. Biochem.*, (suppl) 22: 236-246, 1995a.

Khachick, F; Englert, G; Beecher, , et al: "Isolation, structural elucidation and partial synthesis of lutein dehydration products in extracts of human plasma". *J. Chromatog. B*, 670: 219-233, 1995b.

Khachick, F; Spangler, C.J; Cecil Smith, J., et al: "Identification, Quantification and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum". *Anal. Che.*, 69: 1873-1881, 1997.

Kimble, M.S; Germek, O.A; Sevringhaus, E.L. "Vitamin A and carotene metabolism in the diabetic as reflected by blood levels". Am.J.Med.Sci 212; 574-585, 1946.

Knekt, P; "Epidemiology of vitamin E: evidence for anticancer effects in humans". In: Packer, L, Fuchs, J (eds). Vitamin E in Health and Disease. New York, NY: Marcel Dekker. pp 513-527. 1993.

Kohlmeier, L; Hastings, S.B:" Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl.): 1370S-1377S, 1995.

Kostic, D; White, W. S; Olson, J.A:" Intestinal absorption. serum clearance and interactions between lutein and β -carotene when administered to human adults in separate or combined oral dosis". Am. J. Clin. Nutr., 62: 604-610, 1995.

Krall, L.P; Zorrilla, E: "Disorders of the skin in diabetes". En: "Joslin's Diabetes mellitus". Marble, A; White, P; Bradley, R.F; Krall, L.P (Eds). Lea & Febiger. Philadelphia (1971).

Krempf, M; Ranganathan, S; Ritz, P., et al: "Plasma vitamin A and E in type I (insulin-dependent) and type II (non-insulin-dependent) adult diabetic patients". Internat. J. Vit. Nutr. Res. 61; 38-42, 1991.

Krill, D; Oleary, L; Koehler, A.N., et al: "Association of retinol binding protein in multiple-case families with insulin-dependent diabetes". Human Biology, 69 (1): 89-96, 1997.

Krinsky, N.I; Cornwell, D.G; Oncley, J.L : "The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma". Arch. Biochem. Biophys., 73: 233-246, 1958.

Krinsky, N.I:"The biological properties of carotenoids". Pure Appl. Chem., 66: 1003-1010, 1994.

Kübler, W: "Pharmacokinetic implications of single and repeated dosage". In: Walter, P, Stahelin, H and Brübacher, G (Eds). Elevated dosages of vitamins. Toronto: Hans Huber Publisher, pp: 25-34, 1989.

Kübler, W; Von Renersdorf, D:" The dose dependency of plasma carotenoids. Biokinetic in men". In: Bioavailability 93: Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient bioavailability. U. Schlemmer (Ed). Bundesforschungsanstalt für Ernährung: pp 331-336, 1993.

Kunisaki, M; Umeda, F; Yamauchi, T., et al: "High glucose reduces specific binding for D- α -tocopherol in cultured aortic endothelial cells". Diabetes 42; 1138-1146, 1993.

Kushi, L.H.: " Gaps in epidemiologic research methods: Design considerations for studies that use food-frequency questionnaires". Am. J. Clin. Nutr., 59 (Suppl.): 180S-184S, 1994.

Lecomte, R; Grolier, P; Herceth, B, et al: " The relation of alcohol consumption to serum carotenoid and retinol levels. Effects of withdrawal." Int. J. Vit. Nutr. Res.: 64: 170-175, 1994.

Le Marchand, L; Yoshizawa, C.N; Kolonel, L.N, et al: " Vegetable consumption and lung cancer risk: A population-based case-control study in Hawaii". J. Natl. Cancer Inst., 81: 1158-1164, 1989.

Leo, M.A; Kim, C.I; Lieber, C.S: "Interaction of ethanol with β -carotene: delayed blood clearance and enhanced hepatotoxicity". Hepatology, 15: 883-891, 1992.

Leo, M.A; Ahmed, A; Aleynik, S.I, et al: " Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions". J. Hepatol., 23: 550-556, 1995.

Levin, A; Sturzenbecker, L; Kazmer, S, et al: " 9-cis-retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alfa". Nature 355:359-361, 1992.

Levy, J; Karas, M; Amir, H, et al: " Lycopene inhibits cancer cell proliferation by delaying cell cycle progression in G1 phase". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 93 (abstract) ,1996.

Lewis, J; Pian, P.H.A; Baer, M.T, et al: " Effect of long-term ingestion of polyunsaturated fat, age, plasma cholesterol, diabetes mellitus and supplemental tocopherol upon plasma tocopherol". Am. J. Clin., Nutr., 26: 136-143, 1973.

Li, J-Y; Taylor, P.R; Dawsey, S, et al: " Nutrition intervention trials in Linxian, China: Multiple vitamin/mineral supplementation, cancer incidence and disease-specific mortality among adults with esophageal cancer". J. Natl. Cancer Inst., 85 (18): 1492-1498, 1993.

Machlin, L.J: "Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects". ed. L.J. Machlin. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 1984.

Machlin, L.J: "Vitamin A". In: Machlin, L.J.(ed): Handbook of vitamins, 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker. pp 1-43, 1991.

Machlin, L.J: "Vitamin E". In: Machlin, L.J.(ed): Handbook of vitamins, 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker. pp 99-144, 1991.

Maiani, G; Raguzzini, A; Mobarhan, S, et al: " Vitamin A". Int. J. Vit. Nutr. Res., 63: 252-257, 1993.

Mangelsdorf, D.S; Ong, E.S; Dyck, J.A, et al: "Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway". Nature 345: 224-229, 1990.

Mangelsdorf, D.J; Umesono, K, Evans, R.M : "The retinoids receptors". In: The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. Sporn, M.B; Roberts, A.B; Goodman, D.S (Eds). Raven Press (2nd Ed.), New York: pp 319-349, 1994.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación): Dirección General de Política Alimentaria: "Consumo Alimentario en España 1987". Madrid. MAPA. 1988.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Secretaria General de Alimentación: "LA Alimentación en España 1992". Madrid: MAPA, 1993.

Martinoli, L; Di Felice, M; Seghieri, G., et al: "Plasma retinol and α -tocopherol concentrations in insulin-dependent diabetes mellitus: Their relationship to microvascular complications". Int. J. Vit. Nutr. Res., 63: 87-92, 1993.

Masaki, K; Doi, T, Yuge, K, et al: "Plasma β -carotene response to intake of β -carotene drink in normal men". Ann. N.Y. Acad. Sci., 691: 290-293, 1993.

Mayne, S.T; Handelman, G.J; Beecher, G: " β -carotene and lung cancer prevention in heavy smokers- a plausible relationship?". J. Natl. Cancer. Inst., 88 (21): 513-515, 1996.

McCauley Chapman, K; Prabhudesai, M; et al: "Vitamin A status of alcoholics upon admission and after two weeks of hospitalization". J. Am. Coll. Nutr., 12: 77-83, 1993.

Merck Index: Windholz, M; Budavari, E; Blumetti, R.F; Otterbein, E.O. 1983.

Meydani, S.N; Tengerdy, R.P: "Vitamin E and immune response". In: Vitamin E in Health and Disease. Packer, L, Fuchs, J (eds). Marcel Dekker. New York: pp 549-563, 1993.

MERCASA Empresa Nacional: Informe Anual, 1993. Madrid: MERCASA, E.N.1993.

Micozzi, M, S; Brown, E, D; Edwards, B. K, et al: "Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and β -carotene supplements in men". Am. J. Clin. Nutr., 55: 1120-1125, 1992.

Mooradian, A.D; Morley. J.E: "Micronutrient status in diabetes mellitus". Am.J.Clin.Nutr. 45; 877-895, 1987.

Mooradian, Ad; Failla, M; Hoogwerf, B., et al: "Selected vitamins and minerals in diabetes". Diabetes Care 17(5), 464-479, 1994.

Moreiras, O; Carbajal, A; Perea, I: "Evolución de los Hábitos Alimentarios en España". Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. Madrid. 1990.

Moreiras, O; Carbajal, A; Cabrera, L: "Tabla de ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española". En: Tablas de Composición de Alimentos". Ediciones Pirámide, 1997.

Morrisey, PA; Sheehy, PJA; Gaynor, P: "Vitamin E". Int. J. Vit. Nutr. Res., 63:260-264, 1993.

Mosenthal, H.O; Loughlin, W.C: "Vitamins A, B and C in diabetic children". Arch. Inter. Med., 73:391-396, 1944.

Murrill, W.A; Horton, P.B; Leiberman, E; Newburgh, L.H. Vitamin A and carotene. II. Vitamin A and carotene metabolism in diabetics and normals. J.Clin.Invest. 20; 395-400, 1941.

Napoli, J.L; Race, K.R: "Biogenesis of retinoic acid from β -carotene". J. Biol. Chem., 263: 17372-17377, 1988.

Ndahimana, J; Dorchy, H; Vertongen, F: "Activité anti-oxydante érythrocytaire et plasmatique dans le diabète de type I". Presse Med. 25; 188-192, 1996.

Nierenberg, D.W; Peng, Y.M; Alberts, D.S: "Methods for determination of retinoids, α -tocopherols and carotenoids in human serum, plasma and other tissues". In: Moon, T.E, Micozzi, M.S (eds). Nutrition and Cancer Prevention. New York, NY: Marcel Dekker. pp 181-209, 1989a.

Nierenberg, DW; Stukel, TA; Baron, JA., et al, and Skin Cancer Prevention Study Group: "Determinants of plasma levels of beta-carotene and retinol". Am.J.Epidemiol. 130(3), 511-521, 1989b.

Nierenberg, D.W; Stukel, T.A; Baron, J.A, et al: "Determinants of increase in plasma concentration of β -carotene after chronic oral supplementation". Am.J.Clin. Nutr., 53:1443-1449, 1991.

Nierenberg, D.W; Nann, S.L: "A method for determination concentrations of retinol, tocopherol and five carotenoids in human plasma and tissue samples". Am. J. Clin. Nutr., 56: 417-426, 1992.

Niki, E; Noguchi, N; Tsuchihashi, H, et al: "Interactions among vitamin C, vitamin E and β -carotene". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl.): 1322S-1327S, 1995.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Report on Round Robin XXXVIII, 1996.

Nomenclature Policy: "Generic descriptions and trivial names for vitamins and related compounds". Am. J. Clin. Nutr., 49: 151-155, 1989.

Novotny, J.A.; Dueker, S.R; Zech, L.A, et al: " Compartmental analysis of the dynamics of β -carotene in an adult volunteer". J. Lipid, Res., 36: 1825-1838, 1995.

Nutrition Working Group of I.L.S.I. (Europe): "Recommended Daily Amounts of Vitamins and Minerals in Europe". Nutrition Abstracts and Reviews (Series A), Vol. 60 (10). 1990.

Olmedilla, B; Granado, F; Rojas-Hidalgo, E., et al: "A rapid separation of ten carotenoids, three retinoids, α -tocopherol and d- α -tocopherol acetate by HPLC and its application to serum and vegetable samples". J. Liq. Chromatogr. 13(8), 1455-1483, 1990.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I., et al: "Determination of nine carotenoids, retinol, retinyl palmitate and α -tocopherol in control human serum, using internal standards". Food Chem., 45, 205-213, 1992.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I., et al: "Quantitation of provitamin and non-provitamin A carotenoids in fruits most frequently consumed in Spain". In: Food and Cancer Prevention Chemical and Biological Aspects. Waldrom K, Johnson I.T, Fenwick G.K. (eds). Royal Society of Chemistry. U.K. pp 141-145, 1993.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I., et al: "Seasonal and sex-related variations in serum levels of six carotenoids, retinol and α -tocopherol". Am.J.Clin.Nutr., 60: 106-110, 1994.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanci, I: "Hyper-b-carotenemia unrelated to diet: A case of brain tumor". Int. J. Vit. Nut. Res., 65: 21-23, 1995.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I., et al: "Evaluation of retinol, α -tocopherol and carotenoids in serum of men with cancer of the larynx prior and following commercial enteral formula feeding". J.P.E.N., 20(2): 145-150, 1996a.

Olmedilla, B; Granado, F; Gil-Martínez., et al: " Freezing effect on carotenoid content in raw and cooked vegetables and fruits". Food Chem., 57 (1): 78 (Abstract), 1996b.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I., et al: "Contenido de carotenoides en verduras y frutas de mayor consumo en España", Instituto Nacional de la Salud (INSALUD). Secretaría General. Madrid. 1996c.

Olmedilla, B; Granado, F; Gil-Martínez, E., et al: "Supplementation with lutein (4 months) and α -tocopherol (2 months) , in separated or combined oral doses, in control men". Cancer Letters, 114: 179-181, 1997a.

Olmedilla, B; Granado, F; Gil-Martínez, E., et al: "Reference levels of retinol, α -tocopherol and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects". Clin Chem., 43: 6; 1066-1071, 1997b.

Olmedilla, B; Granado, F; Gil-Martínez, E., et al: "Consolidated Final Report AAIR CT93-0888". 1997c.

Olmedilla, B; Granado, F; Gil-Martínez, E., et al: "Effect of b- plus a-carotene supplementation on b-cryptoxanthin serum levels. A placebo control trial". (Comunicación oral). In: Bioavailability '97. Wageningen 25-28 May, 1997d.

Olmedilla, B; Granado, F; Blanco, I., et al: "Carotenoid content in fruit and vegetables and its relevance to human health: Some of the factors involved". Recent Res. Devel. in Agricultural and Food Chem., 2: 57-70, 1998.

Olson, J.A; Hayaishi, O: "The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine". Proc. Natl. Acad. Sci USA 54: 1364-1369, 1965.

Olson, J.A: "Serum levels of vitamin A and carotenoids as refelectors of nutritional status". J. Natl. Cancer Inst., 73: 1439-1444, 1984.

Olson, J.A: "Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β -carotene into vitamin A". J. Nutr., 119: 105-108, 1989.

Olson, J.A: "1992 Atwater Lecture: The irresistible fascination of carotenoids and vitamin A". Am. J. Clin. Nutr., 57: 833-839, 1992.

Olson, J.A: "Molecular actions of carotenoids". Ann. N.Y.Acad. Sci., 691:156-167, 1993.

Olson, J. A. : "Isotope-dilution technique: a wave of the future in human nutrition". Am. J. Clin. Nutr, 66: 186-187, 1997.

Omenn, G. S; Goodman, G. E; Thornquist, M. D, et al: " Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial". J. Natl. Cancer Inst., 88: 1550-1559, 1996.

Ong, D.E: " Absorption of vitamin A". In: Vitamin A in health and disease. R. (Ed). Marcel Dekker, New York. pp: 37-73, 1994.

Oshima, S; Sakamoto, H; Ishiguro, Y., et al: "Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of Papriks juice in men". J. Nutr., 127 (8): 1475-1479, 1997.

Paetau, I; Chen, H; Goh, N, M-Y., et al: "Interactions in the postprandial appearance of β -carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol-rich lipoproteins in humans". Am. J. Clin. Nutr., 66: 1133-1143, 1997.

Pamuk, E.R; Byers, T; Coates, R.J. et al: "Effect of smoking on serum concentrations in African-American women". Am. J. clin. Nutr, 59: 891-895, 1994.

Parker, R.S: "Carotenoid and tocopherol composition of human adipose tissue". Am. J. Clin. Nutr., 47: 33-36, 1988.

Parker, RS: "Carotenoids in human blood and tissues". J. Nutr., 119; 101-4. 1989.

Parker, R.S; Swanson, J.E; Marmor, B, et al: " Study of β -carotene metabolism in humans using ^{13}C - β -carotene and high precision isotope ratio mass spectrometry". Ann. N.Y. Acad. Sci., 691: 86-95, 1993.

Parker, R:" Absorption, metabolism and transport of carotenoids". FASEB J. 10: 542-551, 1996a.

Parker, R:" Absorption and metabolism of ^{13}C - β -carotene in humans". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 36 (abstract) , 1996b.

Parker, R:" Bioavailability of carotenoids". Eur. J. Clin. Nutr., 51 (Suppl. 1): S86-S90, 1997.

Pearson, W.N : "Blood and urinary levels as potential indices of body stores". Am. J. Clin. Nutr. 20: 514-525, 1967.

Petkovich, M:" Regulation of gene expression by vitamin A". Ann. Rev. Nutr., 12: 443-473, 1992.

Peto, R; Doll, R; Buckley, J.D, et al: "Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates?". Nature 290: 201-208, 1981.

Pfahl, M; Chytil, F: "Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors". Ann. Rev. Nutr., 16: 257-285, 1996.

Pietrzik, K: "Biomarkers for antioxidant status". In: β -carotene, vitamin E, vitamin C and quercetin in the prevention of degenerative disease -The role of Foods-. ILSI Europe Antioxidant Task Force. Workshop June 1994.

Poorvliet, E.J; West, C.E: "The carotenoid content of foods with special reference to developing countries". Vitamin A Field Support Project (VITAL) De. 1993.

Prabhala, R.H; Braune, L.M; Garewal, H.S, et al:" Influence of β -carotene on Immune Functions". Ann. N.Y. Acad. Sci., 691: 262-264, 1993.

Qureshi, N; Qureshi, A.A: "Tocotrienols: Novel hypocholesterolemic agents with antioxidant properties". In: Vitamin E in Health and Disease. Packer, L, Fuchs, J (eds). Marcel Dekker. New York: pp 247-269, 1993.

Rabinowitch, I.M: "Carotemia and diabetes. II. The relationship between the sugar, cholesterol and carotin contents of blood plasma". Arch.Int.Med. 45; 586-592, 1930.

Ralli, E.P.; Brandaleone, H; Mandelbaum, T: "Studies on the effect of the administration of carotene and vitamin A in patients with diabetes mellitus. I. The effect of the oral administration of carotene on the blood carotene and cholesterol of diabetic and normal individuals". J.Lab.Clin.Invest, 20; 1266-1275, 1935.

Ramachandran, K: "Beta-carotene metabolism in diabetes". Indian J.Med.Res. 61(12); 1831-1834, 1973.

Rautalahti, M; Albanes, D; Haukka, J., et al: "Seasonal variation of serum concentrations of β -carotene and α -tocopherol. Am.J.Clin.Nutr., 57:551-556, 1993.

Reaven, P: "Dietary and pharmacologic regimes to reduce lipid peroxidation in non-insulin-dependent diabetics". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl.): 1483S-1490S, 1995.

Riboli, E; Pèquignot, G; Repetto, F., et al: "A comparative study of smoking, drinking and dietary habits in population samples in France, Italy, Spain and Switzerland. I. Study design and dietary habits". Rev. Epidem. et Santé Publ., 36: 151-165, 1988.

Riemersma, R.A; Wood, D.A; McIntyre, C.C.A, et al : "Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C and E and carotenoids". Lancet, 337: 1-5, 1991.

Rissanen, A; Sarlio-Lahtenhorva, S; Alfthan, G et al: "Employed problem drinkers: a nutritional risk group?". Am. J. Clin. Nutr., 45: 456-461, 1987.

Rock, C.L; Swenseid, M.E; Jacob, R.A., et al: "Plasma carotenoid levels in human subjects fed a low carotenoid diet". J. Nutr., 122; 96-100, 1992.

Rock, C.L; Swenseid, M.E: "Plasma carotenoid levels in anorexia nervosa and in obese patients". Meth. Enzymol., 214: 116-124, 1993.

Rock, C.L; Demitrack, M.A; Rosenwald, E.N., et al: "Carotenoids and menstrual cycle phase in young women". Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 4: 283-288, 1995.

Rock, C.L; Fada, R.D; Jacob, R.A, et al: "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, vitamin E and the carotenoids". J. Am. Diet. Assoc., 96: 693-702, 1996.

Rodriguez-Amaya, D.B: "Carotenoids and Food Preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods". U.S. Agency for International Development (USAID), 1997.

Roe, D.A: "Photodegradation of carotenoids in human subjects". Fed. Proc. 46: 1886-1889, 1987.

Roidt, L,; White, E; Goodman, G.E, et al: " Association of food frequency questionnaires estimates of vitamin A intake with serum vitamin A levels". Am. J. Epidemiol., 128: 645-654, 1988.

Rojas-Hidalgo, E: "Alteraciones metabólicas". En: La mano del diabético. ARAN Ediciones. Págs:57-61. 1987.

Rojas Hidalgo, E: "Estado de nutrición y su valoración". En: Enfermedades Digestivas. F. Vilardell et al. Ed CEA. pp: 97-109, 1990.

Rojas-Hidalgo, E; Olmedilla, B: "Carotenoids". Int. J. Vit. Nutr. res., 63: 265-269, 1993.

Ross, MA; Crosley, LK; Brown, KM., et al: "Plasma concentrations of carotenoids and antioxidant vitamins in Scottish males: influences of smoking. Eur.J.Clin.Nutr., 49; 861-865, 1995.

Rowe, P.M: "Beta-carotene takes a collective beating". Lancet 347: 249, 1996.

Saintot, M; Astre, C; Scali, J., et al: "Within-subjects seasonal variation and determinants of inter-individual variations of plasma- β -carotene". Internat.J.Vit.Nutr.Res. 65; 169-174, 1995.

Schaefer, E.J; Woo, R; Kibata, M, et al: " Mobilization of triglyceride but not cholesterol or α -tocopherol from humans adipocytes during weight reduction". Am. J. Clin. Nutr., 37: 749-754, 1983.

Schmitz, H.H; Poor, C.L; Wellman, R.B, et al: "Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue". J. Nutr., 121:1613-1621, 1991.

Schmitz, H.H; Poor, Ch.L; Gugger, E.T., et al: "Analysis of carotenoids in human and animal tissues". *Methods Enzymol.*, 214: 102-116, 1993.

Schorah, CJ; Bishop, N; Wales, JK., et al: "Blood vitamin C concentrations in patients with diabetes mellitus". *Internat. J. Vit. Nutr.Res.* 58, 312-318, 1988.

Schultz, M; Leist, M; Petrzika, M, et al: "Novel urinary metabolite of α -tocopherol, 2,5,7,8 tetramethyl-2 (2'-carboxiethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply?". *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (Suppl.): 1527S-1537S, 1995.

Scott, K.J; Thurhnam, D.I; Hart, D. J, et al: " The correlation between the intake of lutein, lycopene and β -carotene from vegetables and fruits, and blood plasma concentrations in a group of women aged 50-65 years in the U.K". *Br. J. Nutr.*, 75: 409-418, 1996.

Sharoni, Y; Karas, M; Amir, H, et al: "Lycopene inhibits cell proliferation and interfere with IGF-I signal transduction in endometrial and mammary cancer cells". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 92 (abstract) ,1996.

Sharpless, K; Duewer, D.L: "Population distributions and intralaboratory reproducibility for fat-soluble vitamin-related compounds in human serum". *Anal. Chem.*, 67 (23): 4416-4422, 1995.

Sharvill, D.E: " Familial hypercarotenemia and hypovitaminosis A". *Proc. Roy. Soc. Med.*, 63: 605-608, 1970.

Sheppard, A.J; Weihrauch, J.L; Pennington, J.A.T: " Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods". In: *Vitamin E in Health and Disease*. Packer, L, Fuchs, J (eds). Marcel Dekker. New York:pp 9-35. 1993.

Shibata, A; Sasaki, R; Ito, Y, et al: " Serum concentrations of β -carotene and intake of green vegetables among healthy inhabitants in Japan". *Int. J. Cancer*, 44: 48-52, 1989.

Sivaprasadarao, A; Findlay, J.B.C: " The retinol-binding protein superfamily". In: *Vitamin A in health and disease*. R. (Ed). Marcel Dekker, New York. pp: 87-119, 1994.

Simpson, K: "Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A". *Proc. Nutr. Soc.*, 42: 7- . 1983.

Snodderly, D.M: "Evidence of protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins". *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (Suppl.): 1448S-1462S, 1995.

Solomon,, H : "Von Noorden's Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels". Ed. 2; 2:290; München. med. Wschr., May 23, pp 564, 1919. (citado en Head y Johnson, 1921).

Solomons, N.W; Allen, L.H: " The functional assessment of nutritional status: Principles, practice and potential". Nutr. Rew., 41: 33-40, 1983.

Solomons, N.W; Bulux, J: " Effects of nutritional status on carotene uptake and bioconversion". Ann. N.Y. Acad. Sci., 691: 96-110, 1993.

Stacewicz-Sapuntzakis, M; Bowen, PE; Kikendall, W., et al: "Simultaneous determination of serum retinol, and various carotenoids: their distribution in middle-aged men and women". J. Micronut. Anal., 3, 27-45. 1987.

Stahl, W; Sies, H : " Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans". J. Nutr., 122: 2161-2166, 1992a.

Stahl, W; Schwarz, W; Sundquist, A et al: "Cis-trans isomers of lycopene and β -carotene in human serum and tissues". Arch. Biochem. Biophys., 294:173-177, 1992b.

Stahl, W; Schwarz, W; Sies, H: " Human concentrations of all-trans- β -carotene and α -carotene but not 9-cis- β -carotene upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene)". J. nutr., 123: 847-851, 1993a.

Stahl, W; Sundquist, A.R; Hanusch, M, et al: " Separation of β -carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples". Clin. Chem., 39:810-814, 1993b.

Stahl, W; Sundquist, A; Sies, H: "Role of carotenoids in antioxidant defense". In: Vitamin A in health and disease. R. (Ed). Marcel Dekker, New York. pp: 275-289, 1994.

Stahl, W; Schwarz, W, Larr, J, et. al: "All-trans- β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cis-geometrical isomer". J. Nutr., 125: 2128-2133, 1995.

Stahl, W; Sies, W: "Biological functions of carotenoids: Antioxidant properties and induction of gap junctional communication". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 89 (abstract), 1996a.

Stahl, W; Sies, H: "Lycopene: A Biologically important carotenoid for humans?". Arch. Biochem. Biophys., 336 (1): 1-9, 1996b.

Steinmetz, K; Potter, J.D:" Vegetables, fruits and cancer prevention: A review". J. Am. Diet. Assoc., 96: 1027-1039, 1996.

Stepp, W; Khunau, J; Schroeder, H:" Las vitaminas y su utilización clínica". Edición española de la Cuarta edición alemana. Bayer. Barcelona. 1939.

Strain, J.J:" Disturbances of micronutrient and antioxidant status in Diabetes". Proc. Nutr. Soc., 50: 591-604, 1991.

Straub, O:" Key to carotenoids". H. Pfander (ed). Birkhauser Verlag. Basel. 1987.

Stryker, W.S; Kaplan, L.A; Stein, E.A; et al:" The relation of diet, cigarette smoking and alcohol to the plasma β -carotene and α -tocopherol levels". Am. J. Epidemiol., 127 (2): 283-296, 1988.

Stryker, W.S; Salvini, S; Stampfer, M.J;, et al:" Contribution of specific foods to absolute intake and between-persons variation of nutrient consumption". J. Am. Diet. Assoc., 91:172-178, 1991.

Tamai, H; Murata, T; Morinobu, M.M., et al: " β -carotene and retinol in children with insulin-dependent diabetes mellitus". (Abs.) Second International Conference: Antioxidant Vitamins and beta-carotene in disease prevention. p.85. Berlin (Germany), October 10-12, 1994.

Tamai, H; Morinobu, T; Morata, T., et al: " 9 -cis- β -caroteno in human plasma and blood cells after ingestion of β -carotene". Lipids 30: 493-498, 1995.

Tang, G; Wang, X.D; Russell, R.M., et al:" Characterization of b-apo-13-carotenone and b-apo-14'-carotenal as enzymatic products of the excentric cleavage of β -carotene ". Biochemistry 30: 9829-9834, 1991.

Tangney, C; Shekelle, R.B; Raynor, W, et al:" Intra- and interindividual variation in measurements of β -carotene, retinol and tocopherols in diet and plasma". Am. J. Clin. Nutr., 45: 764-769, 1987.

Tangney, C; Brownie, C; Wu, S.M: "Impact of menstrual periodicity on serum lipids levels and estimates of dietary intakes". J. Am. Coll. Nutr., 10: 107-113, 1991.

Taylor, A; Jacques, P.F; Epstein, E.M:" Relations among aging, antioxidant status and cataracts". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl.): 1439S-1448S, 1995.

Tee, E-S; Lim, C-L; Chong, Y-H: "Carotenoid profile and retinol content in human serum - simultaneous determination by high-pressure liquid chromatography (HPLC)". Internat.J.Food Sci. Nutr., 45; 147-157, 1994.

Tengerdy, R.P: "The role of vitamin E in immune response and disease resistance". Ann. N. Y. Acad. Sci., 587: 24-34, 1990.

Thurnham, D.I; Davies, J.A; Crump, B.J, et al : " The use of different lipids to express serum tocopherol:lipid ratios for the measurement of vitamin E status". Ann. Clin. Biochem., 23:514-520, 1986.

Thurnham, DI: " Do higher vitamin A requirements in men explain the difference between sexes in plasma provitamin A carotenoids and retinol? Proc. Nutr. Soc., 47, 181(Abstract), 1988a.

Thurnham, D.I; Flora, P.S: "Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherol in stored plasma". Clin. Chem., 34: 1947, 1988b.

Thurnham, D.E.; Tyler, H.A: "Factors influencing plasma carotenoids in British adults". 9th International Symposium on Carotenoids. Kyoto. (Abstract n° 27), 1990.

Traber, M.G; Kayden, H.J : "Preferential incorporation of α -tocopherol vs γ -tocopherol in human lipoproteins". Am. J. Clin. Nutr., 49: 517-526, 1989.

Traber, M.G; Cohn, W; Muller, D.P.r: "Absorption, transport and delivery of vitamin E to tissues". In: Vitamin E in Health and Disease. Packer, L, Fuchs, J (eds). Marcel Dekker. New York:pp 35-51. 1993.

Traber, M.G; Diamond, S.R; Lane, J.C, et al: " β -carotene transport in human lipoproteins. Comparisons with α -tocopherol". Lipids 29: 665-669, 1994.

Traber, M, Sies, H: "Vitamin E in humans: Demand and delivery". Ann. Rew. Nutr., 16: 321-349, 1996.

Truscott, T.G; Edge, R; McGarvey, D.J: "Carotene: Pro- and antioxidant reaction mechanisms and interactions with vitamins C and E". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 90 (abstract) , 1996.

Tsai, E.C.; Hirsch, I.B; Brunzell, J.D., et al: "Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM". Diabetes 43; 1010-1014, 1994.

Umber, : "Diabetische Xanthose". Berl. klin. Wchnschr. 53: 879 (July 24), 1919 (citado en Head y Johnson, 1921).

Underwood, B: "Vitamin A in human and animal nutrition". In: Sporn, MB; Roberts, AB; Goodman, DS (Eds). The Retinoids. Vol, I. London: Academic Press. 281-392, 1984.

Van den Berg, H; Heseker, H; Lamand, M et al: "Flair Concerted Action No 10 Status Papers. Introduction, Conclusions and Recommendations". Int. J. Vit. Nutr. Res., 63:247-251, 1993a.

Van den Berg, H:" General aspects of bioavailability of vitamins". In: Bioavailability 93: Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient bioavailability. U. Schlemmer (Ed). Bundesforschungsanstalt fur Ernahrung: pp 279-289, 1993b.

Van den Berg, H: "Functional vitamin status assessment". Bibl. Nutr. Dieta., 51:142-149, 1994.

Van den Berg, H; van Schaik, F; van Vliet, T:" β -carotene absorption and cleavage in men: Interactions with lycopene and lutein". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 67 (abstract) ,1996a.

Van den Berg, H:"Vitamin A intake and status". Eur. J. Clin. Nutr., 50 (Suppl. 3): 7S-13S, 1996b.

Van der Saag, P.T: "Nuclear retinoid receptors: mediators of retinoid effects". Eur. J. Clin. Nutr., 50 (Suppl. 3): 24S-29S, 1996.

Van Poppel, G; Goldbohm, R.A:" Epidemiologic evidence for β -carotene and cancer prevention". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl) 1393S-1403S, 1995.

Van't Veer, P; Kardinal, A.F.M; Bausch-Goldbohm, R.A, et al: "Biomarkers for validation". Eur. J. Clin. Nutr., 47 (Suppl. 2): S58-S64, 1993.

Van Vliet, T; Schreurs, W.H.P; van den Berg, H: "Intestinal β -carotene absorption and cleavage in men: response of β -carotene and retinyl esters in the triglyceride-rich lipoprotein fraction after a single oral dos of β -carotene". Am. J. Clin. Nutr., 62: 110-116, 1995.

Van Vliet, T: "Absorption of β -carotene and other carotenoids in humans and animals models". Eur. J. Clin. Nutr., 50 (Suppl. 3): 32S-38S, 1996.

Vandewoude, M.G; VanGaar, L.F; Vandewoude, M.F., et al: "Vitamin E status in normocholesterolemic and hypercholesterolemic diabetic patients. Acta Diabetol.Lat. 24; 133-139, 1987.

Varela, G; Moreiras, O; Carbajal M.A:"Encuesta de Presupuestos Familiares 1990-1991". En: Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación, vol.1. INE (Madrid), 1995.

Vatassery, G; Morley, J.E; Kuskowski, M.A:" Vitamin E in plasma and platelets of human dibetic patients and control subjects". Am. J. Cli. Nutr., 37: 641-644, 1983.

Vogel, S; Contois, J.H; Tucker, K., et al: "Plasma retinol and plasma and lipoprotein tocopherol and carotenoid concentrations in healthy elderly participants of the Framingham Heart Study". Am. J. Clin. Nutr., 66: 950-958, 1997.

Von Noorden, : Internat. Dermatologenkongress, 1904. (citado en Head y Johnson, 1921).

Wahlquist, M.L; Wattanapenpaiboon, N; Macrae, F.A, et al: "Changes in serum carotenoids in subjects with colorectal adenoma after 24 moths of β -carotene supplementation". Am. J. Clin. Nutr., 60 (6):936-944, 1994.

Wang, X.D; Tang, G.W; Fox, J.G, et al: "Enzymatic conversion of β -carotene into β -apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissues". Arch. Biochem. Biophys., 285: 8-16, 1991.

Wang, X.D; Krinsky, N.I; Benotti, P.N, et al: "Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from 9-cis- β -carotene in human intestinal mucosa in vitro". Arch, Biochem. Biophys., 313: 150-155, 1994.

Weber, U; Goerz, G: "Carotinoid-Retinopathie. III. Reversibilitat". Klin. Mbl.Augenheilk., 188, 20-2. 1986.

Weedon, B. CL; Moss, G.P: "Structure and nomenclature". In: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and Analysis. Britton, G; Liaaen-Jensen, S; Pfander, H (Eds). Birkhauser Verlag. Basel. pp 27-69, 1995.

West, C.E; Castenmiller, J.J.M: "Bioavailability of carotenoids". 11th International Symposium on Carotenoids, Leiden (The Netherlands), August 18-23; pp 65 (abstract) ,1996.

White, W.S: Cho-Il-Kim, M.S; Kalkwarf, H.J, et al: "Ultraviolet light-induced reduction in plasma carotenoid levels". Am. J. Clin. Nutr., 47:879-883, 1988.

White, W.S; Stacewicz-Sapuntzakis, M; Erdman, J.W.Jr: "Pharmacokinetics of β -carotene and canthaxanthin after ingestion of individual and cobined doses by human subjects". A. AM.Coll. Nutr., 13: 665-671, 1994.

WHO/UNICEF/IVACG Task Force: "Vitamin A supplements: A guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency and xerophthalmia". Geneva. World Health Organization. 1988.

WHO: "Indicators for assessing vitamin A deficiency and their implications in monitoring and evaluating intervention programmes". WHO/NUT/96.10. World Health Organization. 1998.

Willett, WC; Stampfer, MJ; Underwood, BA., et al: "Vitamin A, E and carotene: effects of supplementation on their plasma levels". Am, J. Clin. Nutr., 38:559-566, 1983.

Willet, WC; Stampfer, MJ; Underwood, BA., et al: "Vitamin A supplementation and plasma retinol levels: a randomized clinical trial among women". J. Natl. Cancer Inst., 73: 1445-1448, 1984.

Willet, W.C:" Future directions in the development of food frequency questionnaires". Am. J. Clin. Nutr., 59 (Suppl): 171S-174S, 1994.

Winegrad, A, I; Morrison, A.D; Clements, R.S : "The polyol pathway: A model for biochemical mechanisms by which hyperglycemia may contribute to the pathogenesis of the complications of diabetes mellitus". Proceedings of the 8th Congress of the International Diabetes Federation. Brussels, 1973.

Wingerath, T; Stahl, W; Sies, H: " β -cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in β -cryptoxanthin esters". Arch. Biochem. Biophys., 324 (2): 385-390, 1995.

Wolff, S.P: "Diabetes and free radicals". Br. Med. Bull 49: 642-652, 1993.

Yeum, K-J; Booth, S. L; Sadowski, J.A, et al:" Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables". Am. J. Clin. Nutr., 64: 594-602, 1996.

Yong, L-Ch; Forman, M; Beecher, GR; et al:" Relationship between dietary intake and plasma concentrations of carotenoids in premenopausal women: Application of the USDA-NCI carotenoid food-composition database". Am. J. Clin. Nutr., 60:223-230, 1994.

You, Ch-S; Parker, R.S; Goodman, K,J, et al:" Evidence of cis-trans isomerization of 9-cis- β -carotene during absorption in humans". Am. J. Clin. Nutr., 64: 177-183, 1996.

Zhang, Y.W; Kramer ,T.R; Taylor, P.R, et al: "Possible immunologic involvement of antioxidants in cancer prevention". Am. J. Clin. Nutr., 62 (Suppl.): 1477S-1483S, 1995.

Zechmeister, L:"Cis-trans isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes". Chem. Rev., 301:267-339, 1944.

Zechmeister, L:"Cis-trans isomeric carotenoids and arylpolyenes". Academic Press, New York. 1962.

Zeng, S; Furr, H.C.; Olson, J.A: "Metabolism of carotenoid analogs in humans". Am. J. Clin. Nutr., 56: 433-439, 1992.

Ziegler, RG: "Carotenoids, cancer and clinical trials". Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 691 :120-127, 1993.

APÉNDICES

B) Por favor, complete el siguiente cuestionario. Subraye el alimento/s y marque con un círculo la frecuencia de consumo de cada grupo (considerados en su conjunto)

1) HORTALIZAS/VERDURAS
(QC-1)

Frecuencia semanal
(Número de veces por semana)

- De color verde

- | | |
|--|----------------------------------|
| # Espinacas (1) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| # Acelgas (2) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| # Judías verdes, alcachofas, coles de Bruselas, lechuga, espárragos trigueros, pimientos verdes. (3) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| OTROS: guisantes (4) | |
| Bróccoli (5) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| escarola (6) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| apio(7), Habas (9) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| | |

- De color rojo-anaranjado

- | | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| Zanahoria (BM) (10) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| Tomate natural (ensalada) (11) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| " Frito o ketchup (12)
(BM) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| Pimiento rojo, (13) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| OTROS: Lombarda(14)..... | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| calabaza(15)..... | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |

- De color blanco-amarillento

- | | |
|---|----------------------------------|
| (Coliflor, repollo, cebolla, calabacín, pepino) (16) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| Patata (cocidas, fritas etc..) (17)
(BM) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| Maíz (ensaladas, mazorcas...) (18)
(BM) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| OTRAS: Puerros, nabos, | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| endivia, cardo, | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| berenjenas(19) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |
| Aguacate (20) | |
| Setas, champiñon, nísicalos...(21) | 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7 |

2) **FRUTAS** Número de piezas/porciones a la semana
 (Marque SOLO las frutas que consume en estas fechas)
 (QC-2)

Naranja BM (22)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
MandarinaBM? (23)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Plátano (24)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Manzanas (25)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Peras (26)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Melocotón (27)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Albaricoque (28)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Fresón/Fresa (29) (nº de veces/semana)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Sandía (30)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Cerezas (31) (Nº de veces/semana)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
OTRAS: Melón (32), piña (33), ciruelas (34)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7
Granada(35), kiwi (36) pomelo(37), kaki (38),	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, más de 7

3) **LACTEOS** (Subraye el tipo de leche/queso y la frecuencia)

Leche (desnatada (39), diario/frecuente/alguna vez/(casi)nunca
 semidesnatada (40),
 entera (41))

Yogures o similares diario/frecuente/alguna vez/(casi)nunca
 (42)

Queso diario/frecuente/alguna vez/(casi)nunca
 (fresco, normal, curado)
 (43) (44) (45)

Mantequilla o margarina diario/frecuente/alguna vez/(casi)nunca
 (46)

APENDICE II.- Recomendaciones dietéticas durante el estudio de Biodisponibilidad.

DIETA POBRE EN RETINOL (sólo durante el primer día)

Se EVITARÀN los siguientes alimentos:
visceras (hígado, riñòn, etc), leche entera o semidesnatada, yogures, quesos, mantequilla o margarina, otros derivados lácteos, huevos o derivados, croquetas, empanados,

DIETA POBRE EN CAROTENOIDES (durante los 12 días del estudio)

Se EVITARÀN los siguientes alimentos (en general, todos los que tienen colores):

Hortalizas: espinacas, acelgas, judías verdes, alcachofas, coles de Bruselas, berza, lechugas, espàrragos trigueros, pimientos (verdes, rojos o amarillos), guisantes, bròcoli, escarola, apio (blanco o verde), habas verdes, zanahoria, tomate (natural, frito, zumo, salsas, en sopa, ...), grelos, cardo, calabaza, maiz, puerros, endibia, nabos, berenjenas, perejil, berros.

Frutas: naranja, mandarina, plàtano, melocotòn, nectarina, albaricoque, sandía, melòn "francès" (interior anaranjado), piña, frambuesas, aràndanos, ciruelas (de cualquier color), kaki, nisperos, granada, pomelo, aguacate, mango, lichi, frutas secas o en mermelada o confituras.

Otros: helados o sorbetes (de colores), yema de huevo, quesos (de color amarillento o anaranjado), yogures o derivados lácteos con frutas, natillas, flanes, mantequilla, visceras, gazpacho, chorizo, sobrasada, patès, mariscos, salsa para còctel, ketchup, pizzas, empanadillas, zumos comerciales de frutas, refrescos (tipo Fanta o Trinaranjus), trucha, salmòn,....
Complejos vitamínicos (excepto los expresamente recomendados por su mèdico), productos de herbolario, alimentos suplementados con vitaminas o carotenoides.

SI ALGUNA VEZ COMEN ALGUNO DE ESTOS ALIMENTOS, POR FAVOR, ANÒTELO Y COMUNIQUENOSLO.

Alimentos que SI puede comer:

Hortalizas: coliflor, repollo, lombarda, cebolla, pepino (sin piel), calabacìn (sin piel), patatas, niscalos, setas, champiñòn, espàrragos blancos, ràbanos,....

Frutas: peras (sin piel), manzanas (sin piel), limòn, fresòn, cerezas, melòn (tipo Villaconejos), kiwis, chirimoya, uva blanca.

Otros: arroz, pasta, pan blanco o integral, queso fresco, leche, yogur natural, cuajada, requesòn, nata, clara de huevo, ajo, garbanzos, judías blancas o pintas, lentejas, carnes (todas, excepto las adobadas), aves, caza, pescados "blancos o azules", sepia, calamares, atùn o bonito, bacalao, ostras, chirlas, pulpo (no añadir pimentòn), embutidos (sin pimentòn), croquetas, cremas de espàrragos o de champiñòn, frutos secos (no frutas secas), vinos, cerveza, refrescos (tipo "Gaseosa", tònics o similares),....

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA

Tesis Doctoral

Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects

BEGOÑA OLMEDILLA,* FERNANDO GRANADO, ENRIQUE GIL-MARTINEZ, INMACULADA BLANCO, and ENRIQUE ROJAS-HIDALGO

To establish reference ranges for use in clinical and epidemiological studies, we determined concentrations of retinol, α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, and lycopene in 450 Spanish control subjects and 123 Spanish patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Results were grouped according to sex, and samples were collected throughout the year. Concentrations of retinol were significantly lower and β -carotene and α -carotene were higher in women than in men, both in controls and IDDM subjects, whereas β -cryptoxanthin concentrations were higher only in control women. Conditional logistic regression analysis showed that retinol, β -carotene, and lycopene were the variables associated with diabetes. In comparison with other populations, our controls showed, in general, ordinary concentrations of retinol, comparatively low β -carotene and high β -cryptoxanthin concentrations, and a relatively high α -tocopherol/cholesterol ratio.

INDEXING TERMS: nutritional status • β -cryptoxanthin • lutein • zeaxanthin • lycopene • vitamins • antioxidants

Carotenoids, retinol, and tocopherol are among the most widely studied compounds in various populations, for both serum concentrations and dietary intake [1-8], because of their inverse relationship with the development of several diseases, e.g., cancer, cardiovascular disease, and cataracts [9-12].

Several factors have been described as influencing

serum concentrations of carotenoids, and to a lesser extent, the concentrations of tocopherol and retinol: sex, age, dietary intake, smoking and drinking habits, and seasonality [1, 2, 13-16]. In the literature, a great variability is evident in carotenoid serum concentrations from various populations [1-4, 17, 18], a fact that has made it difficult to establish consensus cutoff points for application to different populations and for interpretation of carotenoid concentration in the context of disease prevention.

Subjects with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) are among the groups at risk of having low vitamin concentrations [19, 20]. Despite the large amount of literature dealing with the role of dietary composition in control of diabetes mellitus, relatively few studies deal with the effects of the disease on micronutrient status in these patients. Those that do are inconclusive [21, 22].

The present study was designed to establish reference values for these compounds in our population for use in comparisons with other control populations, for interpreting values in different clinical conditions, and for application in diet and in health and disease epidemiological studies. In addition, study of the fat-soluble antioxidant status in IDDM patients should allow us to assess, in the future, the possible relation of antioxidants to the development of late complications of diabetes.

Subjects and Methods

SUBJECTS

Recruited as control subjects were 450 free-living, apparently healthy people from Madrid, ages 5-79 years (median: males 32 years, females 32.5 years). They had ordinary eating habits, with none on a special diet or taking vitamin or carotenoid supplements. Their cholesterol and triglyceride concentrations fell within normal reference ranges. Groups were established according to

Servicio de Nutrición, Clínica Puerta de Hierro, 28035 Madrid, Spain.

*Author for correspondence. Fax +34-1-373 76 67 or +34-1-373 05 35; e-mail bolmed@nutr.cph.es.

This work was presented in part at the conference, Retinoids: new trends in research and clinical applications, held in Genoa, Italy, October 4-7, 1993.

Received June 24, 1996; revised November 20, 1996; accepted January 6, 1997.

sex (210 males and 240 females), and serum samples were taken and averaged throughout the year (spring–summer and autumn–winter), given that seasonality may influence the concentrations of several of the analytes being investigated [16].

Also recruited were 123 insulin-dependent diabetics, ages 13 to 84 years (median: males 27.5 years, females 27 years). Groups were established according to sex (60 males and 63 females) and sample collection was evenly distributed throughout the year.

The age distributions and proportions of smokers were similar in both groups. Blood samples were collected after an overnight fast and centrifuged at 630g for 10 min; the serum was removed and stored at -24°C until analyzed (within 5 months). The procedures used were in accordance with the ethical standards of the Ethical Committee of Clinical Investigation of Clinica Puerta de Hierro.

SAMPLE PREPARATION AND CHROMATOGRAPHY

The HPLC method and sample preparation used in this study were slightly modified from those previously described [18]. Briefly, 800 μL of ethanol containing retinyl acetate (0.4 mg/L) and tocopheryl acetate (0.1 g/L) as internal standards was added to 800 μL of serum. After vortex-mixing for 45 s, we extracted the sera twice with hexane (2 mL, stabilized with 0.1 g/L butylated hydroxytoluene), vortex-mixing the extracts for 3 and 2 min, respectively. The organic phases were removed, pooled, and evaporated under nitrogen atmosphere, reconstituted with 300 μL of an equivolume solution of tetrahydrofuran:ethanol, and injected (7.5 μL) onto the HPLC system.

The chromatographic system consisted of a Spheri-5-RP-18 or Spheri-5-ODS (5 μm) column (Applied Biosystems, San Jose, CA) used with gradient elution at 1.8 mL/min from ammonium acetate, 0.2 g/L in acetonitrile:dichloromethane:methanol (85:15 by vol), for 5 min to ammonium acetate, 0.2 g/L in acetonitrile:methanol (70:20:10 by vol), for 20 min.

The following compounds were analyzed: carotenoids (lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, lycopene, α -carotene, and β -carotene), α -tocopherol, and retinol. Other identified compounds included γ -tocopherol, retinyl palmitate, α -cryptoxanthin, phytoene, phytofluene, cantaxanthin, and isomers of β -carotene and lycopene.

A Model 490 programmable multiwavelength detector and Model 996 photodiode array detector with a Millennium data station were used (all from Waters Associates, Milford, MA). Carotenoids were detected at 450 nm, retinol and retinyl acetate at 313 nm, and tocopherol and tocopheryl acetate at 294 nm.

The precision of the analytical methods used was evaluated periodically through our participation in the Quality Assurance Program conducted by the National Institute of Standards and Technology (NIST; Gaithersburg, MD).

STATISTICAL METHODS

Statistical comparisons between the results for males and females, in both the control and the diabetic groups, were carried out with nonparametric methods (Mann-Whitney *U*-test). Control and diabetic groups were compared by using conditional logistic regression analysis.

Results

Table 1 shows the median values and the 5th, 25th, 75th, and 95th percentiles for control and diabetic groups, according to sex. Significant sex-related differences were found for retinol (higher in males), both in the controls ($P = 0.001$) and the diabetic group ($P = 0.01$), whereas females had higher concentrations of β -carotene (control, $P = 0.001$; IDDM, $P = 0.008$) and α -carotene (control, $P = 0.001$; IDDM, $P = 0.018$). β -Cryptoxanthin concentrations were also higher in females but only in the control group ($P = 0.001$). Lutein was statistically higher in diabetic females ($P = 0.037$) than in diabetic males, whereas the vitamin E/cholesterol ratio was significantly higher ($P = 0.022$) only in the control group males.

Statistically significant differences between controls and diabetics were observed for retinol ($P = 0.001$) and β -carotene ($P = 0.001$), in both sexes. In addition, control and diabetic males had significantly different concentrations of α -tocopherol ($P = 0.001$) and β -cryptoxanthin and lycopene ($P = 0.05$).

The highest correlation coefficients ($r = 0.63$ – 0.74) were obtained for lutein vs zeaxanthin and for β -carotene vs α -carotene, regardless sex or group. Correlations ($r = 0.01$ – 0.1) were very low between retinol and each of the provitamin carotenoids (β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin). Retinol and α -tocopherol showed correlations of $r = 0.31$ – 0.52 in all cases except in IDDM women ($r = 0.01$). α -Tocopherol showed correlation coefficients of 0.32 – 0.44 with lutein and zeaxanthin (except for lutein in diabetic men, $r = 0.09$).

High correlation coefficients were also observed (in IDDM women only) between β -cryptoxanthin and zeaxanthin ($r = 0.54$) and between β -carotene and β -cryptoxanthin ($r = 0.59$) or zeaxanthin ($r = 0.51$). Finally, IDDM men showed a correlation between lycopene and α -carotene ($r = 0.58$).

Conditional logistic regression analysis (including all analytes and age) between control and diabetic groups, selected retinol, β -carotene, and lycopene as the variables most significantly different between these groups. When the analysis was carried out according to sex, the entry order (β coefficient) in the equation was retinol (males: -0.076 ± 0.01 , $P < 0.0001$; females: -0.085 ± 0.01 , $P < 0.0001$) and β -carotene (males: 0.033 ± 0.02 , $P = 0.066$; females: 0.024 ± 0.01 , $P = 0.012$) in both sexes, followed by lycopene only in males (0.021 ± 0.01 , $P = 0.046$).

Discussion

To correctly interpret the serum concentrations of fat-soluble vitamin-related compounds, establish reference

Table 1. Reference values ($\mu\text{mol/L}$) for retinol, α -tocopherol, and main carotenoids in serum of Spanish subjects (450 controls and 123 IDDM patients).

	Controls															IDDM														
	Males (n = 210)					Females (n = 240)					Males (n = 60)					Females (n = 63)														
	5 ^a	25	50	75	95	5	25	50	75	95	5	25	50	75	95	5	25	50	75	95										
Retinol	1.13	1.56	1.86	2.13	2.63	1.01	1.32	1.54	1.86	2.44	0.82	1.22	1.46	1.71	2.21	0.85	1.03	1.28	1.49	1.85										
Tocopherol	18.34	22.99	28.56	34.36	45.97	17.65	23.45	27.86	33.44	41.33	13.23	20.20	23.57	31.11	40.54	18.34	23.22	26.24	33.44	42.03										
Toc/Chol ^b	3.85	5.01	5.62	6.36	7.56	4.06	4.83	5.46	6.03	7.13	4.13	4.63	5.17	6.36	8.84	3.60	4.40	5.34	6.20	7.32										
β -Carotene	0.067	0.13	0.216	0.30	0.553	0.087	0.18	0.278	0.44	0.818	0.045	0.18	0.276	0.45	0.640	0.124	0.24	0.358	0.55	0.988										
α -Carotene	0.016	0.05	0.047	0.07	0.146	0.018	0.04	0.064	0.10	0.225	0.008	0.03	0.055	0.09	0.153	0.014	0.05	0.065	0.12	0.271										
β -Cryptoxanthin	0.067	0.18	0.275	0.47	1.005	0.096	0.21	0.392	0.65	1.443	0.059	0.20	0.342	0.61	1.569	0.118	0.21	0.438	0.75	1.519										
Lutein	0.078	0.13	0.191	0.26	0.438	0.094	0.14	0.184	0.27	0.442	0.054	0.13	0.180	0.25	0.313	0.081	0.15	0.193	0.28	0.472										
Zeaxanthin	0.020	0.04	0.061	0.08	0.132	0.010	0.04	0.055	0.09	0.146	0.014	0.04	0.054	0.08	0.123	0.022	0.04	0.059	0.08	0.122										
Lycopene	0.112	0.23	0.351	0.49	0.877	0.107	0.23	0.360	0.56	0.922	0.077	0.26	0.419	0.59	1.403	0.147	0.24	0.423	0.58	0.929										

^a Percentiles.

^b Tocopherol/cholesterol ratio.

ranges, and detect groups at risk in a population, one must know the distribution of each analyte in control subjects as well as validate the methodology used. Through our participation for several years in the Fat-Soluble Vitamin Quality Assurance Program conducted by NIST, we have determined that the accuracy and precision of our analytical methods for retinol, α -tocopherol, and β -carotene have been within acceptable values (performance rated as 1 or 2, meaning within 1 or 2 SD of the assigned NIST values).

As reported by other authors [23-26] using the described methodology, one can identify in all sera not only the above-quantified compounds, but also the following compounds: α -cryptoxanthin, *cis*- β -carotene (13-*cis*), *cis*-lycopene (at least three isomers), *cis*-lutein/zeaxanthin; γ -tocopherol, 2,3-anhydrolutein, ξ -carotene, and three ketocarotenoids [24]; several unidentified peaks are also visible. Other compounds not always present, or that need to be concentrated in the sample for detection, include cantaxanthin, γ -carotene, phytoene, phytofluene, retinyl palmitate, and echinenone.

When determining these compounds, the presence of interfering substances can lead to overestimation of the concentration of a given compound. This depends not only on the analytical method used but also on the relative concentrations of the analyte and the interferent. In our control groups, we have observed possible interferences between α -tocopherol and normal concentrations of β -cryptoxanthin on the downslope of the α -tocopherol peak that, given the absorbance of β -cryptoxanthin at 294 nm, can lead to overestimation of α -tocopherol when quantified by peak area. Khachik et al. [27] described a lack of interference between γ -tocopherol and β -cryptoxanthin, despite the coincidence of the peaks; this may be due to the low concentration of β -cryptoxanthin.

REFERENCE VALUES IN CONTROL POPULATIONS

Table 2 summarizes data reported for studies from different countries, when sample size was >100 subjects and results were differentiated by sex. For vitamins A and E, for which accepted "normal" ranges exist, 7 of the 10 populations in Table 2 have mean or median values in the upper part of the reference range for retinol. A consistent sex-dependent effect (males higher than females) in retinol concentrations was seen in all the populations listed, as well as in the diabetic group in this study.

With regard to α -tocopherol, the mean values observed in all populations fall within a narrower range than for retinol and is the same for both sexes. The carotenoids, however, show differences of two- to fivefold in the values reported, as well as variability in the values reported for a given country; this may reflect differences between and within populations/countries, seasonality, and interlaboratory analytical variability.

As was the case for our controls, higher concentrations of provitamin A carotenoids in women than in men (Table 2) are also reported in other populations, regardless of

Table 2. Median or mean (*) carotenoid, retinol, and α -tocopherol concentrations ($\mu\text{mol/L}$) in serum [7, 2, 30, 34] or plasma [1, 28, 29, 31, 32, 33, 35] in different populations.

Country (ref.)*	Lutein ^b		Zeaxanthin		Lycopene		β -Cryptoxanthin		α -Carotene		β -Carotene		Retinol		α -Tocopherol		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
France [7] 442M/552F, 6-97y												0.64	0.72	1.85	1.68	23.5	24.3
Germany [28] 862M/1144F, 18->50y												0.43	0.61			29.2	29.2
Japan [29]* 65M/60F, 22-86y												0.28	0.54	1.68	1.50	16.6	18.3
Japan [2] 618M/1196F, 7-86y	0.62	0.69			0.38	0.50	0.36	0.60	0.12	0.18	0.35	0.64	2.91	2.33	23.0	24.1	
Malasia [30] 58M/42F, 17-78y	0.56	0.56			0.31	0.40	0.53	0.51	0.14	0.16	0.40	0.52	2.67	2.46			
Spain (present study) 210M/240F, 5-79y	0.19	0.18	0.06	0.06	0.35	0.36	0.28	0.39	0.05	0.06	0.22	0.28	1.86	1.54	28.6	27.9	
Spain [31]* 52M/62F, 18-82y												0.41	0.55	1.91	1.66	26.0	24.6
Switzerland [32] 75M/75F, \geq 18y												0.53	0.69	2.34	1.76	30.0	26.5
UK, (England) [1] 944M/938F, adults	0.29	0.29			0.25	0.25	0.13	0.16	0.06	0.07	0.24	0.32	2.21	1.90			
UK, (Scotland) [33]* 100M, 50-59y	0.48				0.52		0.1		0.1		0.54						
USA [34]* 55M/55F, 49-69y	0.31	0.34			0.39	0.35	0.15	0.18	0.05	0.07	0.31	0.44	2.60	2.29			
USA [35]* 121M/186F, 45-65y	0.28	0.27	0.07	0.06	0.82	0.76			0.11	0.12	0.46	0.58	2.13	1.91	27.1	26.2	

* Population studied is described by sex (male, M, and female, F) and age range (years, y).

^b Lutein + zeaxanthin, except for references that reported separate values for each.

dietary habits [17]. For lutein/zeaxanthin and lycopene (nonprovitamin A carotenoids), other studies reported no differences in either among control groups.

IDDM GROUP VS CONTROL GROUP

IDDM subjects seem to behave in a different way. Although retinol is consistently higher in our IDDM males than in the IDDM females, both sexes have lower concentrations than their sex-matched controls, as has been observed previously [36-38]. This appears to be associated with low concentrations of retinol-binding protein and (or) reduced mobilization of vitamin A from the liver in IDDM patients [36]. Results reported for vitamin E are confusing, having been stated as higher or similar in diabetes patients in comparison with controls, possibly because of inclusion of hyperlipemic subjects or inhomogeneity of the sample (or both) [22, 39]; when normalized with respect to cholesterol concentrations, the α -tocopherol concentrations in diabetics were not different from those of normolipemic controls [40].

Sex-related differences for retinol and provitamin carotenoids are similar to those observed in controls, except for β -cryptoxanthin, although lutein is distinctly present. Total lycopene concentrations differed only between control males and IDDM males, as was also seen in the conditional logistic regression analysis. Moreover, lycopene is the only carotenoid that seems to be affected by

the duration of diabetes [41]. However, the difference is only quantitative and not qualitative, the profile of lycopene isomers in IDDM subjects being the same as in our controls and also described in other studies [26].

CORRELATIONS AMONG ANALYTES

Regardless of sex and diabetic condition of the subjects, we obtained high correlation coefficients ($r > 0.6$, $P < 0.0001$) between α - and β -carotene as well as between lutein and zeaxanthin, and the correlations were very similar to those described earlier [35]. This may be due to their simultaneous occurrence in several vegetables and fruits—although this explanation is not equally reflected in the case of lutein and β -carotene, both of which are invariably present in green vegetables. A similar correlation between lycopene and β -carotene has been described by Ascherio et al. [35], who, on finding no correlation with dietary intake, suggested a metabolic or absorptive link.

As would be expected, the lowest correlations were obtained between retinol and each of the provitamin carotenoids, agreeing with those reported by others [9, 35]. Nevertheless, as described by Gey et al. [9], retinol and α -tocopherol showed correlation coefficients, except in IDDM females, of between 0.31 and 0.52 ($P < 0.0001$ in controls; $P < 0.02$ in IDDM males), slightly higher than previously described [30].

In summary, considering the possible implication in disease prevention of several compounds analyzed in this study, IDDM subjects can be considered as an at-risk group for low-retinol status, a situation specifically linked to diabetes. That concentrations of β -carotene and lycopene are higher in the patients than in the controls also shows a strong association of these compounds with diabetes. On the other hand, the α -tocopherol/cholesterol ratio is as high as in IDDM as in controls and is not affected by the disease. From these data, we conclude that IDDM subjects, although classically considered as a group at risk for cardiovascular disease, do not differ from matched controls with regard to antioxidant status, a poor antioxidant status being associated with a high risk for several chronic and degenerative diseases. The normal concentrations of retinol, relatively high α -tocopherol/cholesterol ratio, and comparatively low β -carotene status shown by our control group in comparison with other populations could be compensated or influenced, in part, by higher concentrations of other carotenoids (i.e., β -cryptoxanthin).

This work has been partially funded by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS no. 92/0720), Spain. We acknowledge Pilar Martínez and Teresa Motilla for their efforts in recruitment of volunteers and blood drawing and Isabel Millán for her statistical advice and work. We are also in debt to Marta Messmann for preparing the manuscript. Several carotenoid standards were a gift from Hoffmann-La Roche (Basle, Switzerland).

References

- Thurnham DI. Do higher vitamin A requirements in men explain the difference between the sexes in plasma provitamin A carotenoids and retinol? [Abstract]. *Proc Nutr Soc* 1988;47:181.
- Ito Y, Ochiai J, Sasaki R, Suzui S, Kasuhara Y, Morimitsu Y, et al. Serum concentrations of carotenoids, retinol, and α -tocopherol in healthy persons determined by high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 1990;194:131-44.
- Hallfrisch J, Muller DC, Singh VN. Vitamin A, E intakes and plasma concentrations of retinol, β -carotene, and α -tocopherol in men and women of the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Am J Clin Nutr* 1994;60:176-82.
- Riboli E, Pèquignot G, Repetto F, Axerio M, Raymond L, Boffetta P, et al. A comparative study of smoking, drinking and dietary habits in population samples in France, Italy, Spain and Switzerland. I. Study design and dietary habits. *Rev Epidemiol Santé Publique* 1988;36:151-65.
- van Dokkum W, de Vos RH, Schrijver J. Retinol, total carotenoids, β -carotene, and tocopherols in total diets of male adolescents in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 1990;38:211-6.
- Block G. Nutrient sources of provitamin A carotenoids in the American diet. *Am J Epidemiol* 1994;139:290-3.
- Hercberg S, Preziosi P, Galàn P, Devanlay M, Keller H, Bourgeois C, et al. Vitamin status of a healthy French population; dietary intakes and biochemical markers. *Int J Vit Nutr Res* 1994;64:220-32.
- Jarvinen R. Carotenoids, retinoids, tocopherols and tocotrienols in the diet: the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Int J Vit Nutr Res* 1995;65:24-30.
- Gey KF, Stähelin HB, Eichholzer M, Lüdin E. Prediction of increased cancer risk in humans by interacting suboptimal plasma levels of retinol and carotene. In: Livrea MA, Vidali G, eds. *Retinoids: from basic science to clinical applications*. Basle, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1994:137-63.
- Machlin LJ. Critical assessment of the epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients on cancer and cardiovascular disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35(1&2):41-50.
- Kritchevsky D. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease. *Nutr Today* 1992;Jan/Feb:30-3.
- Taylor A, Jacques PF, Dorey CK. Oxidation and aging: impact on vision. *Toxicol Ind Health* 1993;9:349-71.
- Nierenberg DW, Stukel TA, Baron JA, Dain BJ, Greenberg ER. The skin cancer prevention study group. Determinants of plasma levels of β -carotene and retinol. *Am J Epidemiol* 1989;130:511-21.
- Thurnham DE, Tyler HA. Factors influencing plasma carotenoids in British adults. Ninth International Symposium on Carotenoids, Kyoto, 1990;A6-2:27.
- Rautalahti M, Albanes D, Haukka J, Roos E, Gref C, Virtamo J. Seasonal variation of serum concentrations of β -carotene and α -tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1993;57:551-6.
- Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Seasonal and sex-related variations in six serum carotenoids, retinol and α -tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1994;60:106-10.
- Rojas-Hidalgo E, Olmedilla B. Carotenoids. *Int J Vit Nutr Res* 1993;63:265-9.
- Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Determination of nine carotenoids, retinol, retinyl palmitate and α -tocopherol in control human serum using two internal standards. *Food Chem* 1992;45:205-13.
- Gaby SK, Bendich A, Singh VN, Machlin LJ, eds. General introduction. In: *Vitamin intake and health. A scientific review*. New York: Marcel Dekker, 1991:1-16.
- Schorah CJ, Bishop N, Wales JK, Haensbro PM, Habibzadeh M. Blood vitamin C concentrations in patients with diabetes mellitus. *Int J Vit Nutr Res* 1988;58:312-8.
- Mooradian AD, Failla M, Hoogwerf B, Marynuik M, Wyllie-Rosett J. Selected vitamins and minerals in diabetes. *Diabetes Care* 1994;17:464-79.
- Caye-Vaugien C, Krempf M, Lamarche P, Charbonnel B, Pieri J. Determination of alpha-tocopherol in plasma, platelets and erythrocytes of type I and type-II diabetic patients by HPLC. *Int J Vit Nutr Res* 1990;60:324-30.
- Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. An improved HPLC method for the separation of fourteen carotenoids, including 15-/13- and 9-cis- β -isomers, phytoene and phytofluene. *J Liq Chromatogr* 1991;14:2457-75.
- Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR, Smith JC. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal Chem* 1992;64:2111-22.
- Barua AB, Kostic D, Olson JA. New simplified procedures and simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols and carotenoids in human serum. *J Chromatogr Biomed Appl* 1993;617:257-64.
- Stahl W, Sundquist AR, Hanusch M, Schwarz W, Sies H. Separation of β -carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. *Clin Chem* 1993;39:810-4.
- Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby W. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl Chem* 1991;63:71-80.

28. Schneider R, Eberhart W, Hesecker H, Kübler W. Vitamin intake and vitamin status in Germany. *Bibl Nutr Dieta* 1995;52:116-27.
29. Morinobu T, Tamai H, Tanabe T, Murata T, Manago M, Mino M, Hirahara F. Plasma α -tocopherol, β -carotene, retinol levels in the institutionalized elderly individuals and in young adults. *Int J Vit Nutr Res* 1994;64:104-8.
30. Tee E-S, Lim C-L, Chong Y-H. Carotenoid profile and retinol content in human serum—simultaneous determination by high-pressure liquid chromatography (HPLC). *Int J Food Sci Nutr* 1994;45:147-57.
31. Fernández-Bañares F, Giné JJ, Cabré E, Abad-Lacruz A, Esteve-Comas M, González-Huix F, Gasull MA. Factors associated with low values of biochemical vitamin parameters in healthy subjects. *Int J Vit Nutr Res* 1993;63:68-74.
32. Vuilleumier JP, Keller HE, Gysel D, Hunziker F. Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. *Int J Vit Nutr Res* 1983;53:265-72.
33. Ross MA, Crosley LK, Brown KM, Duthie SJ, Collins AC, Arthur JR, Duthie GG. Plasma concentrations of carotenoids and antioxidant vitamins in Scottish males: influences of smoking. *Eur J Clin Nutr* 1995;49:861-5.
34. Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Kikendall JW, Burgess M. Simultaneous determination of serum retinol and various carotenoids: their distribution in middle-aged men and women. *J Micronut Anal* 1987;3:27-45.
35. Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Litin L, Willett WC. Correlations of vitamin A and E intakes with the plasma concentrations of carotenoids and tocopherols among American men and women. *J Nutr* 1992;122:1792-801.
36. Basu TK, Tze WJ, Leichter J. Serum vitamin A and retinol-binding protein in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1989;50:329-31.
37. Krempf M, Ranganathan S, Morin M, Charbonnel B. Plasma vitamin A and E in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) adult diabetic patients. *Int J Vit Nutr Res* 1991;61:38-42.
38. Martinoli L, Di Felice M, Seghieri G, Ciuti M, De Giorgio LA, Fazzini A, et al. Plasma retinol and α -tocopherol concentrations in insulin-dependent diabetes mellitus: their relationship to microvascular complications. *Int J Vit Nutr Res* 1993;63:87-92.
39. Holler C, Ulberth F, Osterode W, Irsigler K. Selenium status and serum levels of the antioxidant vitamins all-trans retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol in diabetic patients with and without retinopathy. In: Schlemmer U, ed. *Proc., Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability, Part 1.* Karlsruhe, Germany: Bundesforschungsanstalt für Ernährung, 1993:235-8.
40. Vandewoude MG, Vertommen JF. Vitamin E status in normocholesterolemic and hypercholesterolemic diabetic patients [Abstract]. *Diabetologia* 1987;30:592A.
41. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas E. Retinol, tocopherols and carotenoids in insulin dependent diabetics and their immediate relatives [Abstract P-82]. Berlin: 2nd Int. Conf., Antioxidant vitamins and beta-carotene in disease prevention, 1994:84.

Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives

F. GRANADO, B. OLMEDILLA, E. GIL-MARTINEZ, I. BLANCO, I. MILLAN and E. ROJAS-HIDALGO
 Servicio de Nutrición, Clínica Puerta de Hierro, C/San Martín de Porres 4, 28035, Madrid, Spain

(Received 15 July/26 September 1997; accepted 2 October 1997)

1. Patients with insulin-dependent diabetes mellitus are classified among the groups at risk for low vitamin status, and recent studies suggest that some degree of supplementation with antioxidants may be beneficial in helping to prevent certain long-term complications of diabetes mellitus. Our objective was to compare the status of the fat-soluble vitamins and antioxidant-related compounds in patients with well-defined insulin-dependent diabetes mellitus with that of their first-degree relatives, controlling seasonal and analytical variability as factors influencing the interpretation of the data.
2. Fifty-four patients with insulin-dependent diabetes mellitus, 214 non-diabetic, first-degree relatives (controls) and 236 unrelated controls were analysed for retinol, tocopherols (α and γ) and main carotenoids in serum (β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin and lycopene) by means of a validated HPLC method.
3. Insulin-dependent diabetes mellitus was associated with lower retinol levels and higher levels of β -carotene, α -carotene and β -cryptoxanthin than sex-matched, first-degree relatives. α -Tocopherol, the α -tocopherol/cholesterol ratio, γ -tocopherol, lutein, zeaxanthin and lycopene showed no differences. Retinol and β -carotene were the variables most closely associated with diabetes.
4. Patients with insulin-dependent diabetes mellitus showed lower serum retinol status together with higher concentrations of provitamin-A carotenoids. Serum fat-soluble antioxidant levels were greater than or equal to those in controls. According to the serum status observed, individuals with diabetes do not require supplementation with α -tocopherol or carotenoids, although the need for retinol supplementation in patients with marginal serum levels should be evaluated.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a metabolic disorder that can modify the nutritional status of affected patients, traditionally classified among the groups at risk for low vitamin status [1–4]. Hyperglycaemia-induced

oxidative stress has been related to the aetiology of diabetic complications through different biochemical pathways (glucose auto-oxidation, the polyol pathway, protein glycation) [5] which may be affected by an impaired nutritional status. Recent studies suggest that some degree of supplementation with antioxidants may be beneficial in helping to prevent certain long-term complications of diabetes mellitus [6–9], although there is little evidence to confirm that such therapy has any benefits [10].

Although there is a large amount of literature dealing with the role of dietary composition in the control of diabetes mellitus, few studies deal with the effect of the disease on the micronutrient status in these patients, and the reports that do exist are not conclusive [11–15]. Differences in patient populations and methodological uncertainties may account for the discrepancies in most reports [5, 15].

In this regard, although diet is an important factor influencing the presence and proportions of carotenoids, tocopherols and retinol in serum, other determinants such as sex, seasonality, smoking and drinking habits, drug and supplement use, body mass index, etc., may also affect micronutrient status [16–19].

Given that several of these compounds may act simultaneously, in this report we focus on the levels of the major carotenoids, retinol, α -tocopherol and γ -tocopherol in serum, controlling seasonal and analytical variability as factors that may influence the interpretation of the data, for the purpose of assessing the effect of diabetes mellitus on carotenoid and fat-soluble vitamin status in a well-defined group of patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), and comparing it with the status observed in first-degree relatives.

A portion of this work was presented at the Second International Conference: 'Antioxidant vitamins and beta-carotene in disease prevention' held in Berlin, Germany on 10–12 October, 1994.

SUBJECTS AND METHODS

The characteristics of the diabetic population, according to sex, are shown in Table 1. A total of 54

Key words: carotenoids, insulin-dependent diabetes mellitus, first-degree relatives, retinol, tocopherols.

Abbreviations: IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; LDL, low-density lipoprotein; RBP, retinol-binding protein; z-T/C, α -tocopherol/cholesterol ratio.

Correspondence: Dr F. Granado.

Table 1. Characteristics of the patients with IDDM. Values are means (SD).

	Men (n = 28)	Women (n = 26)
Age (years)	32.3 (14.6)	31.9 (12.5)
Body mass index (kg/m ²)	22.9 (2.9)	24.3 (3.9)
Cholesterol (mmol/l)	4.80 (1.5)	5.42 (1.2)
High-density lipoprotein cholesterol (mmol/l)	1.37 (0.51)	1.66 (0.57)
Fructosamine (mmol/l)	3.61 (0.69)	3.84 (0.56)
HbA _{1c} (%)	9.81 (2.72)	10.42 (2.14)
Duration of the disease (% subjects)		
< 10 years	50	54
> 10 years	50	46
Retinopathy (% of subjects)	25	27
Serum creatinine (μmol/l)	89.9 (9.9)	73.3 (7.9)
Urate (μmol/l)	246.1 (49.4)	194.5 (68.5)
Serum urea (μmol/l)	12.9 (2.4)	12.2 (2.4)
Albumin (g/l)	46.4 (3.9)	44.1 (4.1)
Smokers (% of subjects)	21	46
Insulin (i.u. day ⁻¹ kg ⁻¹)	0.60 (0.21)	0.68 (0.22)
Total insulin dose/day	40.1 (10.5)	40.5 (13.9)

patients with IDDM between 13 and 67 years of age (men: mean 32.3 years and median 27 years; women: mean 31.9 years and median 30 years) were included in the study. All subjects were treated with, on average, two daily injections of long-acting insulin (HumulinaTM, InsulatardTM) alone or in combination with short-acting insulin (ActrapidTM, VelosulinTM) (50% of the subjects).

Two-hundred and fourteen non-diabetic, first-degree relatives of the diabetic patients (97 men and 117 women), aged between 6 and 79 years (men: mean 34.9 years and median 28 years; women: mean 32.8 years and median 26 years), were used as 'familial' controls. Fifteen percent of the men and 9% of the women were smokers. The mean body mass index was 25 ± 4.8 for men and 23.8 ± 6 for women.

Two-hundred and thirty-six subjects (113 men and 123 women), aged between 5 and 76 years (men: median 35 years; women: median 35 years) were enrolled as non-related or 'non-familial' controls. In this group, 38% of the men and 31% of the women were smokers. The mean body mass index was 26.1 ± 4.2 for men and 22.5 ± 3 for women.

Total cholesterol, triacylglycerol and high-density lipoprotein cholesterol fell within normal ranges in all groups. None of the patients was taking vitamin or carotenoid supplements.

The procedures used were in accordance with the ethical standards of the Ethical Committee of Clinical Investigation of Clínica Puerta de Hierro, and informed consent was obtained from all the subjects.

Given the seasonal variation in the carotenoid intake and serum levels in our country [19, 20], subjects from the three groups were screened similarly at different times of the year, two-thirds during winter and spring and the remaining third during summer and autumn. The patient and all members

of the family were sampled on the same day, so the seasonal effect could be avoided. No seasonal bias was detected between sexes in any of the groups.

Blood samples were collected after overnight fasting using Vacutainer tubes containing no anticoagulant. All samples for each family were analysed the same day and within 5 months after collection (stored at -20°C).

The HPLC method and sample preparation used in this study have been described previously [15]. The following compounds were analysed: provitamin-A carotenoids (β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin), non-provitamin-A carotenoids (lutein, zeaxanthin, lycopene), α -tocopherol, γ -tocopherol and retinol.

The accuracy and precision of the analytical method employed was checked periodically through our participation in the 'Quality Assurance Programme' conducted by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, U.S.A.). We have tested our analytical method for retinol, α -tocopherol and β -carotene over several years and the results were rated, according to the National Institute of Standards and Technology, as 1 or 2 (meaning exceptional or acceptable values).

Statistical analysis

Univariate analysis, for comparison between men and women and among groups, and to study the influence of the duration of the disease and the presence of retinopathy, was carried out using non-parametric methods (Mann-Whitney *U*-test for unpaired data and Wilcoxon's *t*-test for paired data). Multivariate analysis, forward stepwise logistic multiple regression analysis and matched conditional logistic regression analysis were also used both in the group as a whole (men plus women) and adjusted for sex.

The statistical study was carried out by the BMDP Programme (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA, U.S.A.).

RESULTS

Table 2 shows the mean (95% confidence interval), median and 10th and 90th percentiles of all compounds in patients with IDDM, first-degree relatives and non-related controls, according to sex.

Sex-related differences

Differences between men and women were observed for retinol and α -carotene in all groups, whereas for β -carotene and β -cryptoxanthin, differences were not statistically significant in the patients with IDDM. No sex-related differences were observed in any of the groups for α -tocopherol,

γ -tocopherol, the α -tocopherol/cholesterol (α -T/C) ratio or non-provitamin A carotenoids (lutein, zeaxanthin and lycopene).

Related versus non-related controls

Univariate analysis to compare relatives and non-related controls (unpaired data) showed differences ($P < 0.05$) in most of the compounds except for lycopene in both sexes, for retinol and zeaxanthin in men and for γ -tocopherol in women (Table 2). Nevertheless, when multiple regression analysis was used, statistically significant differences were observed only for α -carotene (results not shown).

IDDM versus non-related controls

The men and women with IDDM showed significantly lower levels of retinol than their sex-matched, non-related controls ($P < 0.001$). However, while women differed only with regard to γ -tocopherol, men with IDDM showed lower α -tocopherol levels and α -T/C ratio and higher levels of β -cryptoxanthin ($P < 0.05$).

IDDM versus relative controls

On comparing the diabetic group and their first-degree relatives (unpaired data), the men and women with IDDM showed significantly lower levels

Table 2. Serum retinol, tocopherol and carotenoid levels in patients with IDDM, first-degree relatives (R-control) and non-related controls (NR-control). CI, confidence interval. Mann-Whitney U-test: $P < 0.05$. *Significant difference between sexes within group. †Significant difference versus sex-matched non-relative group. ‡Significant difference versus sex-matched relative group. §Significant difference versus sex-matched non-relative group.

	Men				Women			
	Mean (95% CI)	Median	10%	90%	Mean (95% CI)	Median	10%	90%
Retinol ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	1.52 (1.34–1.69)	1.40*†‡	1.12	2.21	1.26 (1.16–1.36)	1.27†‡	0.93	1.51
NR-control	1.91 (1.84–1.99)	1.92*	1.37	2.43	1.68 (1.60–1.75)	1.63	1.22	2.19
R-control	1.81 (1.68–1.90)	1.77*	1.14	2.52	1.50 (1.41–1.57)	1.42§	1.03	2.09
α-Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	27.0 (23.8–30.1)	25.5†	18.8	36.2	28.8 (26.0–31.7)	29.0	19.7	36.9
NR-control	31.1 (29.7–32.8)	29.5	22.1	40.9	30.8 (29.4–31.9)	30.0	22.8	39.5
R-control	27.4 (25.7–29.0)	25.8§	18.6	38.9	26.2 (24.8–27.6)	24.9§	17.7	39.9
γ-Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	1.32 (1.03–1.62)	1.27	0.51	2.08	1.34 (1.10–1.57)	1.20†	0.74	2.05
NR-control	1.03 (0.89–1.17)	0.86	0.54	1.77	0.79 (0.63–0.95)	0.78	0.40	1.30
R-control	1.26 (1.13–1.39)	1.18	0.55	2.13	1.29 (1.13–1.45)	1.18§	0.58	1.96
Lutein ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	0.19 (0.16–0.22)	0.17	0.11	0.27	0.22 (0.17–0.27)	0.20	0.10	0.38
NR-control	0.24 (0.21–0.26)	0.20	0.10	0.40	0.24 (0.22–0.27)	0.22	0.12	0.38
R-control	0.18 (0.16–0.20)	0.16§	0.09	0.30	0.20 (0.17–0.23)	0.16§	0.10	0.33
Zeaxanthin ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	0.06 (0.05–0.07)	0.06	0.04	0.09	0.06 (0.05–0.08)	0.07	0.02	0.11
NR-control	0.07 (0.06–0.08)	0.06	0.02	0.12	0.07 (0.06–0.08)	0.06	0.03	0.14
R-control	0.06 (0.06–0.07)	0.06*	0.03	0.10	0.06 (0.05–0.06)	0.05§	0.02	0.10
Lycopene ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	0.42 (0.34–0.50)	0.44	0.16	0.71	0.40 (0.32–0.49)	0.39	0.20	0.72
NR-control	0.41 (0.37–0.47)	0.35	0.14	0.70	0.45 (0.41–0.51)	0.41	0.13	0.84
R-control	0.38 (0.32–0.42)	0.35	0.14	0.76	0.39 (0.33–0.41)	0.34	0.14	0.76
β-Cryptoxanthine ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	0.55 (0.41–0.70)	0.47†‡	0.18	0.98	0.56 (0.42–0.70)	0.50†‡	0.20	1.08
NR-control	0.39 (0.34–0.44)	0.32*	0.11	0.72	0.60 (0.46–0.68)	0.45	0.18	1.14
R-control	0.34 (0.26–0.39)	0.24*§	0.10	0.66	0.47 (0.39–0.56)	0.31§	0.10	1.12
α-Carotene ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	0.06 (0.05–0.07)	0.06*†	0.03	0.10	0.09 (0.07–0.12)	0.08†	0.05	0.18
NR-control	0.08 (0.06–0.09)	0.06*	0.02	0.14	0.09 (0.08–0.10)	0.07	0.03	0.18
R-control	0.05 (0.04–0.05)	0.04*§	0.02	0.08	0.07 (0.06–0.08)	0.05§	0.02	0.12
β-Carotene ($\mu\text{mol/l}$)								
IDDM	0.31 (0.25–0.37)	0.29†	0.14	0.53	0.44 (0.34–0.55)	0.41†	0.13	0.94
NR-control	0.27 (0.24–0.31)	0.24*	0.09	0.49	0.38 (0.33–0.42)	0.31	0.14	0.77
R-control	0.22 (0.19–0.25)	0.19*§	0.08	0.40	0.32 (0.28–0.37)	0.24§	0.09	0.61

of retinol ($P < 0.005$) and higher levels of provitamin-A carotenoids (α -carotene, β -carotene and β -cryptoxanthin) ($P < 0.05$). No differences in non-provitamin A carotenoids, α -tocopherol, γ -tocopherol or the α -T/C ratio were observed among either men or women.

The findings in patients with IDDM and their first-degree relatives were compared within each family by paired data analysis; after adjustment for sex and age, the same differences were found except with respect to α -carotene in men (not significant) and α -tocopherol in women ($P < 0.05$) (results not shown). In this case, on applying matched conditional logistic regression analysis (Table 3), only retinol and β -carotene were shown to be associated with diabetes.

Multiple regression analysis to compare patients with IDDM and their first-degree relatives (men plus women) showed retinol, β -carotene and β -cryptoxanthin to be associated variables (results not shown). When the analysis was performed according to sex (Table 3), the model showed retinol and β -carotene to be significant variables in both sexes, whereas β -cryptoxanthin showed significance only in men. On applying this analysis to the non-related group (men plus women), only retinol (and sex) appeared to be significant in the model (results not shown). After adjusting for sex (Table 3), retinol showed statistical significance in both sexes, whereas provitamin-A carotenoids (α -carotene, β -carotene and β -cryptoxanthin) were significantly different only in men.

Duration of the diabetes mellitus and presence of retinopathy

When the results were assessed in terms of the duration of the disease (< 10 years, $n = 29$; > 10 years, $n = 25$), only α -tocopherol was found to increase significantly ($P < 0.037$) over the course of time, while lycopene showed a slight decrease ($P < 0.09$).

Retinopathy was present in older individuals ($n = 14$, all of whom had had IDDM for more than 10 years), but there were no differences in retinol levels between IDDM patients with and without retinopathy.

DISCUSSION

Previous results from our group [15] showed the status of fat-soluble vitamins and antioxidant related compounds to be altered in the serum of patients with IDDM when compared with a reference population. Thus, we decided to carry out a prevalence study using non-diabetic, first-degree relatives of the population with IDDM in order to control more closely certain factors (shared genetic factors, dietary habits, seasonal intake and analytical variability) that could affect the interpretation of the status of the compounds and the reliability of the data generated. We also compared the study patients with an unrelated non-diabetic population as a second control group for which these variables were not adjusted.

Table 3. Multivariate analysis between groups. Sig., significance; NS, not significant.

Matched conditional logistic regression analysis (paired data)						
Relatives versus IDDM						
	Men			Women		
	β -Coefficient	SE	Sig.	β -Coefficient	SE	Sig.
Retinol	-0.067	0.028	0.018	-0.127	0.048	0.009
β -Carotene	0.186	0.070	0.008	0.079	0.039	0.042
Forward stepwise multiple regression analysis (unpaired data)						
Relatives versus IDDM						
	Men			Women		
	β -Coefficient	SE	Sig.	β -Coefficient	SE	Sig.
Retinol	-0.048	0.019	0.012	-0.073	0.026	0.005
β -Carotene	0.064	0.033	0.054	0.037	0.016	0.020
β -Cryptoxanthin	0.029	0.013	0.021	—	—	NS
Non-related controls versus IDDM						
	Men			Women		
	β -Coefficient	SE	Sig.	β -Coefficient	SE	Sig.
Retinol	-0.106	0.028	0.000	-0.175	0.039	0.000
β -Carotene	0.097	0.045	0.032	—	—	NS
β -Cryptoxanthin	0.043	0.016	0.007	—	—	NS
α -Carotene	-0.545	0.204	0.008	—	—	NS

Serum carotenoids are known to be affected by several dietary and non-dietary factors [15–19]. In Spain, the seasonal consumption of several fruits and vegetables that contribute to carotenoid intake [20] is reflected in the serum levels of some of these substances [19]. In the present study, because the distribution throughout the year of the screened subjects was the same in all the groups, the differences in carotenoid levels observed among them do not seem to be due to a seasonal bias in sample collection. Taking into account that patients with IDDM and their relatives share genetic traits and, to some extent, dietary patterns, the differences found between the two groups might reflect an underlying abnormality in the carotenoid metabolism of individuals with diabetes, as was proposed in the 1930s and 1940s [21, 22]. In this respect, higher levels of 'carotene' [21–25] and, specifically, β -carotene [15, 26, 27] have been reported in IDDM.

Despite this, the higher levels of α -carotene, β -carotene and β -cryptoxanthin in patients with IDDM when compared with their first-degree relatives could also be due to differences in their consumption of specific fruits and vegetables (i.e. carrots and oranges), even within the same household. However, while this might be true for β -cryptoxanthin, given that the Spanish diet is largely dependent (85%) on a single contributor in winter and spring (oranges), the relationship is less clear in the case of β -carotene, only 25% of which is supplied by carrots, with over 50% being provided by green vegetables and tomato [20]. In this respect, the fact that the levels of lutein and lycopene, which are mainly provided by green vegetables and tomato respectively [28], do not differ significantly among these groups, suggests that the amounts consumed by each group do not vary to the extent that differences in their β -carotene concentrations would be determined by distinct dietary intake. Moreover, when paired data within each family (IDDM patient versus relative) were adjusted for sex and compared, nearly the same carotenoids remained significantly different in both sexes, regardless of whether the relative was age-matched or selected at random from among the family. In the multiple regression analysis, retinol and β -carotene were associated with diabetes, whereas the comparison between groups disclosed contrasts in the β -cryptoxanthin levels observed in men and women which may indicate differing dietary intakes.

Although smoking is associated with lower carotenoid status [16], this fact is probably not a determinant of the differences found in this study, as the lowest levels of α -carotene, β -carotene and β -cryptoxanthin do not coincide with the groups with the highest percentage of smokers, as would be expected, either among men or women.

Higher levels of carotenoids in IDDM may be a reflection of higher concentrations of lipids, or specifically of low-density lipoprotein (LDL), as the main carriers of carotenoids in serum. In this

respect, there are no differences between the lipid levels in patients with IDDM and controls, and the β -carotene/LDL ratio is significantly higher in individuals with IDDM than in their sex-matched relatives (results not shown), indicating that a greater amount of β -carotene is transported per mg of LDL in the IDDM group. Similarly, if the higher carotenoid levels associated with IDDM were a reflection of the higher lipid levels in this group, the concentrations of other analytes which, like β -carotene, are also transported mainly by LDL (e.g. α -tocopherol and lycopene) would be expected to be elevated, a circumstance that was not observed.

When patients with IDDM are compared with non-related controls, differences in β -carotene, α -carotene and β -cryptoxanthin levels disappear, with the exception of β -cryptoxanthin in men. While this finding could be related to day-to-day analytical variability and/or greater variability within the non-related group (as reflected by the standard deviation), multiple regression analysis again reveals a strong sex-related effect and indicates that lower retinol and higher β -carotene and β -cryptoxanthin levels are associated with diabetes in men, but that only retinol is a factor in women.

In the case of α -tocopherol, both elevated [3, 29–31] and normal levels [11, 15, 26, 32–34] have been reported in patients with IDDM. This situation may reflect the inclusion of hyperlipidaemic subjects and/or a lack of homogeneity in the sample screened [3, 11] and poor control [14], given that, on standardization with cholesterol, the levels are no different from those of normolipidaemic subjects [30, 32]. In the present study, neither α -tocopherol and γ -tocopherol in serum nor the α -T/C ratio show sex-dependent differences in any of the groups or when compared in patients with IDDM and their relatives.

With regard to serum retinol levels, those of patients with diabetes are consistently lower than those of sex-matched relatives and non-related controls. It is interesting to note that women show lower levels of retinol and, generally, higher levels of provitamin-A carotenoids than men, regardless of the group they belong to, a finding that has been observed before [15, 19, 22, 35].

Low, but not deficient, serum retinol levels in patients with IDDM have long been reported by other authors [15, 25–27, 36, 37] and could reflect an alteration in synthesis and/or transport by retinol-binding protein (RBP) [36], presence of lower levels of transthyretin [38] which might affect the formation of the complex with RBP-retinol, and/or increased RBP excretion rates, even in the absence of microalbuminuria [39, 40]. Although in the present study, microalbuminuria was not measured, none of the diabetic patients was on haemodialysis or showed clinical signs of nitrogen retention, having serum creatinine, urea and urate levels within normal ranges. Nevertheless, some of the subjects may have developed early or intermediate signs of

nephropathy (with hyperglycaemia-dependent micro-albuminuria), although under these conditions, lower retinol levels have been reported [37]. In addition, according to other authors [37, 41], patients with IDDM would be expected to show higher retinol levels in the presence of macroalbuminuria or renal failure.

Lower retinol levels in the patients with IDDM may also be a consequence of an acute phase response, febrile episodes or infections, which also decrease albumin and transthyretin concentrations and increase retinol-binding protein excretion [42, 43]. In the present study, although acute phase proteins (i.e. reactive C-protein) were not measured, all the patients with diabetes were apparently free of infection and fever, and serum albumin concentrations fell within the normal range.

Finally, while all the above-mentioned mechanisms may play a role in determining serum retinol levels in IDDM, it is also worth noting that we found no significant correlation with glucose metabolic control (HbA_{1c}, fructosamine), and that a low dietary provitamin-A carotenoid intake is probably not the cause, as reflected by the carotenoid levels. However, the possibility of an altered bioavailability of carotenoids (including conversion into retinol) cannot be ruled out, although conflicting results have been reported in this regard [21, 22, 44, 45].

Along with higher retinol levels, increased α -tocopherol concentrations have been reported in IDDM patients with nephropathy [37] and lower lycopene levels in individuals with chronic renal failure [41]. In our study, a history of diabetes of more than 10 years' duration is associated with higher α -tocopherol and slightly lower serum lycopene levels. This finding could be related to the presence of subjects with renal alterations in this group; however, the patients presented lower rather than higher retinol levels. Changes in the lipid profile could explain differences in α -tocopherol but, in this case, both analytes and other carotenoids would have behaved similarly. In our study, the slightly lower levels of lycopene might be explained by a small bias in sample collection given that a higher proportion of subjects were screened in spring (group with diabetes >10 years), whereas samples were taken from more individuals (diabetes <10 years) in summer, coinciding with a higher consumption of lycopene-rich foods among the Spanish population [20].

From a clinical viewpoint, the lower levels of retinol in the IDDM group place these subjects at higher risk for marginal serum retinol status. Regardless of the underlying reasons, it seems possible that retinol may be less available to tissues and/or retinol turnover might be altered, affecting the physiological functions of retinol and retinoids. In this respect, due to the implications of vitamin A in cell differentiation, proliferation and immune response, a marginal serum retinol status could play a role in, or reflect, the greater predisposition to

infections and skin alterations observed in diabetic subjects. The increased susceptibility to LDL oxidation and greater oxidative stress reported in subjects with IDDM [1, 32] are not in accordance with the serum concentrations of carotenoids and tocopherols observed in this study. Nevertheless, the presence of hyperglycaemia may have an impact on LDL composition (i.e. glycated LDL) [46] and/or the delivery to tissues [47], affecting the role of these compounds in target tissues and contributing to the accelerated vascular disease observed in patients with diabetes.

In conclusion, patients with IDDM showed normal or even higher fat-soluble antioxidant levels in serum and lower retinol concentrations than sex- (and age-) matched relatives and non-related controls. On the basis of these data, we consider that supplementation with fat-soluble antioxidants is not necessary in these patients, and that retinol concentrations should be monitored, and supplemented if necessary.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially funded by Lilly, S.A. (Spain). We thank Dr P. Manzano, T. Motilla and P. Martínez for their valuable support, M. Messman for her editorial assistance and Hoffmann-La Roche for providing carotenoid standards.

REFERENCES

- Schorah CJ, Bishop N, Wales JK, Haensbro PM, Habibzadeh M. Blood vitamin C concentrations in patients with diabetes mellitus. *Int J Vit Nutr Res* 1988; 58: 312-18.
- Caye-Vaugien C, Krempf M, Lámarche P, Charbonnel B, Pieri J. Determination of alpha-tocopherol in plasma, platelets and erythrocytes of type I and type II diabetic patients by HPLC. *Int J Vit Nutr Res* 1990; 60: 324-30.
- Gaby SK, Bendich A, Singh VN, Machlin LJ. Vitamin intake and health. A scientific review. New York: Marcel Dekker, 1991: 10.
- Mooradian AD, Failla M, Hoogwerf B, Maryniuk M, Wylie-Rosett J. Selected vitamins and minerals in diabetes. *Diabetes Care* 1994; 17: 464-79.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-67.
- Gisinger C, Jeremy J, Speiser P, Mikhailidis D, Dandona P, Schemthaner G. Effect of vitamin E supplementation on platelet thromboxane A2 production in type I diabetic patients. Double-blind crossover trial. *Diabetes* 1988; 37: 1260-4.
- Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care* 1991; 14: 68-72.
- Baker DW, Campbell RK. Vitamin and mineral supplementation in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Education* 1992; 18: 420-7.
- Kähler W, Kuklinski B, Rühlmann C, Plötz C. Diabetes mellitus - eine mit freien radikalen assoziierte erkrankung. Resultate einer adjuvanten antioxidantiensupplementation. *Innere Medizin* 1993; 48: 223-32.
- American Diabetes Association. Clinical practice recommendations 1996. Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1996; 19 (Suppl. 1): s16-19.
- Holler C, Ulberth F, Osterode W, Irsigier K. Selenium-status and serum levels of the antioxidant vitamins all-trans retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol in diabetic patients with and without retinopathy. In: Schlemmer U, ed. Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability. Proceedings Part I. Bundesforschungsanstalt für Ernährung, 1993: 235-8.
- Faure P, Benhamou PY, Perard A, Halimi S, Roussel AM. Lipid peroxidation in

- insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: effects of an oral zinc supplementation. *Eur J Clin Nutr* 1995; **49**: 282-8.
13. Farré R, Ruiz C, Alegria A, Barberá R, Lagarda MJ. Trace elements and antioxidant metalloenzymes in patients with type I diabetes. VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research. 1996: 194 (Abstract).
 14. Ndahimana J, Dorchy H, Vertongen F. Activité anti-oxydante érythrocytaire et plasmatique dans le diabète de type I. *Presse Med* 1996; **25**: 188-92.
 15. Olmedilla B, Granado F, Gil-Martínez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Reference levels of retinol, α -tocopherol and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem* 1997; **43**: 1066-71.
 16. Nierenberg DW, Stukel TA, Baron JA, Dain BJ, Greenberg ER and Skin Cancer Prevention Study Group. Determinants of plasma levels of beta-carotene and retinol. *Am J Epidemiol* 1989; **130**: 511-21.
 17. Saintot M, Astre C, Scali J, Gerber M. Within-subjects seasonal variation and determinants of inter-individual variations of plasma- β -carotene. *Int J Vit Nutr Res* 1995; **65**: 169-74.
 18. Erdman JW, Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. In: *Carotenoids in human health*. Ann NY Acad Sci 1993; **691**: 76-85.
 19. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Seasonal and sex-related variations in six serum carotenoids, retinol and alpha-tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1994; **60**: 106-10.
 20. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 1996; **50**: 50-50.
 21. Ralli EP, Brandaleone H, Mandelbaum T. Studies on the effect of the administration of carotene and vitamin A in patients with diabetes mellitus: I. The effect of the oral administration of carotene on the blood carotene and cholesterol of diabetic and normal individuals. *J Lab Clin Invest* 1935; **20**: 1266-75.
 22. Murrill WA, Horton PB, Leiberman E, Newburgh LH. Vitamin A and carotene: II. Vitamin A and carotene metabolism in diabetics and normals. *J Clin Invest* 1941; **20**: 395-400.
 23. Rabinowitch IM. Carotemia and diabetes: II. The relationship between the sugar, cholesterol and carotene contents of blood plasma. *Arch Intern Med* 1930; **45**: 586-92.
 24. Boeck WC, Yater WM. Xanthemia and xanthosis (carotemia): a clinical study. *J Lab Clin Med* 1929; **14**: 1129-43.
 25. Mosenthal HO, Loughlin WC. Vitamins A, B and C in diabetic children. *Arch Intern Med* 1944; **73**: 391-6.
 26. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas E. Retinol, tocopherols and carotenoids in insulin dependent diabetics and their immediate relatives. Second International Conference: Antioxidant vitamins and beta-carotene in disease prevention 1994: 84 (Abstract).
 27. Tamai H, Murata T, Morinobu MM, et al. β -Carotene and retinol in children with insulin-dependent diabetes mellitus. Second International Conference: Antioxidant vitamins and beta-carotene in disease prevention. 1994: 85 (Abstract).
 28. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J Agric Food Chem* 1992; **40**: 2135-40.
 29. Mooradian AD, Morley JE. Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1987; **45**: 877-95.
 30. Vandewoude MG, VanGaar LF, Vandewoude MF, De-Leeuw IH. Vitamin E status in normocholesterolemic and hypercholesterolemic diabetic patients. *Acta Diabetol Lat* 1987; **24**: 133-9.
 31. Krempf M, Ranganathan S, Ritz P, Morin M, Charbonnel B. Plasma vitamin A and E in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) adult diabetic patients. *Int J Vit Nutr Res* 1991; **61**: 38-42.
 32. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994; **43**: 1010-14.
 33. Colette C, Pares-Herbutte N, Monnier LH, Carry E. Platelet function in type I diabetes: effects of supplementation with large doses of vitamin E. *Am J Clin Nutr* 1988; **47**: 256-61.
 34. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; **98**: 469-75.
 35. Kimble MS, Germek OA, Sevringhaus EL. Vitamin A and carotene metabolism in the diabetic as reflected by blood levels. *Am J Med Sci* 1946; **212**: 574-85.
 36. Basu TK, Tze WJ, Leichter J. Serum vitamin A and retinol-binding protein in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1989; **50**: 329-31.
 37. Martinoli L, Di Felice M, Seghieri G, et al. Plasma retinol and α -tocopherol concentrations in insulin-dependent diabetes mellitus: their relationship to microvascular complications. *Int J Vit Nutr Res* 1993; **63**: 87-92.
 38. Gebre-Medhin M, Ewald U, Tuvemo T. Reduced serum proteins in diabetic children on a twice-daily insulin schedule. *Acta Paediatr Scand* 1985; **74**: 961-5.
 39. Catalano C, Winocour PH, Gillespie S, Gibb I, Alberti KGMM. Effect of posture and acute glycaemic control on the excretion of retinol-binding protein in normoalbuminuric insulin-dependent diabetic patients. *Clin Sci* 1993; **84**: 461-7.
 40. Dubrey SW, Beetham R, Miles J, Noble MIM, Rowe R, Leslie RDG. Increased urinary albumin and retinol-binding protein in type I diabetes. *Diabetes Care* 1997; **20**: 84-9.
 41. Ha TKK, Sattar N, Talwar D, et al. Abnormal antioxidant vitamin and carotenoids status in chronic renal failure. *Q J Med* 1996; **89**: 765-9.
 42. Thurnham DI. Anti-oxidant vitamins and cancer prevention. *J Micronutr Anal* 1990; **7**: 279-9.
 43. Stephensen CB, Alvarez JO, Kohatsu J, Hardmeier R, Kennedy Jr JJ, Gammon Jr RB. Vitamin A is excreted in the urine during acute infection. *Am J Clin Nutr* 1994; **60**: 388-92.
 44. Heymann W. Carotenemia in diabetes. *JAMA* 1936; **106**: 2050-52.
 45. Ramachandran K. Beta-carotene metabolism in diabetes. *Indian J Med Res* 1973; **61**: 1831-4.
 46. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994; **94**: 771-8.
 47. Kunisaki M, Umeda F, Yamauchi T, Masakado M, Nawata H. High glucose reduces specific binding for α -tocopherol in cultured aortic endothelial cells. *Diabetes* 1993; **42**: 1138-46.

