

Efecto citomolecular de la vitamina E combinada con sulfato ferroso: un modelo *in vitro* sobre el tratamiento preventivo de la anemia durante la primera infancia

Citomolecular effect of vitamin E and ferrous sulfate: an *in vitro* model on preventive treatment of anemia during early childhood

 Rocío Celeste Gambaro¹ |  Melisa Mantella^{1, 2} |  Analía Seoane¹
 Gisel Padula^{1,2*}

1) IGEVET. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina Consejo Nacional de Investigaciones científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires. Argentina. **2)** Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina

REVISTA ARGENTINA DE
ANTROPOLOGÍA BIOLÓGICA

Volumen 23, Número 1
Enero-Junio 2021

Financiamiento: este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del CONICET (PIP No. 0657) y de la Universidad Nacional de La Plata (Proyecto 11/V246).

*Correspondencia a: Gisel Padula. IGEVET. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 118 y 60 s/n. 1900 La Plata. Argentina.
E-mail: giselpadula@yahoo.com.ar

RECIBIDO: 24 de Abril 2020

ACEPTADO: 16 de Octubre 2020

DOI: [10.24215/18536387e031](https://doi.org/10.24215/18536387e031)

e-ISSN 1853-6387

<https://revistas.unlp.edu.ar/raab>

Entidad Editora
Asociación de Antropología Biológica
Argentina

Resumen

Dado que la anemia afecta el normal crecimiento y desarrollo de los niños, la Sociedad Argentina de Pediatría recomienda la suplementación preventiva diaria con sulfato ferroso. Sin embargo, el tratamiento diario puede llevar a la sobrecarga tisular de hierro provocando daño sobre proteínas, lípidos y ADN. Con el propósito de eludir estos efectos no deseados, ha surgido como alternativa la posibilidad de implementar un tratamiento alternativo que consiste en la suplementación semanal. Por otra parte, la vitamina E, es el antioxidante no enzimático liposoluble más importante y esencial en la defensa celular. A raíz de esto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la vitamina E sobre el sulfato ferroso en sus dos formas de administración (semanal y diaria) en linfocitos de sangre periférica humana cultivados *in vitro*. Se llevó a cabo el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, y se realizaron 8 tratamientos que incluyen los respectivos controles y tratamientos combinados de sulfato ferroso diario y semanal con dos dosis de vitamina E. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas para la frecuencia de micronúcleos ($F=840,04$; $p=0,0$). Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron un efecto protector de la vitamina E, disminuyendo el daño que el sulfato ferroso ocasiona. Sumado a esto, se corroboró que la administración del mismo en dosis únicas semanales provoca menor daño cromosómico que en dosis diarias. Rev Arg Antrop Biol 23(1), 2021. doi:10.24215/18536387e031

Palabras Clave: sulfato ferroso; vitamina E; micronúcleos

Abstract

Iron deficiency is one of the most prevalent deficiencies during childhood, and also one of the main causes of anemia. Since anemia affects normal child growth and development, the Argentine Society of Pediatrics recommends preventive daily supplementation with ferrous sulfate. However, daily ferrous sulfate treatment may induce iron tissue overload, resulting in damage to proteins, lipids, and DNA. In order to avoid these undesired effects, a possible alternative is to implement weekly ferrous sulfate supplementation. Vitamin E is the main liposoluble non-enzymatic antioxidant for cell defense. This study evaluated the combined effect of vitamin E and ferrous sulfate supplementation (daily and weekly) on human peripheral blood lymphocytes cultured *in vitro* using the cytokinesis-blocked micronucleus assay. Eight treatments were conducted, including controls and combined treatments of daily and weekly ferrous sulfate with vitamin E. Differences were significant for micronucleus frequency ($F=840.04$; $p=0.0$). In conclusion, a protective effect of vit E on cell components with lower genotoxic damage on weekly ferrous sulfate treatment could be observed. *Rev Arg Antrop Biol* 23(1), 2021. doi:10.24215/18536387e031

Keywords: ferrous sulfate; vitamin E; micronucleous

Durante toda la vida, la alimentación juega un papel esencial en el desarrollo del niño, pero aún más en momentos de crecimiento acelerado. Una nutrición adecuada constituye un proceso complejo, en el cual intervienen no sólo factores económicos sino también culturales, los cuales inciden tanto en los hábitos alimentarios como en los factores sanitarios, entre otros. El acceso a una alimentación “aceptable, suficiente y adecuada”, que depende de los ingresos y del costo de los alimentos, resulta restringida para amplios sectores de la población. En el caso de Argentina, no se encuentra garantizada la equidad alimentaria, es decir, “que todas las personas en especial los más pobres, tengan un acceso a una alimentación culturalmente aceptada, nutricionalmente adecuada, variada y suficiente para desarrollar su vida” (Aguirre, 2005). Dicha inequidad compromete la salud de amplios sectores, especialmente aquellos de recursos más bajos (Bergel Sanchís, Cesani y Oyhenart, 2017).

Las deficiencias de micronutrientes requieren de cierta instrumentación para su diagnóstico y dado que no se detectan por antropometría, es importante el diseño de modelos experimentales *in vitro* que permitan investigar el efecto de estas deficiencias y aportar información que pueda favorecer el desarrollo de políticas de prevención adecuadas (González, Varea y Malpeli, 2006). Las mismas deberían hacer hincapié en la importancia de la educación nutricional, avocada a la concientización del problema y la generación de una vigilancia social que traspase los marcos de los programas prediseñados (Molina, 2009).

La anemia afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial, tanto de los países desarrollados como de aquellos en desarrollo. La mitad de los casos se deben a la deficiencia de hierro (Lopez, Cacoub, Macdougall y Peyrin-Biroulet, 2016). Sus causas son multifactoriales y, frecuentemente, pueden coexistir varias de ellas (Population, Health and Nutrition Information (PHNI), 2003). En nuestro país, numerosos estudios demuestran que la prevalencia de anemia y de deficiencia de hierro son muy elevadas (Apezteguia, Varea, Disalvo, Malpeli y Gonzales, 2008; Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional y Comité Nacional de Nutrición, 2017; Falivene y Fatore, 2016; González *et al.*, 2006; 2007; Malpeli *et al.*, 2006; Sguassero, Guerrero y Romero, 2018).

La anemia por deficiencia de hierro (ADH) es una condición patológica, en la cual no hay suficiente mineral para la síntesis de proteínas y enzimas que lo contienen, tales como hemoglobina, mioglobina y catalasas (Aksu *et al.*, 2010). Dicha patología tiene un mayor impacto cuando ocurre en etapas tempranas de la vida, durante la primera infancia. En el caso de los niños de 0 a 5 años, afecta tanto el desarrollo, a través de la disminución de la atención, dificultades del aprendizaje y disminución en el desempeño cognitivo; como el crecimiento, pudiendo ocasionar un retardo crónico o una disminución de la velocidad del mismo (Algarín, Peirano, Garrido, Pizarro, Lozoff, 2003; Beard, 2001; Carter *et al.*, 2010; Clark, 2008; González *et al.*, 2007; Lozoff *et al.*, 2007; Rivera, Hotz, González-Cossío, Neufeld y García-Guerra, 2003), alterando los aspectos físicos, mentales y sociales de la salud del niño.

La recomendación actual de la Sociedad Argentina de Pediatría (Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional y Comité Nacional de Nutrición, 2017) es la suplementación preventiva diaria con sulfato ferroso a partir de los 2 meses de vida para los nacidos de término alimentados con leche de vaca no fortificada y aquellos con lactancia materna que reciben alimentación complementaria inadecuada con bajo contenido de hierro. A pesar de ello, la adherencia a la suplementación es baja, por lo tanto, la prevalencia de esta patología continúa siendo muy alta en los niños menores de 2 años (Linetzky, Morello, Virgolini, Ferrante, 2011). Como alternativa, en niños y embarazadas, la suplementación semanal ha demostrado ser eficaz en la prevención de la ADH (De Regil, Jefferds, Sylvetsky y Dowswell 2011; Mozaffari Khosravi, Noori-Shadkam, Fatehi y Naghiaee, 2010; Peña-Rosas, De Regil, Malave, Flores Urrutia y Dowswell, 2015; World Health Organization, 2001) pero la evidencia en lactantes es escasa (de Camargo *et al.*, 2008; Yurdakök, Temis, Yalçin y Gümrük, 2004). La dosis semanal permitiría optimizar la absorción a través de los mecanismos de transporte y disminuir así dichos síntomas. Cuenta con otras ventajas, tales como mayor adherencia y cumplimiento, y menores efectos adversos (Eickmann, Brito, Lira y Lima, 2008; Fernández Gaxiola y De Regil, 2019).

Por otro lado, el tratamiento diario preventivo puede llevar a la producción de un cuadro de sobrecarga tisular de hierro. Las alteraciones en la estructura y función celular causadas por la sobrecarga del mismo parecen estar fundamentalmente relacionados con el daño mediado por radicales libres a componentes celulares, tales como proteínas, lípidos y ADN (Jomova y Valko, 2011; Lin, Li, Jia, Ward y Kaplan, 2011; Prá, Franke, Henriques y Fenech, 2012). Este daño puede ser permanente (Aksu *et al.*, 2010) y es aceptado como uno de los principales mecanismos subyacentes a la ocurrencia de ciertas enfermedades crónicas y a daños no deseados por intoxicación (Fraga y Oteiza, 2002; Toxqui *et al.*, 2010). Sin embargo, las células han desarrollado diversos mecanismos para reducir la toxicidad de los iones de hierro, los cuales incluyen la regulación del transporte del hierro a través de las membranas, la producción de enzimas antioxidantes (AO) y el aprovechamiento de los antioxidantes no enzimáticos introducidos por la ingesta. Un antioxidante es, como definición general, cualquier sustancia capaz de prevenir la oxidación. La vitamina E, es el AO no enzimático liposoluble más importante y se lo considera esencial en la defensa celular. En varios estudios, realizados *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que la vitamina E puede prevenir el daño ocasionado por el hierro (Fraga y Oteiza, 2002; Kajarabille y Latunde-Dada, 2019; Tang *et al.*, 2016).

En trabajos previos, llevados a cabo *in vitro* por nuestro grupo de investigación (Gambaro, Seoane y Padula *et al.*, 2018 a y b), se pudo observar que el tratamiento semanal tiene tendencia a provocar menor estrés oxidativo y, concomitantemente, menor daño genómico que el tratamiento preventivo diario de la ADH. El objetivo del presente trabajo

es evaluar el efecto de la vitamina E sobre ambas modalidades de suplementación preventiva de la anemia ferropénica (diaria y semanal), y comprobar si la capacidad de este antioxidante logra disminuir el daño genotóxico inducido por el sulfato ferroso.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló *in vitro* con la utilización de cultivos de linfocitos de sangre periférica humana. Esta metodología se considera eficaz y adecuada para determinar el efecto del hierro sobre el daño genómico. Se optó por no realizar un aislamiento de los linfocitos previo al cultivo, debido a que la presencia de los componentes del plasma y el paquete eritrocitario es necesaria para reproducir con la mayor fidelidad posible las condiciones fisiológicas en las que funciona el sistema y su interacción con los micronutrientes.

Diseño Experimental

Se llevó a cabo un protocolo *in vitro*, donde se establecieron cuatro controles y cuatro tratamientos combinados con sulfato ferroso (SO_4Fe) y vitamina E, según se detalla a continuación.

Se establecieron un control negativo (CN), en el cual las células no recibieron ningún tratamiento adicional, y un control positivo (CP), en el cual las células se trataron con bleomicina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), un reconocido agente inductor de daño genotóxico y citomolecular. Por otro lado, se establecieron dos tratamientos control de las dosis de vitamina E utilizadas: en uno las células se trataron con 8,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (T 8,3) y en el otro con el doble de la dosis, 16,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (T 16,6). El objetivo de estos controles es poder descartar un posible efecto tóxico propio de la vitamina E en estas dosis.

Respecto de los tratamientos combinados, se establecieron cuatro experimentos: el tratamiento con hierro diario con 0,14 mg/ml SO_4Fe y 8,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vitamina E (HD 8,3); el tratamiento con hierro diario con 0,14 mg/ml SO_4Fe y 16,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vitamina E (HD 16,6); el tratamiento con hierro semanal 0,55 mg/ml SO_4Fe y con 8,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vitamina E (HS 8,3) y, por último, el tratamiento con hierro semanal 0,55 mg/ml SO_4Fe y con 16,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vitamina E (HS 16,6).

Para simular *in vitro* los efectos del sulfato ferroso (Ferdrómaco Pediátrico, laboratorios Andrómaco, Buenos Aires, Argentina), se utilizaron las concentraciones publicadas en Gambaro *et al.* (2018 a). Para la vitamina E (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), se establecieron 2 concentraciones, donde la más baja corresponde a la ingesta recomendada por día (4 mg/día) y la más alta al doble de la misma calculados para 10 ml de medio de cultivo (vitamina E: 8,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 16,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Condiciones de cultivo

Luego de la firma del consentimiento informado, se obtuvo una muestra de sangre de donantes sanos, la cual se recogió por punción venosa con jeringa heparinizada y se cultivó en frascos Falcon T-25 (Nunc, Denmark) utilizando como medio base al HAM F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sin suero fetal bovino y con antibióticos (60UI de Penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Estreptomina) (Bagó Laboratorio, Buenos Aires, Argentina). La estimulación de los linfocitos se logró con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fitohemaglutinina (GibcoThermo Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina). Las muestras se cultivaron a 37° C en 5% de CO_2 , durante 7 días (Fenech, 2007). Para los protocolos *in vitro* no se ha establecido un nú-

mero mínimo de donantes, pero teniendo en cuenta que para los trabajos *in vivo* se utiliza un mínimo de 5 donantes (MacGregor *et al.*, 1989), en este trabajo se decidió trabajar con un pool génico (teniendo en cuenta grupo y factor sanguíneo) de 10 individuos de sexo femenino de entre 30 y 40 años de edad.

El protocolo cuenta con la aprobación del Comité Consultivo Central de Bioética (CCCB) de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina) y se ha respetado la letra y el espíritu de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (Finlandia, 1964) y sus sucesivas enmiendas de 1975, 1983, 1989, 1996 y 2000.

Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo para una estimación precisa de la variación experimental y luego fueron calculados la media y el desvío estándar.

Daño genotóxico

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN): Actualmente el Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN) se constituye como uno de los métodos más adecuados para evaluar las fluctuaciones de los micronutrientes, ya sea que se encuentren por demás o en menor cantidad de lo recomendado (Fenech, 2010). En el presente ensayo, se analiza la presencia de micronúcleos y otras alteraciones nucleares en células binucleadas (BN). Para ello, se emplea citocalasina B, una sustancia que se extrae del hongo *Helminthosporium dematioideum*, y que, en pequeñas concentraciones, inhibe la citocinesis y la movilidad celular dando como resultado células que han separado sus núcleos, pero no sus citoplasmas.

Las alteraciones que se analizan con este ensayo son principalmente los micronúcleos, que provienen de un fragmento cromosómico o un cromosoma entero que quedó relegado en anafase durante la división celular (MNi) (Fenech, 2010). También se cuantifican los brotes nucleares (NBuds), que son estructuras similares a vesículas unidas a alguno de los 2 núcleos principales, y los puentes nucleoplásmicos (NPBs), que se reconocen justamente por formar un puente entre los núcleos de una célula BN y son indicadores de rearrreglos cromosómicos (Fenech, 2003; Umegaki y Fenech, 2000).

Para poder llevar a cabo este ensayo se debe asegurar que la mayoría de las células contadas derivan de la primera o de la primera y segunda división luego del tratamiento (Fenech, 2002; 2007; 2010). Para esto debe calcularse la proliferación celular de la siguiente forma:

Índice de división nuclear (NDI) = 1 x no. de células mononucleadas + 2 x no. de células binucleadas + 3 x no. de células tri y tetranucleadas / no. total de células contadas (500).

Estimativamente 30 hs. antes de terminar el cultivo se adiciona la citocalasina B (3 ug/ml) (*Sigma, St. Louis, MO, USA*). Una vez finalizado el mismo se trasvasa el contenido del frasco a un tubo Falcon y se centrifuga por 10 minutos a 1200 rpm. Luego se saca el sobrenadante y se agrega la solución hipotónica fría (CIK 0,075 M). Inmediatamente, se centrifuga nuevamente por 6 minutos a 1200 rpm y se procede a sacar el sobrenadante y agregar el fijador I (cloruro de sodio-metanol-ácido acético 6:5:1). Posteriormente, se realizan dos cambios más con fijador II (metanol-ácido acético 5:1) por 10 minutos a 1200 rpm. Luego de 24 hs. de reposo en heladera, se procede al goteo del material en portaobjetos. Los preparados se tiñen con colorante Giemsa durante 10 minutos, el mismo se prepara con agua y Giemsa al 5% según se especifica en el protocolo. Por último, se procede al análisis de 1000 células por punto experimental de acuerdo a los criterios de Fenech (Fenech, 2007).

Análisis estadístico

Las frecuencias de los biomarcadores descriptos fueron analizadas y comparadas con el programa estadístico Statgraphics® 5.1 software (Manugistics Inc., Rockville, MD). Dado que los resultados respondían a una distribución normal tanto el IDN, como los MNi y los NPBs se analizaron por medio del test de Anova Simple. Para poder visualizar la homogeneidad al interior de los grupos se realizó el test de grupos homogéneos. En el caso de los NBuds que no se correspondían con una distribución paramétrica se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

En la [Tabla 1](#), se resumen las frecuencias de los cuatro biomarcadores analizados (IDN, MNi, NPBs y NBuds). En el caso del IDN, se observa que los valores de los controles se encuentran ligeramente por encima de los correspondientes a los tratamientos combinados. En el caso de la frecuencia de MNi, se puede observar como los tratamientos con hierro diario muestran valores más altos que aquellos con hierro semanal, y que aquellos con la concentración más elevada de vitamina E poseen menores frecuencias de esta alteración. En el caso de los NPBs y NBuds las frecuencias son bajas en todos los tratamientos, sin embargo, la tendencia se corresponde con los valores de referencia que propone Fenech, 2007.

Tabla 1. Valores promedio y desvío estándar (entre paréntesis) para índice de división nuclear, micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares. Los valores corresponden a la proporción de alteraciones en 1000 células

| Tratamiento | IDN | MNi ‰ | NPBs ‰ | NBuds ‰ |
|-------------|---------------|--------------|------------|------------|
| CN | 1,136 (0,001) | 1,32 (0,001) | 0,0 (0,0) | 0 |
| CP | 1,06 (0,007) | 4,1 (0,141) | 0,7 (0,14) | 0,3 (0,07) |
| T 8,3 | 1,108 (0,007) | 1,11 (0,007) | 0,0 (0,7) | 0 |
| T 16,6 | 1,114 (0,001) | 1,09 (0,007) | 0,0 (0,0) | 0 |
| HD 8,3 | 1,062 (0,001) | 2,47 (0,007) | 0,2 (0,07) | 0 |
| HD 16,6 | 1,074 (0,001) | 2,41 (0,014) | 0,1 (0,07) | 0 |
| HS 8,3 | 1,074 (0,003) | 2,22 (0,014) | 0,1 (0,07) | 0 |
| HS 16,6 | 1,08 (0,002) | 2,14 (0,014) | 0,0 (0,0) | 0 |

En lo que respecta a la proliferación celular (IDN), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F= 114,11$ $p=0,0$) a través del ensayo de ANOVA Simple. A partir del análisis por contraste de múltiples rangos se observaron cuatro grupos: a. control negativo (CN); b. controles con vitamina E (T 8,3 y T 16,6); c. tratamientos semanales combinados con vitamina E (HS 8,3 y HS 16,6) y tratamiento diario con la dosis más alta de vitamina E (HS 16,6); d. tratamiento diario con la dosis más baja de vitamina E (HD 8,3) y control positivo (CP). De todos los tratamientos combinados, aquel con la suplementación semanal y la dosis más alta de vitamina E (HS 16,6), presentó el mayor IDN ([Figura 1](#)). El control negativo, presentó el IDN más elevado y el control positivo con bleomicina los valores más bajos.

Los MNi, NPBs y NBuds se analizaron en 1.000 células binucleadas. El test de ANOVA Simple evidenció diferencias estadísticamente significativas ($F= 840,04$; $p= 0,0$) sólo para

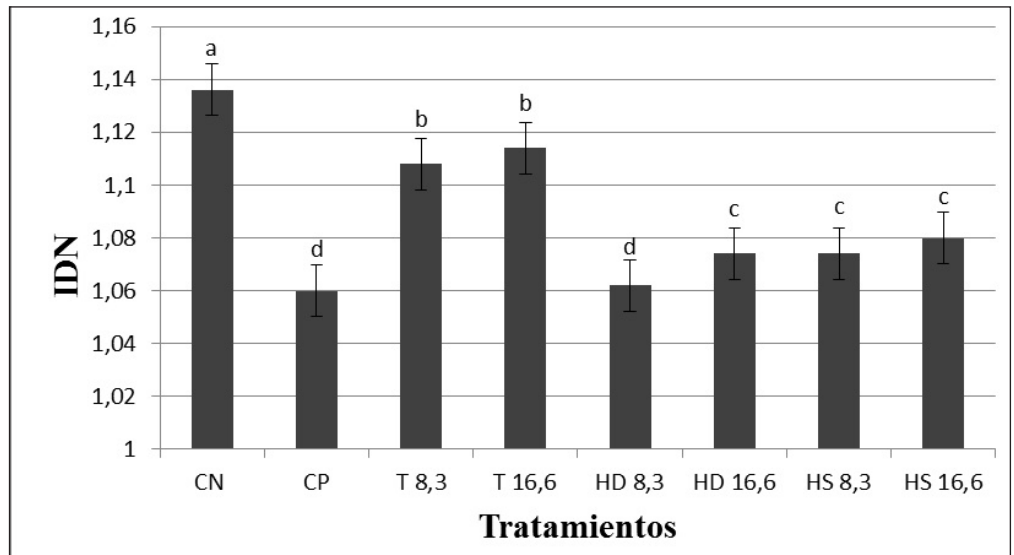


FIGURA 1. Índice de División Nuclear. Las barras de error indican el desvío estándar. Control Negativo (CN), Control Positivo (CP), Tratamiento 8,3 (T 8,3) Tratamiento 16,6 (T 16,6) Hierro Diario (HD 8,3 y HD 16,6) Hierro Semanal (HS 8,3 y HS 16,6). Los grupos que no comparten la misma letra, son significativamente diferentes entre sí (los valores de P se refieren al análisis de ANOVA: $p < 0,05$). De todos los tratamientos combinados, aquel con la suplementación semanal y la dosis más alta de vitamina E (HS 16,6), presentó el mayor IDN.

la frecuencia de MNi. Se diferenciaron 4 grupos: a. control negativo (CN) y ambos controles con vitamina E (T 8,3 y T 16,6); b. ambos tratamientos semanales (HS 8,3 y HS 16,6); c. ambos tratamientos diarios (HD 8,3 y HD 16,6); d. control positivo (CP). Se observó un aumento significativo de micronúcleos en los tratamientos diarios respecto de los semanales (Figura 2) y, además, se pudo observar menor frecuencia de daño cromosómico a mayor concentración de vitamina E, aunque estas observaciones no resultaron estadísticamente significativas. Los tratamientos con hierro diario tuvieron frecuencias mayores de MNi que los semanales.

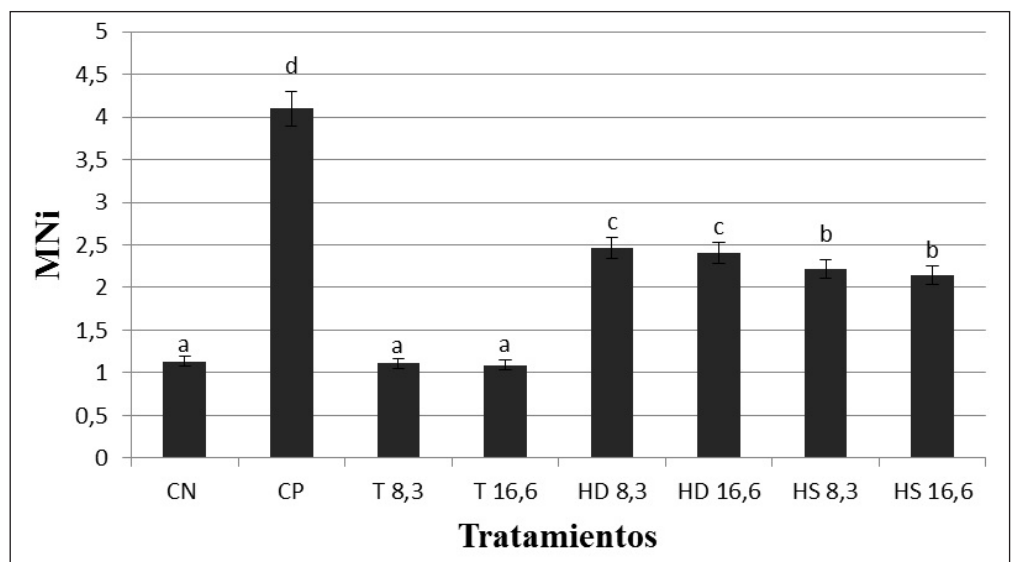


FIGURA 2. Frecuencia de Micronúcleos. Las barras de error indican el desvío estándar. Control Negativo (CN), Control Positivo (CP), Tratamiento 8,3 (T 8,3) Tratamiento 16,6 (T 16,6) Hierro Diario (HD 8,3 y HD 16,6) Hierro Semanal (HS 8,3 y HS 16,6). Los grupos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí (los valores de P se refieren al análisis de ANOVA: $p < 0,05$). Se observó un aumento significativo de micronúcleos en los tratamientos diarios respecto de los semanales y una menor frecuencia de daño cromosómico a mayor concentración de vitamina E.

Cuando se analizaron las frecuencias de NPBs, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F=2,54$; $p=0,107$) (Figura 3). Dado que las frecuencias de los NBuds no responden a una distribución paramétrica, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ($E=12,63$; $p=0,082$). Dentro de la comparación de a pares, sólo resultaron estadísticamente significativas las diferencias entre el control positivo y los demás tratamientos (Figura 4).

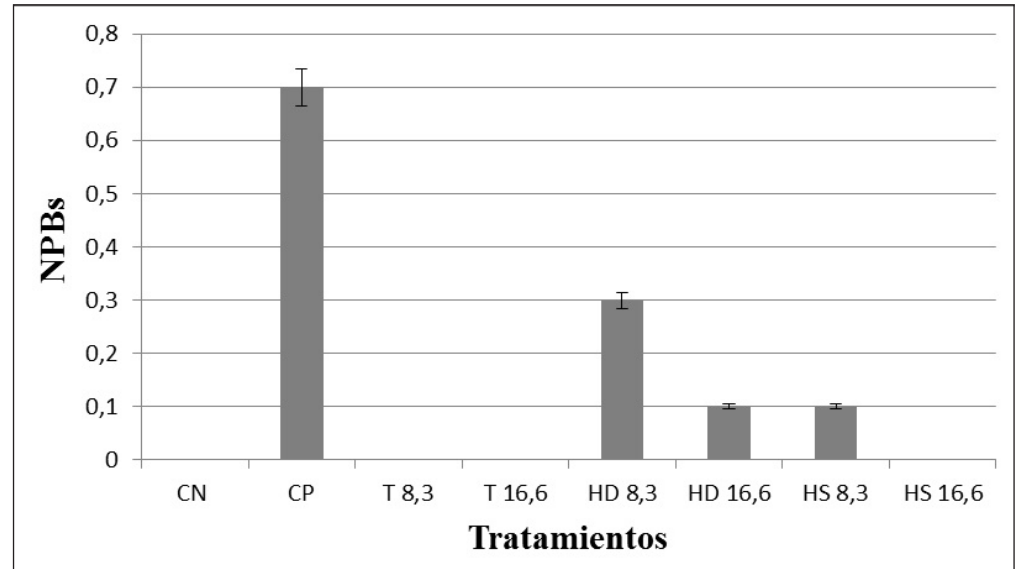


FIGURA 3. Frecuencia de Puentes Nucleoplásmicos. Las barras de error indican el desvío estándar. Control Negativo (CN), Control Positivo (CP), Tratamiento 8,3 (T 8,3) Tratamiento 16,6 (T 16,6) Hierro Diario (HD 8,3 y HD 16,6) Hierro Semanal (HS 8,3 y HS 16,6). Cuando se analizaron las frecuencias de NPBs, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas entre los tratamientos.

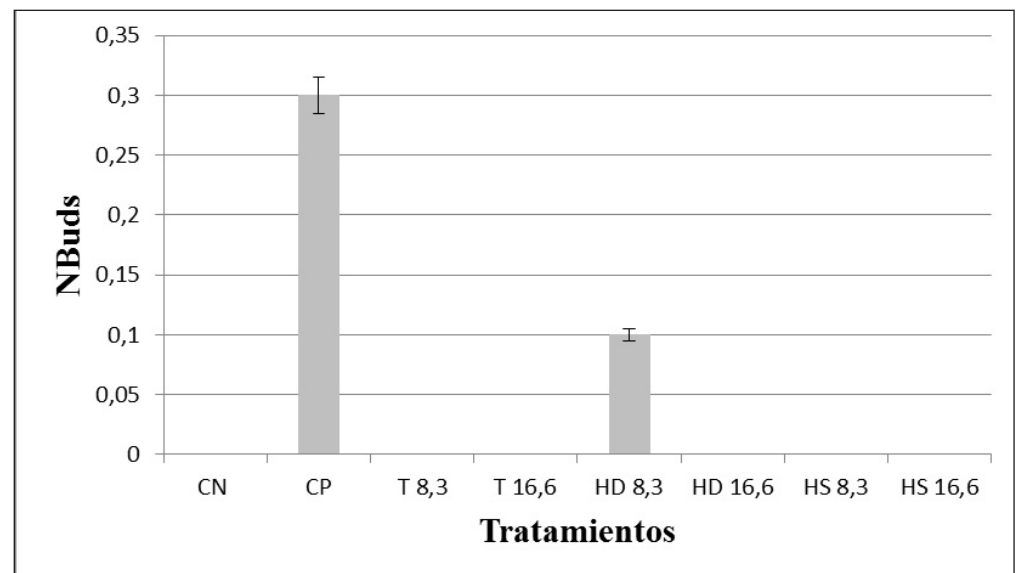


FIGURA 4. Frecuencia de Brotes Nucleares. Las barras de error indican el desvío estándar. Control Negativo (CN), Control Positivo (CP), Tratamiento 8,3 (T 8,3) Tratamiento 16,6 (T 16,6) Hierro Diario (HD 8,3 y HD 16,6) Hierro Semanal (HS 8,3 y HS 16,6). Sólo resultaron estadísticamente significativas las diferencias entre el control positivo y los demás tratamientos.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que en trabajos previos de nuestro grupo (Gambaro *et al.*, 2018 a), se pudo observar que el tratamiento semanal con sulfato ferroso ocasiona menos daño

en el material genético que el tratamiento diario; y dado que la vitamina E constituye uno de los antioxidantes liposolubles más importante del organismo, se planteó evaluar su efecto en ambos tratamientos. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto de la vitamina E, sobre ambas formas de suplementación con sulfato ferroso (diario y semanal) respecto de la inducción de daño cromosómico.

Para analizar la proliferación celular, se reparó en los resultados del IDN. En este trabajo, se puede observar que el tratamiento semanal presentó un IDN mayor que el tratamiento diario. Respecto al agregado de vitamina E ambas dosis mejoran la proliferación celular y, por ende, atenuarían los efectos citotóxicos del sulfato ferroso, sobre todo en los tratamientos con dosis más altas. Respecto de los controles con ambas dosis de vitamina E, si bien se pudo observar un mayor índice de división nuclear en la dosis más alta, dicho aumento no resultó significativo. Resultados similares fueron reportados por Avula y Fernandes (2000), que observaron que la suplementación con vitamina E en la dieta favorecería la proliferación celular y disminuiría la muerte celular programada al reducir los peróxidos lipídicos en un ensayo con ratones *in vivo* (Avula y Fernandes, 2000). Los valores de IDN observados para todos los tratamientos fueron menores que los publicados por Fenech (2007) para linfocitos humanos. Estas diferencias pueden ser adjudicadas a la menor concentración de citocalasina B utilizada (Fenech, 2007) y también al extenso tiempo de cultivo que requiere el protocolo llevado a cabo.

Con respecto a los resultados para los demás biomarcadores, observamos que la frecuencia de MNi para el control negativo y ambos tratamientos control de vitamina E fueron las más bajas entre todos los tratamientos. Por otra parte, la frecuencia de MNi de los tratamientos con sulfato ferroso semanal es significativamente inferior a la observada para los tratamientos diarios. De todos modos, a pesar de observarse estas diferencias, ambas frecuencias se encuentran dentro de los parámetros de normalidad establecidos por Fenech (2007), hecho esperable dado que se trata de dosis correspondientes a suplementación preventiva de la anemia. Sin embargo, en lo que respecta a los resultados aquí obtenidos el tratamiento semanal genera menor efecto genotóxico que el tratamiento diario, lo que podría ser un punto de partida para rever las normas actuales de profilaxis. En la bibliografía analizada, al igual que en el presente trabajo, se observa un aumento del daño genético en relación al aumento de los niveles de sulfato ferroso (Franke, Prá, Silva, Erdtmann y Henriques 2005; Gambaro *et al.*, 2018 a y b; Jomova y Valko, 2011; Lin *et al.*, 2011; Prá *et al.*, 2008; Premkumar y Bowlus, 2003).

En los resultados aquí reportados, se puede observar una clara tendencia hacia un menor daño con las dosis más altas de vitamina E (16,6) aunque dichas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. La bibliografía publicada respecto de la combinación entre el sulfato ferroso y la vitamina E, está fundamentalmente basada en los efectos del tratamiento terapéutico de la anemia y resulta contradictoria. Claycombe y Meydani (2001) proponen que la vitamina E, al ser el antioxidante lipídico más potente, podría reducir el daño cromosómico inducido por los radicales libres mediante la inhibición de la formación de los mismos y la activación de las endonucleasas que aumentan la tasa de eliminación del ADN dañado (Claycombe y Meydani, 2001); mientras que Tang y colaboradores (2016), plantean que adicionar vitamina E a la suplementación terapéutica con hierro disminuye los efectos perjudiciales del hierro en la comunidad microbiana en el tracto intestinal y, a su vez, al disminuir la inflamación podría favorecer la absorción del hierro (Tang *et al.*, 2016). Por otra parte, Wawrzyniak y colaboradores (2013) sugieren, a partir de la experimentación en un modelo de ratones, que el α -tocoferol, el ácido ascórbico y el β -caroteno, cuando se administran simultáneamente, tienen principalmente

efectos antioxidantes sobre la peroxidación lipídica (Wawrzyniak *et al.*, 2013). Riffle y colaboradores (2018) observaron, en un modelo de ratones, que tanto la vitamina C como la vitamina E favorecen a la eliminación de especies reactivas de oxígeno y ayudan a normalizar el estado oxidativo de la médula espinal alterado por el dolor (Riffel *et al.*, 2018). En discordancia con estos resultados, otros autores no encontraron ningún tipo de efecto protector de la vitamina E contra el daño oxidativo. Record y Jannes (2000), hallaron que la suplementación con vitamina E no tendría efecto protector contra el daño genómico oxidativo en esplenocitos sometidos a estrés oxidativo *ex vivo* (Record y Jannes, 2000). A su vez, Fenech, Dreosti y Aitken (1997) evidenciaron, durante un estudio de intervención, que el aumento de vitamina E no tuvo un impacto significativo en la tasa de daño genético basal y tampoco hubo correlación positiva entre la frecuencia de daño genético basal y el estado de vitamina E evaluado en linfocitos humanos (Fenech *et al.*, 1997). En lo que respecta específicamente a este trabajo, se podría interpretar que frente a la presencia de un poderoso pro-oxidante como es el sulfato ferroso, mayor cantidad antioxidante de vitamina E resultaría beneficioso para contrarrestar la mayor producción de radicales libres y disminuir así el daño cromosómico.

Los resultados para las frecuencias de puentes y brotes nucleares también se encuentran dentro de lo que Fenech (2007) considera rangos normales de daño genómico. En ambos casos, se puede observar un menor daño genético con el tratamiento semanal en comparación con el tratamiento diario, el cual es aún menor en combinación con la concentración más alta de vitamina E. Sin embargo, como se menciona anteriormente las frecuencias para ambos indicadores son muy bajas impidiendo un análisis más profundo.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo *in vitro* permiten sugerir que la vitamina E, por sus características antioxidantes, complementaría la respuesta de los antioxidante enzimáticos y ayudaría a disminuir el estrés oxidativo y el consecuente daño genómico ocasionado por el sulfato ferroso. Dicho efecto protector parecería ser mayor al aumentar al doble la dosis de ingesta diaria recomendada para lactantes (16,6). Estos resultados permitirán rever, con una base científica, la forma de suplementación preventiva de la anemia ferropénica. Realizar la suministración conjunta de vitamina E con sulfato ferroso en dosis semanales, podría ser una estrategia plausible para disminuir los efectos adversos que este tratamiento ocasiona. Sin embargo, sería necesario complementar estos hallazgos con estudios donde se analice el estrés oxidativo y daño citomolecular (ensayo cometa) entre otros.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, P. (2005). *Contribución para el diseño de una política alimentaria*. Centro interdisciplinario para el estudio de las políticas públicas (CIEPP).
- Aksu, B. Y., Hasbal, C., Himmetoglu, S., Dincer, Y., Koc, E. E., Hatipoglu, S.,... Akcay, T. (2010). Leukocyte DNA damage in children with iron deficiency anemia: effect of iron supplementation. *European Journal of Pediatrics*, 169(8), 951-956. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1147-1>
- Avula, C. R., y Fernandes, G. (2000). Effect of dietary vitamin E on apoptosis and proliferation of murine splenocytes. *Nutrition Research*, 20(2), 225-236
- Algarín, C., Peirano, P., Garrido, M., Pizarro, F., y Lozoff, B (2003). Iron deficiency anemia in infancy: long-lasting effects on auditory and visual system functioning. *Pediatric Research*, 53(2), 217-223. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000047657.23156.55>

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen tanto al CONICET como a la UNLP por el financiamiento recibido. Asimismo, agradecemos la colaboración técnica del Sr. César Bianchi, la Lic. Adriana Di Maggio y la Srta. Natalia Alvarez.

- Apezteguia, M. C., Varea, A., Disalvo, L., Malpeli, A., y González, H. F. (2008, noviembre). *Deficiencia de micronutrientes en niños de 1 a 3 años de familias de bajos ingresos en dos regiones de la provincia de Buenos Aires (Argentina)*. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica. Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica, Cusco.
- Beard, J. L. (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *The Journal of Nutrition*, 131(2S-2), 568S-579S; discussion 580S.
- Bergel Sanchís, M. L., Cesani, M. F., y Oyhenart, E. E. (2017). Malnutrición infantil e inseguridad alimentaria como expresión de las condiciones socio-económicas familiares en Villaguay, Argentina (2010-2012). Un enfoque biocultural. *Población y Salud en Mesoamérica*, 14(2), 60-85. <https://doi.org/10.15517/psm.v14i2.27305>
- Carter, R. C., Jacobson, J. L., Burden, M. J., Armony-Sivan, R., Dodge, N. C., Angelilli, ... Jacobson, S. W. (2010). Iron deficiency anemia and cognitive function in infancy. *Pediatrics*, 126(2), e427-434. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2097>.
- Clark, S. F. (2008). Iron deficiency anemia. *Nutrition in Clinical Practice*, 23(2), 128-141. <https://doi.org/10.1177/0884533608314536>
- Claycombe, K. J., y Meydani, S. N. (2001). Vitamin E and genome stability. *Mutation Research*, 475(1-2), 37-44. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00077-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00077-x)
- Comité Nacional de Hematología, Oncología y Medicina Transfusional y Comité Nacional de Nutrición (2017). Deficiencia de hierro y anemia ferropénica. Guía para su prevención, diagnóstico y tratamiento. Texto completo. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 115(4). <https://doi.org/10.5546/aap.2017.s68>
- de Camargo Jr., K. R., Campos, E. M. S., Bustamante-Teixeira, M. T., Mascarenhas, M. T. M., Mauad, N. M., Franco, T. B., ... Alves, M. J. M. (2008). Treatment and prevention of anemia with ferrous sulfate plus folic acid in children attending daycare centers in Goiânia, Goiás State, Brazil: a randomized controlled trial. *Cad. Saúde Pública*, 24(11), 2722.
- De Regil, L. M., Jefferds, M. E. D., Sylvetsky, A. C., y Dowswell, T. (2011). Intermittent iron supplementation for improving nutrition and development in children under 12 years of age. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD009085. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009085.pub2>
- Eickmann, S. H., Brito, C. M. M., Lira, P. I. C., y Lima, M. C. (2008). Efetividade da suplementação semanal com ferro sobre a concentração de hemoglobina, estado nutricional e o desenvolvimento de lactentes em creches do Recife, Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 24(suppl 2), s303-s311. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001400015>
- Falivene, M. A., y Fatore, G. (2016). Abordaje multidimensional de la anemia por deficiencia de hierro en niños menores de dos años de edad del Noreste Argentino. Años 2004-2005. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 114(1). <https://doi.org/10.5546/aap.2016.14>
- Fenech, M. (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181, 411-416.
- Fenech, M. (2003). Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. *Nutrition Research Reviews*, 16(1), 109-122.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fenech, M. (2010). Nutriomes and nutrient arrays - the key to personalised nutrition for DNA damage prevention and cancer growth control. *Genome Integrity*, 1(1), 11. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-1-11>
- Fenech, M., Dreosti, I., y Aitken, C. (1997). Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*, 18(2), 359-364. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.2.359>
- Fernández Gaxiola, A. C., y De Regil, L. M. (2019). Intermittent iron supplementation for reducing anaemia and its associated impairments in adolescent and adult menstruating women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009218.pub3>

- Fraga, C. G., y Oteiza, P. I. (2002). Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 180(1), 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00379-7)
- Franke, S. I. R., Prá, Da Silva, J., Erdtmann, B., y Henriques, J. A. P. (2005). Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 583(1), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.03.001>
- Gambaro, R. C., Seoane, A. I., y Padula, G. (2018 a). Comparación del daño cromosómico provocado in vitro por dos formas de administración del tratamiento preventivo de la anemia ferropénica. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 20(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.17139/raab.2018.0020.01.02>
- Gambaro, R. C., Seoane, A., y Padula, G. (2018 b). Oxidative Stress and Genomic Damage Induced In Vitro in Human Peripheral Blood by Two Preventive Treatments of Iron Deficiency Anemia. *Biological Trace Element Research*, 190(2), 318-326. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1576-7>
- González, H. F., Malpeli, A., Etchegoyen, G., Lucero, L., Romero, F., Lagunas, C...Uauy, R (2007). Acquisition of visuomotor abilities and intellectual quotient in children aged 4–10 years: relationship with micronutrient nutritional status. *Biological Trace Element Research*, 120(1-3), 92-101. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8023-5>
- González, H., Varea, A., y Malpeli, A. (2006). *Evaluación de Impacto del Programa Plan Más Vida. Componente Nutricional*. Ministerio de Desarrollo Humano. Comisión de Investigaciones Científicas, PBA. La Plata.
- Jomova, K., y Valko, M. (2011). Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Current pharmaceutical design*, 17(31), 3460-3473.
- Kajarabille, N., y Latunde-Dada, G. O. (2019). Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4968. <https://doi.org/10.3390/ijms20194968>
- Lin, H., Li, L., Jia, X., Ward, D. M., y Kaplan, J. (2011). Genetic and biochemical analysis of high iron toxicity in yeast. Iron toxicity in due to the accumulation of cytosolic iron and occurs under both aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3851-3862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190959>
- Linetzky, B., Morello, P., Virgolini, M., y Ferrante, D. (2011). Resultados de la primera encuesta nacional de salud escolar: Argentina, 2007. *Archivos argentinos de pediatría*, 109(2), 111–116.
- Lopez, A, Cacoub, P., Macdougall, I. C., y Peyrin-Biroulet, L. (2016). Iron deficiency anaemia. *Lancet (London, England)*, 387(10021), 907-916. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60865-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60865-0)
- Lozoff, B., Corapci, F., Burden, M. J., Kaciroti, N., Angulo-Barroso, R., Sazawal, S,...Black, M. (2007). Preschool-aged children with iron deficiency anemia show altered affect and behavior. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 683-689. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.683>
- Malpeli, A., Sala, M. E., Bettioli, M., Pattin, J., Lazarte, P., Tortarolo, A,...González, H. (2006). Diagnóstico del estado nutricional de micronutrientes y evaluación antropométrica en una población infantil suburbana de la provincia de Buenos Aires. *Ludovica Pediátrica*, 3(2), 45-52.
- Molina, P. (2009). ¿Qué es la anemia? Hacia una necesaria construcción social de la anemia como una enfermedad. *Anthropía*, 7, 27-32.
- Mozaffari Khosravi, H., Noori-Shadkam, M., Fatehi, F., y Naghiaee, Y. (2010). Once weekly low-dose iron supplementation effectively improved iron status in adolescent girls. *Biological Trace Element Research*, 135(1), 22-30. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8480-0>
- Peña Rosas, J. P., De Regil, L. M., Malave, H. G., Flores-Urrutia, M. C., y Dowswell, T. (2015). . Intermitent oral iron supplementation during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (10). <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD009997>.
- Population, Health and Nutrition Information (PHNI) (2003). *Anemia Prevention and Control What Works Part I*. Estados Unidos Washington, DC: USAID/The World Bank. UNICEF/PAHO/WHO/FAO/The Micronutrient Initiative.

- Prá, D., Franke, S. I. R., Giulian, R., Yoneama, M. L., Dias, J. F., Erdtmann, B.,...Henriques, J. A. P. (2008). Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *BioMetals*, 21(3), 289-297. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9118-3>
- Prá, D., Franke, S. I. R., Henriques, J. A. P., y Fenech, M. (2012). Iron and genome stability: An update. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.02.001>
- Premkumar, K., y Bowlus, C. L. (2003). Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 542(1-2), 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.09.002>
- Record, I. R., y Jannes, M. (2000). Iron, α -tocopherol, oxidative damage and micronucleus formation in rat splenocytes. *Redox Report*, 5(1), 43-44. <https://doi.org/10.1179/rev.2000.5.1.43>
- Riffel, A. P. K., Santos, M. C. Q., de Souza, J. A., Scheid, T., Horst, A., Kolberg, C.,...Partata, W. A. (2018). Treatment with ascorbic acid and α -tocopherol modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(4). <https://doi.org/10.1590/1414-431x20177097>
- Rivera, J. A., Hotz, C., González Cossío, T., Neufeld, L., y García Guerra, A. (2003). The effect of micronutrient deficiencies on child growth: a review of results from community-based supplementation trials. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 4010S-4020S.
- Sguassero, Y., Guerrero, M. M., y Romero, M. (2018). The perspective of primary health care pediatricians regarding childhood anemia and iron supplementation. *Archivos Argentinos De Pediatría*, 116(1), 21-27. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.eng.21>
- Tang, M., Frank, D. N., Sherlock, L., Ir, D., Robertson, C. E., y Krebs, N. F. (2016). Effect of vitamin E with therapeutic iron supplementation on iron repletion and gut microbiome in U.S. iron deficient infants and toddlers: a randomized control trial. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 63(3), 379-385. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001154>
- Toxqui, L., De Piero, A., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez Muniz, F. J., y Vaquero, M. P. (2010). Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutrición Hospitalaria*, 25(3), 350-365.
- Umegaki, K., y Fenech, M. (2000). Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*, 15(3), 261-269.
- Wawrzyniak, A., Górnicka, M., Hamułka, J., Gajewska, M., Drywień, M., Pierzynowska, J.,...Gronowska-Senger, A. (2013). α -Tocopherol, ascorbic acid, and β -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 33(10), 868-875. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.07.001>
- World Health Organization (2001). *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control*. World Health Organization. http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/
- Yurdakök, K., Temiz, F., Yalçın, S. S., y Gümrük, F. (2004). Efficacy of daily and weekly iron supplementation on iron status in exclusively breast-fed infants. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 26(5), 284-288. <https://doi.org/10.1097/00043426-200405000-00005>