

2014

Efecto de la adición de un suplemento a base de proteína láctea en la biodisponibilidad de zinc de una dieta basada en alimentos de origen vegetal

Ana Elizabeth Pérez Pérez



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

Nombre de la tesis:

Efecto de la adición de un suplemento a base de proteína láctea en la biodisponibilidad de zinc de una dieta basada en alimentos de origen vegetal

Tesis:

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

Ana Elizabeth Pérez Pérez

Dirigida por:

Jorge Luis Rosado Loria

Querétaro, Qro
México, 2014



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

Efecto de la adición de un suplemento a base de proteína láctea en la biodisponibilidad de zinc de una dieta basada en alimentos de origen vegetal

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

Ana Elizabeth Pérez Pérez

Sinodales

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
Presidente

Olga Patricia García Obregón
Secretario

Miguel Duarte Vázquez
Vocal

Karina De la Torre Carbot
Suplente

María del Carmen Caamaño Pérez
Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad
de Ciencias Naturales

Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario UAQ
Querétaro, Qro.
Septiembre, 2014

MÉXICO

RESUMEN

En México, la deficiencia de zinc en niños menores de 5 años es 27.5%, siendo el grupo de edad con mayor prevalencia. La biodisponibilidad del zinc en una dieta habitual de origen vegetal, consumida en México, es baja debido al alto contenido de ácido fítico. El aumento de la absorción de zinc en dietas con alto contenido de ácido fítico, podría ser una estrategia eficaz para disminuir la deficiencia de zinc. Estudios han demostrado que la proteína láctea aumenta la absorción de zinc, por lo que en este trabajo estudió el efecto del consumo de un suplemento a base de proteína láctea en la biodisponibilidad de zinc en una comida a base de frijol y tortilla. Se realizó un estudio cruzado, aleatorizado (n=16), con niños de 24 a 36 meses, quienes durante dos días recibieron dieta experimental que consistió en 2 tortillas de 30g, 40g de frijol, 20g de jitomate, 25g de nopal y 5mL de aceite vegetal durante el desayuno, la comida y la cena, con o sin suplemento de proteína láctea (SPL), del cual ingirieron 79mL en cada tiempo de comida. Las comidas en ambos grupos se marcaron con $675 \mu\text{g}$ de Zn^{67} y $675 \mu\text{g}$ de Zn^{70} . Los sujetos recibieron una dosis de referencia de $700 \mu\text{g}$ de Zn^{68} intravenoso. Se midió la absorción fraccional de zinc (AFZ) y absorción total de zinc (ATZ) mediante el enriquecimiento de orina, usando la técnica de relación de trazador isotópico dual, medido por ICP-MS. Solamente 14 sujetos completaron el estudio, siendo eliminados 2 por una aplicación nula del Zn^{68} . No existió diferencia significativa en el consumo de la dieta experimental entre ambos grupos ($P=0.99$). La AFZ no fue diferente entre el grupo suplementado y control ($P= 0.726$). Mientras que la ATZ fue de 0.463 y 0.256 mg/día en el grupo suplementado y el control, respectivamente, siendo dos veces mayor en el grupo suplementado ($P=0.001$). En conclusión, el consumo de una dieta a base de tortilla y frijol junto con un suplemento de proteína láctea, tiene un efecto positivo en el aumento de la absorción total de zinc, promoviendo así, una mayor biodisponibilidad de este.

(Palabras clave: Biodisponibilidad, zinc, isótopos estables)

SUMMARY

In Mexico, the prevalence of zinc deficiency in children young than 5 years old is 27.5%, it makes them the group of age with the highest prevalence of zinc deficiency. Bioavailability of zinc from habitual diets plant-based diets consumed in Mexico is low because the high content of phytate in these diets. Increasing zinc absorption in diets with a high content of phytate could be an effective strategy to decrease zinc deficiencies. Studies have shown that whey protein increase zinc absorption, so that, in this work the effect of consumption of a whey protein supplement (WPS) on the bioavailability of zinc in habitual plant-based diets was studied. A crossover, randomized study was performed ($n = 16$) in children 24 to 36 mo, who for 2 d received test meals, based on 2 tortillas 30g, 40g bean, tomato 20g, 25g and 5mL nopal vegetable oil for breakfast, lunch and dinner, with or without WPS, of which 79mL ingested in each meal. The meals in both groups were labeled with 675 μg of Zinc-67 and 675 μg of Zinc-70. The subjects received 700 μg of reference dose Zinc-68 IV. Fractional absorption of zinc (FAZ) and total absorbed zinc (TAZ) were measuring by urine enrichment, using the technique of dual tracer isotopic ratio measuring with ICP-MS. 14 subjects completed the study, 2 were eliminated by null application of Zinc-68. There was no significant difference on the intake of test meals between groups ($P = 0.99$). AFZ was not different for the supplemented and control groups ($P = 0.726$). ATZ was 0.463 and 0.256 mg/d when the children were supplemented and fed just test meal, respectively, being twice in the supplemented group ($P < 0.001$). The consumption of tortillas and beans with whey protein supplement increased TAZ, improved zinc absorption and may improved the bioavailability of this.

(Keywords: bioavailability, zinc, isotopes stables)

AGRADECIMIENTOS

Me siento muy agradecida de haber tenido la oportunidad de vivir esta experiencia poder trabajar y convivir con los niños, sus madres, mis compañeros y profesores.

Les agradezco a mis padres por su amor, su apoyo incondicional que he recibido desde siempre, así como a mis hermanos por su compañía y apoyo emocional en los momentos más difíciles.

A mis asesores el Dr. Jorge Rosado y la Dra. Olga García, por su apoyo económico y académico, transmitiéndome sus conocimientos en todo momento.

A mis compañeros y amigos, Paola, Lorena, Karen, Andrea, Mara, Sara y Lolita por su amistad y apoyo laboral durante este proceso.

A la M.C. Mariela Camacho, por su ayuda en los análisis bioquímicos en el laboratorio de Nutrición Humana y su apoyo en las actividades en campo.

A mis sinodales, la M.C. Mari Carmen Caamaño, por ayudarme con los análisis estadísticos y enseñarme a manejar el SPSS, la Dra. Karina de la Torre y el Dr. Miguel Duarte por compartirme su sabiduría y su apoyo durante la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros de la generación 2012-2014 por enriquecer mi formación académica y brindar su amistad.

A la delegada y a la doctora de la comunidad de Fuentezuelas, Tequisquiapan, Qro., por permitirnos usar las instalaciones de la casa del DIF.

A Gaude y Tere, por su apoyo en todo momento durante el trabajo en campo.

A la IAEA (International Atomic Energy Agency) la cual financió este proyecto, y CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico recibido.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY	4
AGRADECIMIENTOS	5
Índice	6
INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS	9
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Zinc como nutrimento indispensable	2
2.2 Absorción y Metabolismo de zinc	4
2.3 Requerimientos de zinc	7
2.4 Evaluación del estado de zinc	9
2.4.1 Parámetros que afectan las concentraciones de zinc	10
2.5 Deficiencia de zinc en el mundo	11
2.6 Deficiencia de zinc en México	12
2.7 Consecuencias de la deficiencia de zinc en la salud y funcionalidad	12
2.8 Estrategias	14
2.9 Zinc en los alimentos	15
2.10 Biodisponibilidad de zinc en la dieta.....	16
2.11 Efecto de las proteínas y otros nutrimentos en la disponibilidad de zinc	18
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVO.....	21
VI. METODOLOGÍA.....	21
6.1 Diseño del estudio	21
6.2 Lugar y Población de estudio	22
6.2.1 Tamaño de muestra	22
6.2.2 Criterios de inclusión.....	22
6.2.3 Criterios de exclusión.....	22
6.2.4 Criterios de eliminación.....	23
6.3 Características del suplemento y dieta experimental	23
6.3.1 Aceptación del suplemento.....	25
6.3.2 Dieta de origen vegetal	25

6.4 Estudio de biodisponibilidad de zinc.....	28
6.4.1 Aleatorización.....	28
6. 5 Lineamientos éticos	29
6.6 Procedimientos	29
6.6.1 Preparación de la dieta	29
6.6.2 Preparación del isótopo	30
6.7 Intervención	30
6.7.1. Administración de la dieta	31
6.7.2 Duplicado de la dieta.....	33
6.7.3 Administración de isótopos estables.....	33
6.7.4 Procedimientos para la recolección de muestras de sangre	36
6.7.5 Procedimientos para la recolección de muestras de orina	36
6.8 Instrumentos para la obtención de datos	37
6.8.1 Historia clínica.....	37
6.8.2 Cuestionario nivel socioeconómico.....	37
6.8.3 Frecuencia de alimentos	37
6.8.4 Antropometría	38
6.9. Técnicas de laboratorio y procedimientos	38
6.9.1. Análisis bioquímicos.....	38
6.9.2. Análisis de alimentos	39
6.9.3. Análisis de la absorción de Zinc	40
6.10 Procesamiento de datos.....	41
6.11 Análisis estadístico	41
VII. RESULTADOS.....	43
7.1 Características generales de la población.....	43
7.2 diagnóstico de la población	44
7.3 Consumo de la dieta.....	45
7.4 Absorción total y fraccional de zinc	46
VII. DISCUSIÓN.....	52
VIII. CONCLUSIÓN.....	58
XIX. LITERATURA CITADA	59

INDICE DE TABLAS

	Título	Página
1	Abundancia Isotópica del zinc	2
2	Ingestión diaria recomendada del zinc	8
3	Información nutrimental del suplemento de proteína de leche, vitaminas y minerales	23
4	Distribución de tiempos de comida	27
5	Contenido nutrimental de macronutrientes, hierro, zinc y ácido fólico de la dieta de origen vegetal	27
6	Esquema de aleatorización	29
7	Puntos de Corte	39
8	Resumen de técnicas	40
9	Características generales de la muestra (n=16)	44
10	Diferencia en la ingestión entre grupos con y sin el suplemento	46
11	Diferencia de la absorción en la dieta entre grupos	46
12	Porcentaje de adecuación de ambos grupos según el zinc consumido y absorbido	51

INDICE DE FIGURAS

	Título	Página
1	Transporte de Zinc. Ilustra los componentes que participan en las células intestinales y en sangre para llevar a cabo el transporte de zinc	5
2	Modelo de los compartimentos del metabolismo del zinc	7
3	Aceptabilidad del suplemento	25
4	Frecuencia de alimentos por grupo de alimentos	26
5	Diagrama de flujo del estudio de absorción de zinc	28
6	Diagrama de flujo de sujetos participantes, aleatorización de los grupos	43
7	Absorción total de zinc de cada sujeto al ser o no suplementado	47
8	Diferencia en la absorción fraccional de zinc ente el grupo suplementado y el control	48
9	Diferencia en la absorción total de zinc ente el grupo suplementado y el control	48
10	Diferencia en el total de zinc en la dieta ente el grupo suplementado y el control	49
11	Relación entre consumo de zinc y la absorción fraccional de zinc	49
12	Relación entre consumo de zinc y la absorción total de zinc	50

I. INTRODUCCIÓN

En México el grupo de edad con mayor deficiencia de zinc (Zn) es el de niños menores de 5 años, siendo esta de 27.5%, por lo que es el grupo con mayor posibilidad de ser beneficiado. La biodisponibilidad de zinc es baja en una dieta de origen vegetal, consumida en México por niños pequeños, debido al alto contenido de ácido fítico presente en esta dieta. Ha habido algunos intentos para mejorar el estado nutricional de zinc en la población mexicana, pero estas estrategias no han sido exitosas.

Los alimentos de mayor consumo en la dieta mexicana son el frijol y la tortilla, los cuales además de tener alta cantidad de ácido fítico, tienen alta cantidad de zinc, por lo que el aumento de la absorción de zinc en alimentos de origen vegetal con un alto contenido de ácido fítico, podría ser una estrategia eficaz para aliviar la deficiencia de zinc en niños pequeños. Además la ingestión de zinc puede incrementarse al dar suplementos añadidos con estos micronutrientes. El grupo de Investigación en Nutrición Humana de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) ha desarrollado un suplemento dirigido a niños pequeños, a base de proteínas lácteas, adicionando con zinc y otros micronutrientes, y ácidos grasos.

Se ha encontrado que las proteínas lácteas aumentan la absorción de zinc; por lo tanto, proporcionar un suplemento basado en proteínas lácteas con micronutrientes puede ser una estrategia eficaz para aumentar la biodisponibilidad del zinc en alimentos de origen vegetal y mitigar dicha deficiencia.

Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la cantidad de zinc absorbida en una dieta de origen vegetal y la biodisponibilidad de zinc a partir de un suplemento nutricional basado en proteína láctea, consumido junto con una dieta de origen vegetal, en niños preescolares mexicanos de zonas semi-urbana.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ZINC COMO NUTRIMENTO INDISPENSABLE

El zinc es un oligoelemento, catión divalente, necesario para la vida de todo ser humano, se encuentra en segundo lugar de importancia después del hierro por su concentración en el organismo, encontrándose en diferentes formas isotópicas, como se muestra en la Tabla 1.

Hay cuatro formas naturales de isótopos estables de zinc, tres de las cuales (^{67}Zn , ^{68}Zn , y ^{70}Zn) están presentes en concentraciones suficientemente bajas como para permitir que haya preparaciones enriquecidas con estos isótopos y realizar estudios de su absorción y metabolismo.

Tabla 1. Abundancia Isotópica del zinc

Isotópo	Vida Media	Abundancia %
Zn 57	0.04 segundos	0
Zn 64	Estable	48.6
Zn 65	244.26 días	0
Zn 66	Estable	27.9
Zn 67	Estable	4.1
Zn 68	Estable	18.8
Zn 70	5×10^{14} años	0.6

Fuente: Jiménez Antonio, 2008

El zinc tiene funciones estructurales, catalíticas y reguladoras (King y Keen, 2002). Por lo que, este elemento activa y/o conforma a más de 120 enzimas, como la nicotinamida adenin dinucleotido deshidrogenasa (NADH), polimerasa de ácido desoxirribonucleico (ADN), nucleotidil transferasa, fosfatasa alcalina, superóxido dismutasa y anhirasa carbónica (Lukaski, 2005; Islam *et al.*, 2013), participando en la síntesis de ácidos nucleicos, metabolismo de lípidos, hidratos de carbono y proteínas. El zinc contribuye en la supresión de radicales libres en células aisladas, una vez iniciada la formación de peróxidos, ya que se requiere junto con el cobre para que la enzima superóxido dismutasa actúe eficazmente eliminando los aniones superóxidos (Mataix y Llopis, 2005).

En el sistema nervioso central, el zinc es un producto o cofactor neurosecretor, el cual se acumula en las vesículas sinápticas. Se ha visto que los circuitos neuronales contenedores de zinc se asocian con la memoria, el comportamiento, las emociones y la función cognitiva. Además, el zinc podría ser importante en la neurogénesis, la migración neuronal y sinaptogénesis; y su deficiencia podría interferir con la neurotransmisión y el desarrollo neurofisiológico (Chaigne-Delalande y Lenardo, 2014).

El zinc también juega un rol importante en el sistema inmunológico pues ayuda al desarrollo normal de neutrófilos y células asesinas naturales (NK), en la replicación celular (crecimiento), formación de huesos y dientes, da integridad a la piel, estructura ocular, desarrollo del cerebro, procesos sensoriales y aprendizaje (Halsted *et al.*, 1974; Chesters, 1978).

A su vez, este micronutriente, participa en el metabolismo de la vitamina A, posibilitando la conversión de retinol en retinal y viceversa, además de mantener la integridad de la retina (Parul y West, 1998).

Es un elemento clave para la regulación, activación y unión de ciertos factores de transcripción, a través de su participación como dedo de zinc. Estas protrusiones en forma de dedo unen los factores de transcripción a su blanco logrando secuencias específicas de pares de bases del ADN (Cousins *et al.*, 2006).

Las concentraciones más altas de zinc se encuentran en la piel, cabello, uñas, retina y tejidos gonadales del varón, ya que se requiere en la división y proliferación celular, por ende, aquellas células con rápido recambio, como las de la mucosa intestinal, dependen del estado nutricional de zinc para su correcto funcionamiento. Se ha visto que, la administración de zinc mejora la permeabilidad intestinal en niños con diarrea aguda o persistente (López *et al.*, 2010; Mataix y Llopis, 2005).

2.2 ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE ZINC

Existen factores extrínsecos e intrínsecos que impiden la adecuada absorción de zinc, siendo los factores extrínsecos la causa más frecuente de la deficiencia de zinc en México, debido a la dieta alta en maíz y frijol y pobre en alimentos de origen animal, considerándose como una dieta a base de alimentos de origen vegetal (Rosado, 1998; López *et al.*, 2005); mientras que los intrínsecos están relacionados con alteraciones en el organismo (Gutiérrez *et al.*, 2012).

La mayor parte de zinc se absorbe en el intestino delgado, especialmente en el duodeno distal y el yeyuno proximal, oscilando su absorción entre el 20% y el 50%, esto se debe al tipo de dieta y la edad de cada individuo, ya que tiende a disminuir con la edad (Wood *et al.*, 1995; Matix y Llopis, 2005). Sin embargo, Hambidge y colaboradores en el 2006, hallaron que la absorción de zinc es similar en niños de 4 meses que en adultos, cuando es ajustada por el largo del intestino.

El intestino delgado desempeña un papel central en el metabolismo y la homeostasis del zinc en todo el cuerpo. Siendo la absorción exógena de zinc y la conservación intestinal endógena de zinc los 2 mecanismos principales que regulan la homeostasis del zinc en el cuerpo, manteniendo y restableciendo el equilibrio de este (Hambidge *et al.*, 1998; López *et al.*, 2010; Pechin, 2012).

Existen dos procesos que participan en la absorción de zinc, el transporte activo (saturable) y la difusión pasiva (no saturable). El mecanismo saturable es mediado por transportadores dependientes de la ATPasa y Na-K, funciona más eficientemente cuando las concentraciones de zinc en la luz intestinal son bajas y el mecanismo de difusión pasiva depende de las concentraciones del metal. El zinc se encuentra generalmente unido a aminoácidos y pequeños péptidos, los cuales liberan a este ion en las proximidades de las vellosidades para que puedan ser absorbidos (King y Keen, 2002).

El ser humano tiene al menos 14 transportadores de zinc, que regulan su entrada y salida de las células, agrupados en 2 familias: ZnT (Zinc Transportador) y

Zip (Zinc/Hierro Transportador). Estas proteínas parecen tener funciones opuestas, el ZnT reducen el zinc intracelular favoreciendo su salida de la célula o almacenándolas en vesículas intracelulares (El ZnT7 secuestra el Zn en vesículas), mientras que las proteínas Zip aumentan las concentraciones intracelulares promoviendo la entrada del zinc extracelular o liberándolo desde las vesículas de almacenamiento, como se muestra en la Figura 1 (Pechin, 2012). Se ha visto un incremento del ZIP4 en la deficiencia de zinc y disminución en situaciones de normalidad (King y Keen, 2002; Mataix y Llopis, 2005).

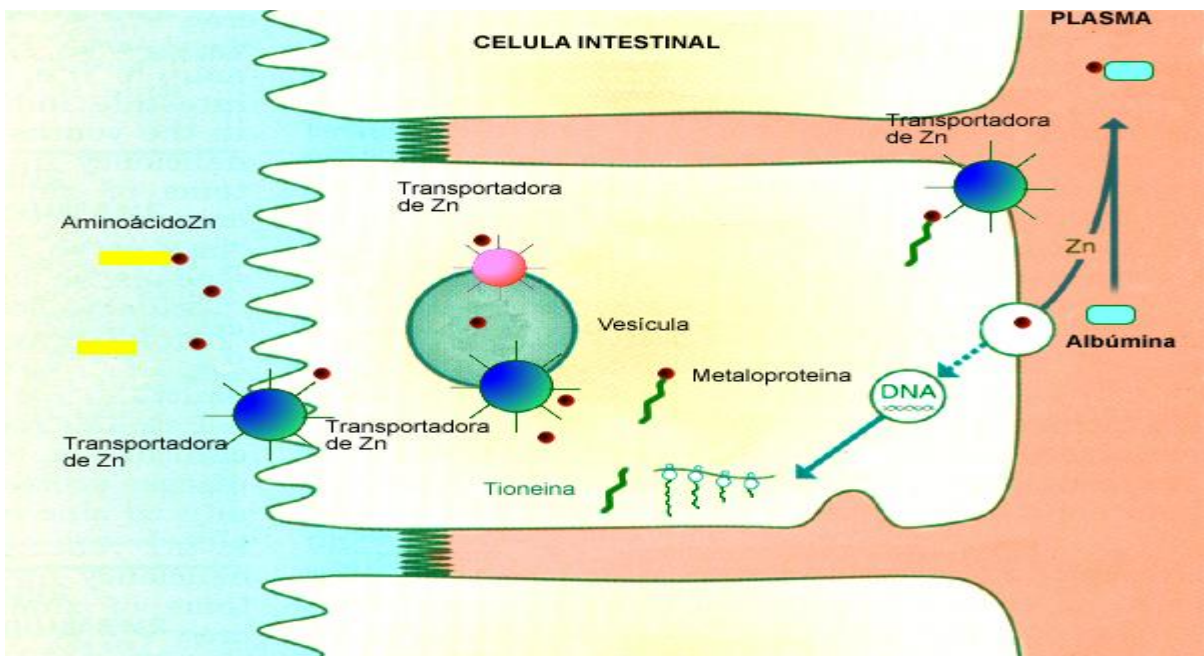


Figura 1. Transporte de Zinc. Ilustra los componentes que participan en las células intestinales y en sangre para llevar a cabo el transporte de zinc. Zip de color azul, ZnT de color rosa.

Fuente: Galiano, 2004.

Una vez en el interior de la célula, el zinc puede ser capturado por tioneínas, convirtiéndose así en metalotioneínas (MT) (Figura 1). La MT contiene 20 cisteínas y pueden ligar 7 átomos de zinc por molécula, formando grupos Zn-tioneína (Maret, 2003). Las MT participan en el ingreso, transporte, y regulación de zinc, transportándolo hasta el extremo basolateral de las células enterohepáticas para su paso a la sangre.

El MT es rápidamente inducido al hígado, riñón, páncreas e intestino durante la exposición de altas dosis de metales pesados, principalmente zinc y cadmio, evitando así una absorción excesiva de estos metales. También puede ser inducida por la interleucina 6 (IL-6) y glucocorticoide, al existir una situación inflamatoria (Mataix y Llopis, 2005). No obstante se ha visto, que la concentración de MT está sujeta a cambios en la ingestión de zinc, las dietas altas en ácido fítico disminuyen la MT en los eritrocitos (Cheng *et al.*, 2012).

Una vez que el zinc es absorbido por los enterocito, es liberado de las células intestinales en los capilares mesentéricos, transportándose por la sangre a diferentes tejidos, principalmente el hígado, seguido del hueso, piel, riñón y timo. En la sangre el zinc es transportado en un 57% por albumina, un 40% por α -2 macroglobulina, y sólo un 3% por aminoácidos, generalmente histidina y cisteína. La concentración plasmática de la albumina puede determinar su absorción, ya que afecta la proporción de cationes transferido desde los enterocito, habiendo una parte importante del zinc en ellos (Hesse *et al.*, 2007).

Cerca del 30 al 40% del zinc que entra en el sistema portal es extraído por el hígado, donde se han identificado diversos transportadores, como son: Zip10, ZnT1, ZnT5, ZnT6 y ZnT7 (Pechin, 2012); este pool de zinc es subsecuentemente liberado a la sangre (Hambidge *et al.*, 1986).

En un estudio (King *et al.*, 2001), usaron isótopos estables (^{65}Zn y ^{70}Zn) y determinaron la existencia de tres compartimentos, el pool rápidamente, lentamente y muy lentamente intercambiable. El rápidamente intercambiable representa menos del 10%, el cual comprende de los eritrocitos y parte del hígado. El pool lentamente intercambiable está representado por los huesos y la porción restante del pool hepático movilizable. El pool muy lentamente intercambiable comprende el músculo esquelético y órganos como piel, timo y corazón, como se muestra en la Figura 2.

De acuerdo a Jackson en 1989, aproximadamente el 60% del zinc en el cuerpo humano se encuentra en el músculo esquelético, 25% en hueso, 8% en piel y pelo, 5% en hígado, mientras que sólo una parte muy pequeña (menor al 0,1%)

corresponde al plasma (Figura 2), de suerte que, hay aproximadamente 3.5 mg de Zn en plasma (Rosado, 2005; Pechin, 2012).

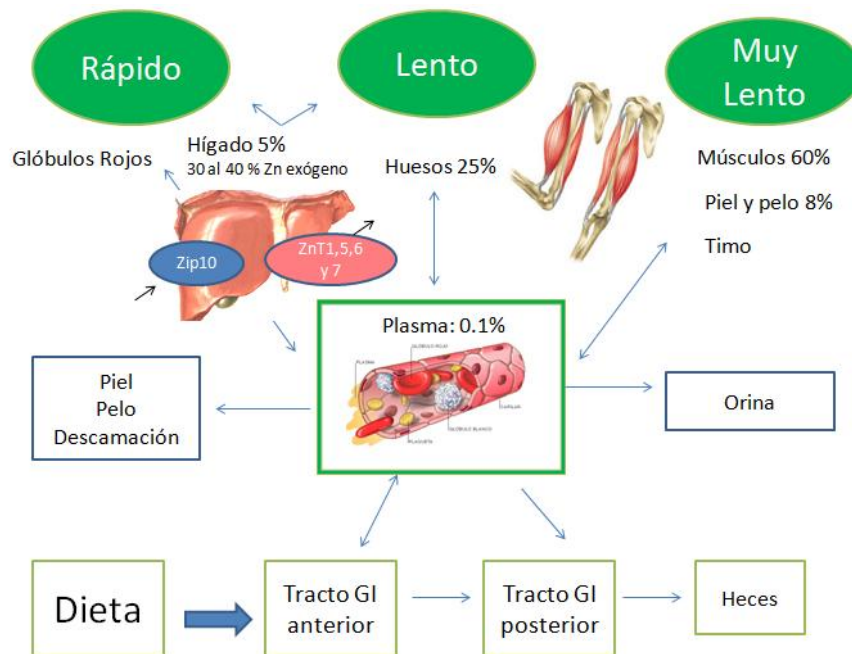


Figura 2. Modelo de los compartimentos del metabolismo del zinc

Fuente: Modificado de King et al., 2001; Rosado, 2005; Pechin, 2012

De modo que, el zinc absorbido, entre 3.3 y 4.9 mg/día, pasa por el plasma, el flujo hacia afuera del mismo debe ser rápido para mantener una concentración constante (Pechin, 2012).

El zinc que se excreta en la orina es sólo una fracción de lo que se excreta en la heces; el zinc también se excreta por descamación de las células epiteliales, sudor, semen, crecimiento del cabello, uñas y menstruación. En condiciones normales la excreción urinaria es pequeña, aunque se puede incrementar de modo importante en las enfermedades que dan lugar al catabolismo protéico o proteinuria por deficiencia renal (Mataix y Llopis, 2005; Rosado, 2005).

2.3 REQUERIMIENTOS DE ZINC

El requerimiento fisiológico promedio de zinc, se define como la cantidad de zinc que debe ser absorbido para contrarrestar las pérdidas de zinc tanto a nivel

intestinal como de otros sitios (orina, pérdidas por piel, cabello, uñas y sudor, y en adolescentes y adultos, semen y menstruación). En niños también hay que añadir la cantidad de zinc usada para el crecimiento (López *et al.*, 2010).

A partir de la estimación del requerimiento fisiológico, se calcula el requerimiento estimado promedio (REP), que representa el requerimiento dietario promedio o el nivel de ingesta mediante el cual el 50% de la población cubre sus requerimientos fisiológicos. Finalmente, debido a que los requerimientos varían entre individuos, se fija la ingestión diaria recomendada (IDR) a 2 DE del REP, asegurando que la gran mayoría de la población (97.5%) cubran su requerimiento fisiológico (López *et al.*, 2010).

Se ha visto que los requerimientos de zinc en niños con bajo peso al nacer son mayores que en aquellos niños con peso normal, y la capacidad de absorción en estos niños parece ser limitada (Hambidge *et al.*, 2006). La siguiente tabla enlista la ingestión diaria recomendada (IDR) para la población mexicana.

Tabla 2. *Ingestión diaria recomendada del zinc*

Grupo de edad	Sexo	IDR (mg/día)
Infantes		
7-12 meses	M y F	3.8 ^a
Niños menores		
1-3 años	M y F	4.0 ^a
4-8 años	M y F	6.5
Niños mayores y adolescentes		
9- 13 años	M	11.6
9- 13 años	F	11.6
14-18 años	M	13.9
14-18 años	F	12.2
Embarazo	F	14
Lactancia	F	16
Adultos		
19 < años	M	11
19 < años	F	12

^a *Ingestión diaria sugerida (IDS)*

Fuente: Rosado, 2005

En cuanto a la toxicidad por zinc, se ha visto que es poca, existiendo pocos datos. Se ha calculado que una dosis aproximada de 1 a 2 gramos de sulfato de zinc (entre 225 y 450 mg de zinc) podría ser tóxica (Rosado, 2005), causando dolor de cabeza, náuseas y vómitos y diarrea; también se ha reportado que una dosis de 300 mg/ día de sulfato de zinc durante 6 semanas disminuye la respuesta inmune y la concentración de colesterol HDL (Rosado, 2005; Mataix y Llopis, 2005).

2.4 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE ZINC

La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Internacional de Energía Atómica (IAEA), y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) señalan que los indicadores en población para evaluar el estado nutricional del zinc y detectar deficiencia de este son evaluaciones bioquímicas, dietéticas y funcionales (Benoist *et al.*, 2007); el conjunto de los tres nos proporciona una mejor estimación del riesgo a deficiencia de zinc en una población. Siendo zinc sérico uno de los biomarcadores más disponibles para detectar deficiencia de zinc en la población (Benoist *et al.*, 2007; López *et al.*, 2010), se considera en riesgo cuando existe una prevalencia mayor al 20% en la población (Hesse *et al.*, 2007), en México tenemos una prevalencia de 27.5% en niños menores de 5 años.

La limitante más importante para el uso de suero es que la concentración de zinc en la sangre esta finamente regulada por un mecanismo de homeostasis, lo que hace que, aun durante episodios largos de restricción de zinc en la dieta, no exista cambio de la concentración zinc en la sangre (Maywald y Rink, 2014). Por lo que el diagnóstico de deficiencia usualmente requiere una combinación de la detección de bajas concentraciones de zinc en células, fluidos o tejidos (Ej. eritrocitos, leucocitos, plaquetas, saliva, cabello o uñas) y/o una elevada excreción de zinc en orina. Se ha establecido un criterio de concentración adecuada en suero por arriba de 65 µg/dL para muestras tomadas en ayunas (Rosado, 2005; Mataix y Llopis, 2005).

La talla para la edad es la prueba funcional más conocida para asociar con deficiencia de zinc, es ampliamente utilizado en salud pública. (Benoist *et al.*, 2007). En México la prevalencia de retraso en el crecimiento es de 13.6% (ENSANUT, 2012); el aumento en la talla para la edad es la primera respuesta al aumento de la ingestión de zinc (Benoist *et al.*, 2007).

La deficiencia de hierro puede ser un factor de detección para una posible deficiencia de zinc debido a que muchos de los mismos factores dietéticos que afectan el estado del hierro se espera que influyan similarmente en el estado de zinc (López *et al.*, 2005).

2.4.1 PARÁMETROS QUE AFECTAN LAS CONCENTRACIONES DE ZINC

Deben evaluarse otros indicadores que permitan determinar si existe un proceso inflamatorio o infeccioso que afecte el estado de zinc.

La Helicobacter pylori, bacteria espiral, gramnegativa que habita entre el mucus y la superficie del epitelio gástrico, está vinculada con la mala nutrición de micronutrientes. Aunque la absorción de estos no tiene lugar en el estómago, este órgano contribuye al proceso, por medio de la secreción de ácido clorhídrico y enzimas, la cual disminuye hasta un 50%, aumentando el pH intragástrico como resultado de una gastritis infecciosa, por lo que no se liberan los micronutrientes de la matriz de los alimentos, ni se mantienen solubles los minerales esenciales.

Su presencia en la mucosa estomacal activa la respuesta inmune e inflamatoria al estimular la producción de citocinas por las células epiteliales, originando un proceso inflamatorio crónico (Cruz Tamayo *et al.*, 2010). La prevalencia de *Helicobacter pylori* es de aproximadamente 40% en los países desarrollados y de 80 a 90% en países en desarrollo (Castillo-Juarez *et al.*, 2009).

La reacción inflamatoria aguda, son una respuesta inespecífica del organismo a las agresiones infecciosas, traumáticas, inmunológicas y malignas, generando una redistribución del zinc corporal mediante mecanismos celulares

complejos, encontrándose bajo el zinc plasmáticos (Ross, 1999). Durante este proceso, los macrófagos segregan tres citocinas pro-inflamatorias, las interleucinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) (Couderc *et al.*, 2004; Mataix y Llopis, 2005). Estas citocinas, elevan la concentración de la proteína C reactiva (PCR) y la seroproteína alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), siendo los marcadores de elección para la búsqueda de un estado inflamatorio (Couderc *et al.*, 2004).

La concentración de PCR aumenta de 300 a 1000 veces en un lapso de 2 a 4 horas, y la AGP aumenta de 2 a 4 veces en un lapso de 2 a 4 días; alcanza su máxima concentración hasta 24 horas después de la estimulación por IL-6 (Pita, 2010).

2.5 DEFICIENCIA DE ZINC EN EL MUNDO

Las deficiencias de cualquier nutrimento pueden deberse a una disminución en la ingestión del mismo, a un aumento en las necesidades del organismo en periodos de crecimiento rápido, por malabsorción, o bien, a una disminución en la biodisponibilidad del nutrimento (Rosado, 1998; López *et al.*, 2010).

La carencia de micronutrientes como el zinc, hierro y vitamina A, son los de mayor prevalencia en todo el mundo, principalmente en países en desarrollo, siendo reconocidas como una causa mundial de morbilidad y mortalidad (Jones, 2003; Grupo Internacional de Zinc Nutrición Consultivo (IZiNCG), 2004; McLean *et al.*, 2007).

La consecuencia de estas deficiencias es una carga importante para el Sector de Salud Pública (The World Bank, 2006). Existen más de 450 000 defunciones en el mundo por deficiencia de zinc (UNICEF, 2010) en niños preescolares.

Se ha visto que el 89% de los niños menores de 5 años, viven en áreas con riesgo de deficiencia de zinc, siendo clasificadas estas áreas por la prevalencia de retraso en el crecimiento y una adecuación de zinc absorbible en la dieta de cada país (WHO, 2009).

2.6 DEFICIENCIA DE ZINC EN MÉXICO

Los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006 muestran prevalencias nacionales elevadas de deficiencia de hierro (26%), zinc (27.5%) y anemia (23.3%), y prevalencias de moderadas a bajas de vitamina B12 (7.7%) y ácido fólico (3.2%) en niños menores de 5 años, una etapa crítica para el crecimiento y el desarrollo neurológico y cognitivo (Shamah-Levy *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2012).

2.7 CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN LA SALUD Y FUNCIONALIDAD

La deficiencia de zinc en niños pequeños de comunidades rurales en México se debe principalmente, a la baja biodisponibilidad en la dieta habitual de este micronutriente (Rosado, 2005).

Cabe destacar que las consecuencias funcionales y/o clínicas de la deficiencia de zinc aparecen antes de que los niveles en plasma y/o en algún otro tejido se vean disminuidos (Rosado, 1998). Dicha deficiencia está asociada con consecuencias importantes en la salud y la funcionalidad de los individuos, especialmente durante las primeras etapas de la vida. (Salguero *et al.*, 2004; Abdollahi *et al.*, 2014)

Se ha visto que las deficiencias funcionales de zinc aparecen mucho antes que las deficiencias clínicas, ocasionando un retraso en el crecimiento lineal, efecto negativo en la sensibilidad sensorial, especialmente en la capacidad para detectar sabor, disminución en el apetito, ceguera nocturna, deficiencia en el desarrollo neurocognitivo de los niños, disminución en la respuesta inmune y efectos negativos en la función intestinal. (Salqueiro, 2004; Rosado et al., 2005; Mataix y Llopis, 2005).

En los niños con deficiencia de zinc, pueden presentarse diversas adaptaciones que contribuyen a incrementar las necesidades de zinc, lo cual incluye a un aumento en la capacidad de absorción intestinal, aumentando los transportadores de zinc, habiendo una disminución en las pérdidas endógenas o en la redistribución de zinc en los tejidos. (King y Keen, 2002; Cousins *et al.*, 2006; Pechin, 2012).

El zinc es esencial para el desarrollo normal y funcional en la inmunidad innata (neutrófilos, células asesinas naturales (NK)), ya que el zinc es parte integrante de la timulina, una molécula de la hormona del timo. Por lo que, la deficiencia de zinc induce el descenso en la actividad timulina, asociada con la maduración y la diferenciación de células T, afectado así el crecimiento y/o función de los macrófagos, la fagocitosis, producción de citocinas y los linfocitos T y B, resultando en mayor generación de citocinas inflamatorias, IL-1b, IL-6, IL-8 y TNF-a (Prasad, 2009).

Se ha visto que el zinc interfiere con el cobre y crea anemia por deficiencia de cobre, generando alteraciones gustativas (sabor metálico), dolor de cabeza, náuseas, vómito (Mataix y Llopis, 2005).

Sandstead y colaboradores en 1998 realizaron un estudio, en el cual daban diferentes suplementos juntos con una dieta habitual, teniendo 3 grupos, el primer grupo consumió un suplemento de varios micronutrientes excepto zinc, el segundo consumió únicamente zinc y el tercer grupo consumió zinc más otros micronutrientes, encontraron que el grupo que recibió zinc con micronutrientes

presentó una mejora significativa en la memoria de reconocimiento, el razonamiento y la función psicomotora en comparación al grupo que sólo recibió suplementación con zinc y el que recibió micronutrientes.

Sin embargo, un error raro y hereditario del metabolismo del zinc provee un ejemplo de lo que sucede en un humano con deficiencia severa. En esta condición, llamada Acrodermatitis enteropática, los signos clínicos incluyen dermatitis, alopecia, anorexia, retardo de crecimiento, pérdida de peso e infecciones recurrentes. Adicionalmente, más de la mitad de estos niños también tienen diarrea intermitente, los síntomas desaparecen al administrar grandes dosis de este (López *et al.*, 2010).

2.8 ESTRATEGIAS

Se necesitan de estrategias eficaces para atender la deficiencia de zinc en los niños mexicanos, ya que como se ha visto, es un importante problema de salud pública. Existen tres estrategias de intervención nutricional para controlar la deficiencia de zinc en poblaciones. Estas son la suplementación, la fortificación y la modificación y/o diversificación alimentaria, no siendo excluyentes unas de otras (López *et al.*, 2010).

Ha habido algunos intentos para mejorar el estado nutricional de zinc en la población mexicana. La Secretaria de Salud Pública desde 1999 recomendó la adición en 20 mg/kg de zinc (óxido de zinc) en harina de trigo y maíz, pero la estrategia incluye sólo la harina industrializada; este tipo de harina no alcanza a la mayoría de la población en riesgo (Rosado *et al.*, 1999)

Otra estrategia, es la del Programa Nacional llamado Oportunidades, el cual tiene como objetivo la lucha contra la pobreza, en el cual, proporcionan un suplemento alimenticio, en forma de papilla (NUTRISANO®) para niños de 6 a 23 meses, con sobres de sabor chocolate, vainilla y plátano, que aportan el 100% de

los micronutrientes requeridos y el 20% en promedio de las necesidades calóricas, el cual está siendo suplido por micronutrientes en polvo (VITANIÑO®) dirigido a niños de 24 a 59 meses de edad. Se evaluó el impacto de NUTRISANO® en el estado nutricional de zinc y hierro, este fue un estudio longitudinal que duró 6 meses, con niños de 12 a 24 meses de zonas rurales, en el cual, no se encontró diferencia significativa en las concentraciones sanguíneas de hierro y zinc entre los niños que consumieron la papilla y los que no (Rosado *et al.*, 2011).

Entre los beneficios que otras investigaciones han mostrado al suplementar con zinc, se pueden mencionar la reducción de efectos desfavorables de las enfermedades infecciosas hasta en una tercera parte (Black, 1998), una disminución de 34% en la incidencia de diarrea (Long *et al.*, 2006). Teniendo efecto positivo tanto en las infecciones bacterianas como virales, ya que la deficiencia de zinc afecta la inmunidad mediada por células, además de reducir la producción de anticuerpos (Prasad, 2000).

No obstante, un reciente meta-análisis muestra que la suplementación preventiva con zinc reduce en un 27% la incidencia de diarrea en niños de países en vías de desarrollo, disminuyendo también la incidencia de infecciones respiratorias agudas, reduciendo la incidencia de neumonía e infección respiratoria aguda en aproximadamente un 15% de los niños (López *et al.*, 2010).

2.9 ZINC EN LOS ALIMENTOS

Las fuentes más importantes de zinc en los alimentos, son las carnes de res, cerdo y cordero, las cuales contienen una mayor cantidad que el pescado. La carne oscura de pollo contiene más cantidad de zinc que la carne blanca (Evert, 2011). Las frutas, verduras, cereales integrales, germen de trigo, levaduras, oleaginosas y leguminosas, aportan cantidades considerables de este micronutriente, sin embargo su biodisponibilidad es baja, porque el zinc en la proteína vegetal no es

tan biodisponible como en la proteína animal, ya que el zinc muestra mayor afinidad por las proteínas animal (Gibson, 1994).

Se ha visto que la densidad promedio de zinc de los alimentos consumidos en países en vías de desarrollo, es más baja que la recomendada (FAO/OMS, 2003). El suministro de proteínas para los hogares mexicanos con bajo ingreso viene del consumo de cereales, seguido del de verduras y leguminosas. En los que tienen más alto ingreso, la principal fuente de proteínas radica en el consumo de carnes y en segundo lugar en el de cereales (Martínez y Villezca, 2003); por lo que los hogares mexicanos con bajo ingreso están aun más riesgo de padecer deficiencia de zinc, siendo su dieta monótona, desequilibrada y muchas veces insuficiente, más por obligación que por elección (Uauy, 2007).

2.10 BIODISPONIBILIDAD DE ZINC EN LA DIETA

La biodisponibilidad se da, cuando un nutrimento se digiere, absorbe y se utiliza para sus funciones fisiológicas. Esta biodisponibilidad puede variar entre 0% y 100%, por diversos factores: concentración, tipo de nutrimento, interacción, estado nutricional de la persona, entre otros. Un nutrimento con baja biodisponibilidad es excretado inmediatamente después de ser absorbido, por lo que la biodisponibilidad la podemos definir como la absorción menos la excreción.

Como resultado de los procesos digestivos y secreciones endógenas, el zinc es liberado del alimento, concentrándose de distintas formas en el lumen intestinal. El zinc libre forma complejos con ligandos tales como aminoácidos y ácidos orgánicos (Pechin, 2012).

Como se mencionó anteriormente la mayor parte del zinc se absorbe en el duodeno distal y el yeyuno proximal con un porcentaje de absorción del 20 al 50% según el tipo de dieta (Mataix y Llopis, 2005); en promedio una dieta mexicana contiene de 1200 a 1900 mg de ácido fítico (Cherry *et al.*, 1989; Rosado, 1998), lo cual ocasiona una disminución en el porcentaje de absorción del zinc. A mayor

consumo de ácido fítico menor el porcentaje de absorción de zinc (Sandstrom *et al.*, 1987; Nagel, 2010; Hambidge *et al.*, 2010). También se ha visto una disminución de MT con dietas altas en ácido fítico (Rosado, 2005).

Para identificar la cantidad de zinc absorbida en la dieta, se mide la absorción fraccional de zinc con isótopos estables. Se denomina “isótopos” a las diversas formas de un elemento químico que se diferencian en el número de neutrones de su núcleo y, por tanto, en su masa atómica.

Existen varios isótopos estables para un mismo átomo, como lo es el zinc (^{67}Zn , ^{68}Zn , ^{70}Zn). Esto permite llevar a cabo estudios más específicos al administrar dos o más especies simultáneamente y estudiar la absorción y/o el tamaño de las pools intercambiables, así como su comportamiento en diferentes matrices alimentarias enriquecidas con nutrientes. Se miden por medio de espectrometría de masas de conductividad acoplado (ICP-MS por sus siglas en inglés, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) (Valencia, 2009). La medición de los cambios en todo el cuerpo por enriquecimiento con isótopos es imposible, pero se han desarrollado y validado técnicas para cuantificar relaciones entre isótopos estables tanto en sangre, como en orina y heces (Solomons y Cousins, 1984).

Con esta técnica, podemos ver la diferencia neta entre la secreción y reabsorción, midiendo el zinc endógeno excretado en las heces (se mide absorción) o determinar la relación del enriquecimiento en la orina de un trazador oral con un segundo trazador vía intravenosa, útil para calcular el balance de zinc y la retención (midiendo biodisponibilidad) (Hambidge *et al.*, 1998).

2.11 EFECTO DE LAS PROTEÍNAS Y OTROS NUTRIMENTOS EN LA DISPONIBILIDAD DE ZINC

La absorción intestinal del zinc depende de varios factores, en particular de su concentración en la dieta y de la presencia de sustancias que interfieran con su absorción, como el ácido fítico (hexafosfatos de inositol), el cual es la forma principal de almacenamiento de fósforo en muchos vegetales; esta sustancia bloquea la disponibilidad de fósforo, así como de otros minerales, tales como calcio, magnesio, hierro y zinc. Como se menciona anteriormente, la dieta consumida en México contiene cantidades elevadas de tortilla y frijol, de los cuales se sabe que tiene un alto contenido de ácido fítico. El ácido fítico se localiza en la fibra del maíz y en las paredes celulares del frijol, siendo el mayor inhibidor de la absorción del zinc debido a la formación de quelatos insolubles (O'Dell *et al.*, 1964; Forrellat, 2004; Hambidge *et al.*, 2010; Hurrell y Egli, 2010). El ácido fítico influye en la absorción exógena de zinc y en la reabsorción de zinc endógeno, existiendo una mayor preocupación para las poblaciones que tienen una relación molar en la dieta de ácido fítico:zinc superior a 15:1 (Hambidge *et al.*, 1998).

El ácido fítico no solo toma minerales importantes, también inhibe las enzimas que necesitamos para digerir los alimentos, como la pepsina, amilasa y tripsina (Nagel, 2010).

El calcio y otros iones incrementan los efectos adversos del ácido fítico (Mataix y Llopis, 2005), mientras que la proteína animal ha demostrado contrarrestar el efecto inhibidor de fitato en la absorción de zinc (Lönnerdal, 2000).

Existen otros factores que interactúan con el zinc, inhibiéndolo o potencializándolo (Hambidge *et al.*, 1998). El cobre y el cadmio compiten con el zinc para los sitios de unión en la metalotioneína (Yu *et al.*, 2008), sin embargo se ha visto que la ingestión de cobre y cadmio no interfieren con la absorción de zinc cuando estos se asemejan al IDR (Lönnerdal, 2000).

Existe la preocupación acerca de las posibles interacciones negativas entre el hierro y zinc debido a la unión competitiva de transportador de metales divalentes 1 (DMT1) y Zip 14 transportador, sin embargo no se han observado interacción negativa cuando están presentes en leche materna o leche de vaca (Olivares *et al.*, 2012). Hay evidencia de que la absorción de zinc no se ve afectada por la expresión reducida de DMT1 (Tandy *et al.*, 2000). También se ha encontrado que al disminuir los CTR1 (transportador de cobre) disminuye la absorción de hierro y zinc (Arredondo *et al.*, 2006), postulándose como una vía común para la absorción, diferente de la DMT1, localizada en la membrana apical de la célula intestinal (Yamaji *et al.*, 2001; Abd Rashed, 2011). Se ha demostrado que la transferrina, el principal transportador de hierro en plasma, también puede unirse al zinc. Además, parece ser que el zinc es capaz de bloquear la capacidad de almacenamiento de hierro de la ferritina (Olivares *et al.*, 2012).

Berzin y Bauman (1987) propusieron que la vitamina A podría estimular la síntesis de los transportadores de zinc. La adición de 1,25 dihidroxi vitamina D3 pudo beneficiar la absorción de zinc en cultivos de células intestinales y en intestino de pollos, incluso mejorar la eficacia de las fitasas, pero no está claro cuál es el mecanismo (Pechin, 2012).

Se ha visto que la absorción de zinc fraccional aumenta de forma lineal al aumentar el contenido de proteínas (Lönnerdal, 2000) como las lácteas (Rosado *et al.*, 2004) en especial la proteína de suero, aumentando la absorción de zinc (Davidsson *et al.*, 1996; Echarri, 2012).

Las proteínas más comunes en la leche son caseína y proteína de suero de leche (Oliveira, 2005; Andersen *et al.*, 2006). Estas dos proteínas de la leche son fuentes excelentes de todos los aminoácidos esenciales. Se ha encontrado que el suero de leche es una proteína de digestión rápida (con un rápido aumento en aminoácidos plasmáticos, presente por 30 minutos en el yeyuno) y la caseína es una proteína de digestión lenta (liberación lenta pero constante de aminoácidos, presente de 1 a 2 horas en el yeyuno) (Lönnerdal y Lien, 2003; Oliveira, 2005),

desde 1978, Smith y colaboradores observaron que el tiempo máximo de absorción de zinc se da en los primeros 40 minutos (Smith et al., 1978), posteriormente la absorción disminuye, debido a que ha alcanzado su equilibrio y hay una menor absorción del intestino (Yu et al., 2008).

La caseína de la leche de vaca está formada por α S1, α S2, β y k caseína mientras que la caseína humana contiene sobre todo β -caseína y un poco de k-caseína (Baro et al., 2001). Tanto que el suero está formado por α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, glicomacropéptidos y una gran variedad de factores de crecimiento.

Los péptidos que se producen mediante hidrólisis *in vitro* o *in vivo* de la proteína α -lactoalbumina, captan minerales (cationes divalentes) aumentando la absorción de zinc (Kelleher et al, 2003). La proteína α -lactoalbumina se encuentra en la leche de vaca en una concentración de 1 a 1.5 g/L, siendo aproximadamente el 3,4% de las proteínas totales; esto afecta de manera positiva la absorción de zinc (Drago y Valencia, 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

La absorción del zinc en dietas de origen vegetal, consumida en México es baja debido al alto contenido de ácido fítico. Se ha encontrado que las proteínas lácteas aumentan la absorción de zinc, por lo tanto, proporcionar un suplemento basado en proteína láctea (SPL) con micronutrientes puede ser una estrategia eficaz para aumentar la biodisponibilidad de zinc en alimentos de origen vegetal y aliviar las deficiencias de zinc, por lo tanto se va a evaluar la biodisponibilidad de zinc en una dieta de origen vegetal con un SPL.

IV. HIPÓTESIS

La biodisponibilidad de zinc en una dieta de origen vegetal consumida con un suplemento a base de proteína láctea es mayor que sin el suplemento.

V. OBJETIVO

Determinar el efecto de la adición de un suplemento a base de proteína láctea en la absorción de zinc de una dieta de origen vegetal, en niños 24 a 36 meses de edad.

VI. METODOLOGÍA

6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio cruzado y aleatorizado que se llevó a cabo mediante la colaboración entre el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Colorado (UCHSC por su siglas en inglés, University of Colorado Health Sciences Center) y la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

6.2 LUGAR Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio se realizó con 16 niños de 24 a 36 meses residentes de la localidad semi-rural de Fuentezuelas, en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México.

6.2.1 TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra se calculó a partir de los datos de la absorción fraccional de zinc (AFZ) de un estudio previo (Conde, 2008). Se consideró una desviación estándar de 0.05, una diferencia entre medias de 0.045, un error alfa del 0.05, y un poder estadístico de 90. Teniendo un tamaño de muestra de 16 sujetos, considerando una posible deserción del 10%.

6.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron en el estudio los niños (as) que cumplieron con los siguientes criterios:

- Niños (as) entre 24 y 36 meses de edad
- IMC/Edad z-score de > -2 a $< +2$
- Consumo habitual de tortilla, leche y frijoles
- Tolerantes a la leche
- Firma consentimiento informado

6.2.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio a los niños (as):

- Que se encuentren siendo amamantados
- Con un mal control de esfínter
- Presente reflujo
- Que hayan tomado algún suplemento de vitaminas y minerales como tratamiento nutricional en los últimos 3 meses

6.2.4 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Se dieron de baja a los niños que presentaron los siguientes criterios de eliminación:

- Que presentaran un criterio de exclusión durante el estudio o que por alguna razón no deseen continuar participando en el estudio.
- El investigador decida que el sujeto no puede continuar en el estudio.
- Que abandonaran el estudio voluntariamente.
- Que tengan una aplicación nula de alguno de los 3 isótopos (^{67}Zn , ^{68}Zn y ^{70}Zn).

6.3 CARACTERÍSTICAS DEL SUPLEMENTO Y DIETA EXPERIMENTAL

El suplemento está hecho a base de proteína láctea (*SPL*), con vitaminas y minerales. La parte proteica tiene una relación del 60% de suero y un 40% de caseína. Las vitaminas y los minerales se adicionaron para cubrir de un 30% a 100% del IDR. El contenido energético del suplemento es de 200 Kcal con una presentación en un envase *Tetra Pack* blanco de 237 mL sabor vainilla. La composición del suplemento se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Información nutrimental del suplemento de proteína de leche, vitaminas y minerales

Nutrimento	Por porción 237 mL	Unidad
Contenido energético	850	Kilo Joules (kJ)
	200	kcal
Proteína	8	gramos (g)
Grasas (lípidos)	5	g de los cuales
Grasa saturada	0.77	g
Grasa poliinsaturada	1.51	g
Acido linoleico	231	mg
Ácido α -linolénico	84.28	mg
Ácido docosahexaenoico (DHA)	56	mg
Ácido araquidónico (ARA)	56	mg
Grasa monoinsaturada	2.16	g
Ácidos grasos trans	0	g
Colesterol	0	mg

Tabla 3. Información nutrimental del suplemento de proteína de leche, vitaminas y minerales (continuación)

Nutrimento	Por porción 237 mL	Unidad
Hidratos de carbono	31	g de los cuales
Azúcares	9.95	g
Fibra dietética	3	g
Fructooligosacárido (FOS)	2.7	g
Sodio	126.52	mg
Vitamina A	120	µg
(equivalentes de retinol)	400	UI
Vitamina D	3	µg
(colecalfiferol)	120	UI
Vitamina E	8	mg
(equivalentes de α-tocoferol)	8	UI
Vitamina K	20	µg
Vitamina C (ácido ascórbico)	25	mg
Vitamina B (tiamina)	0.5	mg
Vitamina B (riboflavina)	0.5	mg
Vitamina B (piridoxina)	0.5	mg
Vitamina B (cobalamina)	1.2	µg
Ácido fólico (folacina)	114	µg
Niacina (equivalente a ácido nicotínico)	4	mg
Biotina	50	µg
Ácido pantoténico	2.8	mg
Colina	114	mg
Inositol	19	mg
Potasio	310	mg
Cloruro	199.2	mg
Calcio	240	mg
Fósforo	200	mg
Hierro	3.3	mg
Magnesio	47	mg
Zinc	3.2	mg
Manganeso	0.36	mg
Cobre	0.3	mg
Selenio	7.6	µg
Cromo	7.1	µg
Molibdeno	8.5	µg
Yodo	23	µg
Taurina	17	mg
Carnitina	4	mg

Información nutrimental del suplemento de proteína de leche, vitaminas y minerales, Donde; UI son Unidades Internacionales, mg miligramos y µg microgramos

6.3.1 ACEPTACIÓN DEL SUPLEMENTO

Se evaluó la aceptación del suplemento en el mes de julio del 2012 durante 3 meses con 66 niños de 6 a 10 años de edad en la localidades semi-urbanas de “El Márquez”, municipio del estado de Querétaro, México, en donde 30.3% de los participantes afirmó que el suplemento le “gustó” y el 54.5% le “gustó mucho”.

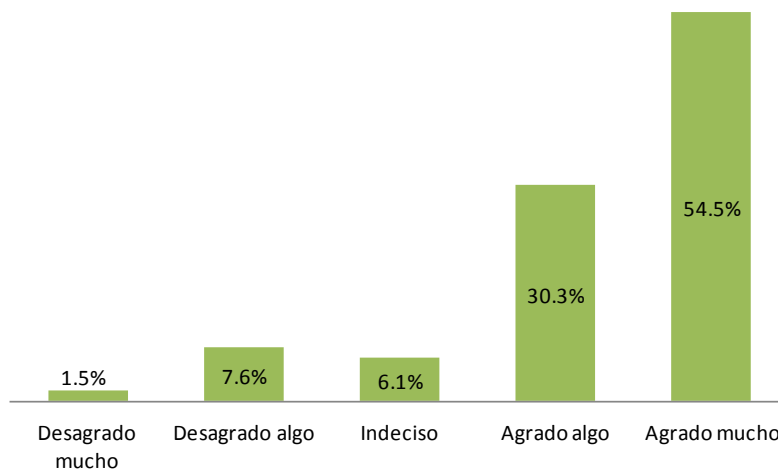


Figura 3. Aceptabilidad del suplemento

6.3.2 DIETA DE ORIGEN VEGETAL

6.3.2.1 EVALUACIÓN DE LA DIETA HABITUAL DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO

Se realizó un cuestionario de frecuencia de alimentos (Figura 4) antes de la intervención, en octubre del 2012 a madres de niños de 24 a 36 meses en la localidad de Fuentezuelas en Tequisquiapan, Querétaro.

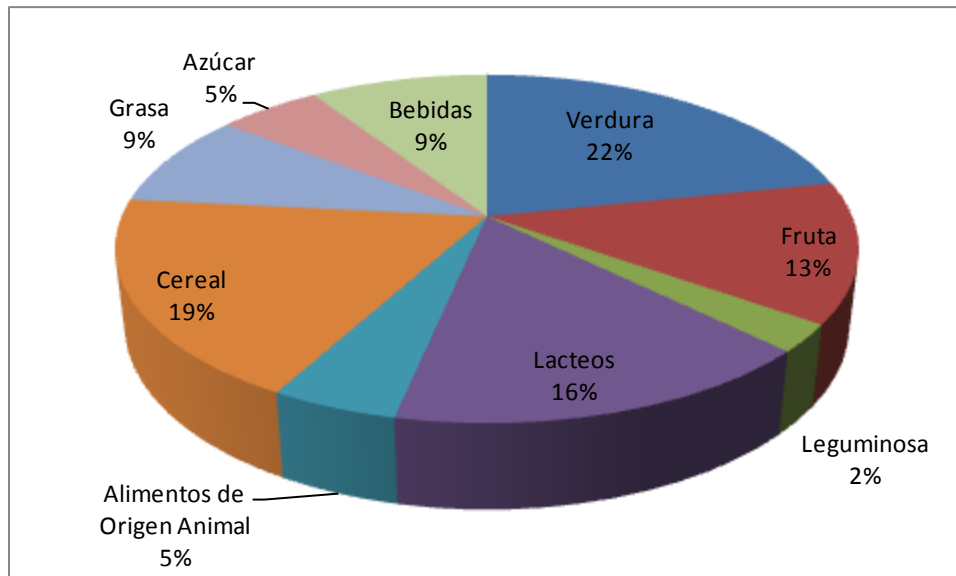


Figura 4. Frecuencia de alimentos por grupo de alimentos

Encontramos que el 100% de los niños consumía tortilla y frijol, correspondiendo el 31% del aporte total del grupo de los cereales a la tortilla y el 74% del grupo de las leguminosas, correspondió al frijol. También se observó que el 18% de la ingesta total era de alimentos de origen animal y el 74% de alimentos de origen vegetal. Con la evaluación de la dieta, se obtuvo información precisa para realizar la dieta experimental, tomando en cuenta las demandas del estudio.

6.3.2.2 DISTRIBUCIÓN DE LA DIETA

La dieta experimental se calculó de 1090 Kcal por día de acuerdo a la FAO en el 2011, consistió en dos tortillas con frijol (flor de mayo) y ensalada de nopal (jitomate y nopal). La dieta se consumió en 5 tiempos de comida, teniendo la misma distribución del porcentaje de macronutrientes en el desayuno, comida y cena, como se muestra en la Tabla 4. El desayuno se dio a las 8:00 am, la comida a las 12:00 pm y la cena a las 4:00 pm, tanto la colación matutina como la vespertina se dieron de acuerdo a la demanda de cada sujeto, siendo pera, manzana y uva.

Tabla 4. Distribución de tiempos de comida

	%	Kcal	HC	Proteína	Grasa
Desayuno	30	327	50.7	11.4	8.7
Colación	5	54.5	8.6	1.6	1.5
Comida	30	327	50.7	11.4	8.7
Cena	30	327	50.7	11.4	8.7
Colación	5	54.5	8.6	1.6	1.5
Total	100	1090	169.3	37.4	29.1

El contenido nutrimental de la dieta (Tabla 5), se realizó tomando en cuenta que el 10% de zinc en la dieta debía ser igual que el zinc dado en los isótopos orales (675 µg).

Tabla 5. Contenido nutrimental macronutrientes, hierro, zinc y fitato de la dieta experimental

Alimento	Porción	Gramos	Kcal	Hidratos de Carbono (gr)	Proteína (gr)	Grasa (gr)	Hierro (mg)	Zinc (mg)	Ácido Fítico (mg)
Frijol promedio	1/4 tz	40	138.8	24.6	8.5	0.7	2.2	1.1	52.45
Tortilla	2 pz	60	147.7	28.3	2.6	2.6	1.5	0.5	144
Jitomate	¼ pz	20	4.2	0.86	0.12	0.05	0.05	0.02	--
Nopal	¼ pz	25	6.5	1.4	0.18	0.01	0.04	0.04	--
Aceite	1 cdita.	5	50	0	0	5	0	0	0
Total			347.2	55.2	11.4	8.4	3.8	1.7	196.45
Suplemento	1/3pz	79	66.7	10.3	2.7	1.7	1.1	1.1	0

Fuente: Chavéz et al., 2006; Díaz et al., 2003

La colación se realizó a las dos horas de haber consumido algún tiempo de comida, para evitar que la colación fuera marcada con los isótopos orales, los cuales fueron elegidos según su bajo contenido de hierro, zinc y ácido ascórbico, así como la frecuencia de consumo de estos alimentos, según los datos arrojados en la frecuencia de alimentos realizada.

6.4 ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE ZINC

Se evaluó la absorción de zinc en un diseño experimental de tipo cruzado. Se estudió a 16 niños quienes recibieron la dieta experimental durante el desayuno, la comida y la cena, con o sin SPL (79 mL en cada tiempo de comida) en los días 1 y 2. Se tomó la muestra de sangre el día 2 del estudio. Las muestras de orina se recogieron el día 1 y del 6 a 9 para medir la absorción de zinc de los isótopos ^{67}Zn , ^{68}Zn y ^{70}Zn (Figura 5).



Figura 5. Diagrama de flujo del estudio de absorción de zinc

6.4.1 ALEATORIZACIÓN

La lista de asignación se realizó de forma aleatoria a uno de los 2 grupos: ZnCS- Zinc Con Suplemento día 1 (n=8), ZnSS – Zinc Sin Suplemento día 1(n=8). Haciéndose la aleatorización mediante la página de internet www.randomization.com asignándose según el orden en que se recluto a cada niño. La población se dividió de la siguiente manera:

Tabla 6. Esquema de aleatorización para estudios de absorción de zinc

Sujeto ID	Grupo	Día 1	Día 2
1	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)
2	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
3	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
4	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
5	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)
6	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
7	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
8	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)
9	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)
10	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)
11	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
12	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)
13	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)
14	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
15	ZnCS	Dieta + (SPL)	Control
16	ZnSS	Control	Dieta + (SPL)

6.5 LINEAMIENTOS ÉTICOS

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y por el Consejo de Revisión Múltiple Institucional del Centro de Ciencia de la Salud de la Universidad de Colorado (COMIRB UCHSC por sus siglas en inglés, Colorado Multiple Institutional Review Board of the University of Colorado Health Sciences Center). De cada participante se obtuvo firma de la carta de Consentimiento Informado de acuerdo con los lineamientos éticos.

6.6 PROCEDIMIENTOS

6.6.1 PREPARACIÓN DE LA DIETA

La dieta de origen vegetal proporcionada a los participantes los días 1 y 2 (martes y miércoles), fue preparada día con día por el equipo de trabajo a partir de

dos piezas de tortilla de 30 g cada una, 40 g de frijol flor de mayo, 20 g de jitomate, 25 g de nopal cocido y 5 mL de aceite vegetal; dando en la colaciones uva, manzana y pera. Las frutas y verduras se lavaron y prepararon al inicio de cada día y se guardaron en refrigeración a lo largo del mismo.

La preparación de la dieta se llevó a cabo en la comunidad aplicando las buenas prácticas de higiene en los alimentos, de acuerdo a Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994.

6.6.2 PREPARACIÓN DEL ISÓTOPO

Las soluciones de isótopos estables se prepararon en Colorado, EUA y fueron entregadas personalmente en México. Se prepararon a partir óxido de zinc enriquecido (Trace Sciences International, Toronto, Canadá) disolviendo la sal en 2 mL de H^2SO^4 1M, se agitaron hasta que todas las partículas se disolvieron. La dosis intravenosa se disolvió en NaCl al 0.45% estéril y se ajustó con NaOH para obtener un pH deseado de 6.0. Mientras que las dosis orales se diluyeron en Milli-Q (MQ) y se ajustaron a pH 3.0 usando NaOH. Las soluciones se filtraron a través de un filtro de 0.2 micras directamente en viales estériles (soluciones IV) o tubos de ensayo (orales) bajo una campana de flujo laminar. Se explica más a detalle en la técnica hecha por Hambidge y colaboradores en 2004.

Las soluciones se expusieron a prueba de pirógenos en el centro de investigación clínica. Se almacenó el isótopo intravenoso en viales estériles y los orales en tubos de ensayo, conteniendo 3 dosis por sujeto con 225 μg ^{70}Zn (en total 675 μg), 3 dosis por sujeto con 225 μg ^{67}Zn (en total 675 μg) y 1 dosis por sujeto con 700 μg ^{68}Zn para administración IV (intravenosa). Se refrigeraron hasta el momento de su administración.

6.7 INTERVENCIÓN

Antes de iniciar el estudio se capacitó al personal de campo en todos los aspectos para la administración de la dieta experimental. El entrenamiento incluyó la obtención del peso de los alimentos, la determinación el desperdicio del plato, los

métodos de administración y el manejo de los isótopos orales, la recolección de dieta por duplicado para los análisis, así como la elaboración de la alícuota. El proceso de la administración IV de isótopos, incluyendo enjuagado, también se revisó durante esta etapa.

Se hizo una invitación abierta a los padres de los niños que quisieran participar. Se les proporcionó información de manera oral como escrita del estudio en la casa del DIF (Sistema para el Desarrollo Integral de la Familia) de Fuentezuelas. Participaron en el estudio aquellos niños cuyos padres o tutores firmaron la carta de consentimiento informado, en donde se comprometieron a cumplir con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Los participantes que cumplieron con los criterios se asignaron de forma aleatoria en uno de los 2 grupos, dividiéndolos en 4 grupos de 4 participantes cada uno, durante 35 días.

Los días de trabajo con cada grupo se numeraron del 0 al 9 para fines de logística.

El día 0 los niños fueron examinados por el médico de Fuentezuelas, se les aplicó una frecuencia de alimentos, historia clínica y cuestionario socioeconómico por las trabajadoras de campo nutriólogas, se les tomaron las siguientes medidas antropométricas: peso, talla y perímetro cefálico y finalmente se les entregó un frasco nalgene de plástico libre de minerales para la recolección de la orina basal.

Una vez conformado el grupo en turno, se procedió a asignar el código de su tratamiento (previamente aleatorizado), así como un número de participación para cada integrante.

6.7.1. ADMINISTRACIÓN DE LA DIETA

Los participantes acompañados de sus madres fueron citados a las 7:50 am en ayunas el día 1 y 2 del estudio a la casa del DIF. En todos los tiempos de comida las madres alimentaron a sus hijos y el personal de campo sólo supervisaba la administración. La preparación de las comidas fue hecha haciendo uso de

recetas locales con la ayuda de dos cocineras contratadas de la misma localidad. La ingestión dietética se realizó de la siguiente manera:

- Se pesó el recipiente limpio y vacío, y se anotó el peso, a cada grupo se le asignó un color, el cual fue igual que su recipiente.
- Se sirvió de manera individual el frijol, tortilla y ensalada de nopales en un recipiente de forma que eran 3 recipientes por niño. Se pesó y se anotó el peso.
- El niño ingirió la dieta, supervisado por la madre y por el personal de campo. El personal de campo se aseguró de la aceptación del tratamiento por parte de los niños del estudio.
- Cualquier pérdida significativa durante la comida se registró y se pesó con la mayor precisión posible.
- Una vez que el niño terminó de comer, se volvió a pesar el recipiente con el alimento residual y se restó el peso del recipiente vacío para calcular la cantidad de comida que el niño ingirió.
- Se añadió exactamente la cantidad de comida consumida en un contenedor para realizar un duplicado de la dieta.
- Se recolectaron entre 30 y 50 g de cada uno de los ingredientes usados en la dieta para ser enviados y analizados por la Universidad de Colorado.

Se entrevistaron a las madres para averiguar lo que el niño consumió/ bebió en su casa antes de venir y después de dejar el centro comunitario en los días del estudio. Se les indicó a los niños no comer nada durante el día, salvo la comida proporcionada por el personal de campo, en caso de que hubieran ingerido cualquier alimento extra, se recolectó y se colocó en el recipiente de alimento adicional, en el cual también fueron recolectadas las colaciones dadas durante el día 1 y 2 del estudio.

Durante los dos días se ofreció a cada participante tres colaciones para consumo parcial o total, opcionalmente, en caso de sentir hambre, a media mañana entre el desayuno y la comida, media tarde entre la comida y la cena y después de

la cena, todas las colaciones se dieron dos horas después de la dieta experimental; cada una consistió en manzana, uva o pera, al gusto del participante.

6.7.2 DUPLICADO DE LA DIETA

La dieta se preparó por duplicado, para los análisis del contenido de ácido fólico, hierro y zinc.

En los días 1 y 2, se cocinó suficiente alimento para administrar la dieta experimental y guardar en contenedores un duplicado de la dieta. En total se tenían dos contenedores por participante, uno para el duplicado de la dieta y otro para duplicado de alimentos adicionales, como la colación, alimentos que no fueron marcado con isótopo estable.

Posteriormente se licuó el contenido hasta la obtención de una consistencia tipo puré, para esto se uso agua desionizada. El peso de la licuadora se anotó y registró antes de añadir cualquier alimento y después de añadir la comida y el agua desionizada. Se anotaron todos los datos en el formulario de homogeneizado.

Cada homogeneizado se transfirió en 4 recipientes de polipropileno (A, B, C, D) para formar alícuotas y analizarlo posteriores. Se pesaron los recipientes antes y después de añadir el homogeneizado, para determinar el peso exacto de la alícuota. Se anotaron todos los datos en el formulario de homogeneizado.

Cada sujeto tuvo un total de 16 alícuotas de la siguiente manera:

- Contenedor 1 - Duplicados de toda la dieta experimental consumida en el día 1.
- Contenedor 2 - Duplicados de todos los alimentos adicionales en el día 1.
- Contenedor 3 - Duplicados de toda la dieta experimental consumida en el día 2.
- Contenedor 4 - Duplicados de todos los alimentos adicionales en el día 2.

Las alícuotas A, B y C fueron enviados a la Universidad de Colorado para analizar Zn, Fe, ácido fólico. La alícuota D permanece congelada en la UAQ hasta que ya no se necesita una copia de seguridad.

6.7.3 ADMINISTRACIÓN DE ISÓTOPOS ESTABLES

Las trazas de isótopo estable de zinc se administraron de forma oral (^{67}Zn y ^{70}Zn) y por vía intravenosa (^{68}Zn), con el fin de medir la absorción fraccional de zinc por la técnica estándar, es decir, la técnica de relación de trazador isotópico dual (DITR, por sus siglas en inglés, Dual-Isotope-Tracer Ratio). La ingestión oral de ^{67}Zn y ^{70}Zn fue menos de 10% del zinc en la dieta. El método de marcaje precisa para zinc ya ha sido validado por Miller *et al.*, 2000.

El material utilizado para el manejo de las soluciones con isótopos fue libre de zinc; esto incluyó jeringas, guantes, pipetas y tubos de ensayo.

6.7.3.1 ADMINISTRACIÓN DE ISÓTOPOS ORALES (^{67}Zn Y ^{70}Zn)

En el transcurso del día 1 y 2, se administraron 675 μg de ^{67}Zn y ^{70}Zn respectivamente en cada día por vía oral, de la siguiente manera:

1. Se anotó la información del isótopo (lote de isótopos de Zn, número de identificación de la dosis, y la cantidad de dosis), así como la hora en el que los participantes comenzaron a comer la dieta experimental.
2. Una vez que el participante ingirió aproximadamente la mitad de la dieta, se anotó la hora, se abrió el tubo de ensayo con isótopo, teniendo mucho cuidado de no derramar la dosis. Cuando se llegó a derramar, se secó con papel filtro, y se colocó el papel en una bolsa Ziploc (etiquetada con el número del participante) y se guardó para los análisis en la Universidad de Colorado.
3. La dosis se le dio al participante en una jeringa de 5 mL, se mantuvo la jeringa en posición vertical para evitar derrames dosis.
4. Se colocó un papel filtro limpio debajo de la barbilla del participante para recolectar cualquier posible pérdida de dosis. Al final de la administración de dosis oral se añadieron los papeles filtro en la bolsa Ziploc para los análisis posteriores.
5. Se administró la dosis de isótopos oral a la mitad de la ingestión de la comida, dándolo en gotas entre bocados en la boca del niño según como fueron terminando de comer, es decir, comían un bocado y se les daba gotas del isótopo hasta que tanto la comida como el isótopo finalizaran. Se registraron los tiempos de la ingestión de isótopos y la comida en el formato de dieta.

6. Después de que se terminaron la dosis oral, se enjuagó la jeringa con 3 mL de agua potable, y se le administró al participante, se repitió el enjuague, teniendo una total de dos enjuagues (usando la misma jeringa).

6.7.3.2 ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE ISÓTOPO ESTABLE (^{68}Zn)

En la tarde del día 2, entre 2:00 pm y 3:00 pm, se administraron 700 μg de ^{68}Zn por vía intravenosa, de la siguiente manera:

1. Se anotó la información de la dosis del isótopo (lote, número de identificación de la dosis y la cantidad).
2. Se colocó una aguja mariposa al participante y se le añadió una llave de 3 vías.
3. Se administró la infusión en la vena antecubital del participante utilizando procedimientos médicos estándar y materiales libres de zinc.
4. Se tomaron 6 mL de sangre en una jeringa vacía y se colocaron en un tubo para recolección de sangre.
5. Se extrajo con una jeringa el isótopo ^{67}Zn del vial, teniendo extremada precaución de no derramar la dosis, se colocó un papel filtro por debajo del brazo en casos de derrames o fugas, en caso de ser así se colocó el papel filtro en la bolsa Ziploc etiquetada para su análisis.
6. Se colocó la jeringa con la dosis de isótopo en una de las vías de la llave de 3 vías.
7. Se usó una segunda jeringa, para enjuagar el vial con 5 mL de solución salina, se hizo girar suavemente para mezclarlo con cualquier solución de isótopos restante y luego se retiró la solución salina del vial con la misma jeringa.
8. Se colocó esta segunda jeringa con solución salina 0,5 N en otra vía de la llave de 3 vías.
9. Se usó una tercera jeringa, para enjuagar nuevamente el vial con 5 mL de solución salina, se hizo girar suavemente para mezclarlo con cualquier

solución de isótopos restante y luego se retiró la solución salina del vial con la misma jeringa.

10. Se colocó esta tercera jeringa con solución salina 0.5 N en otra vía de la llave de 3 vías.

11. Se anotó el tiempo al comenzar y terminar la infusión, así como al inicio y termino de los dos enjuagues.

12. La administración del isótopo se hizo lentamente en la vena a una velocidad de ~ 1 mL / min, con cuidado de no derramar el isótopo. Cuando existió alguna fuga se colocó las perdidas en el papel filtro

6.7.4 PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Tanto para la toma de sangre como para la administración del isótopo IV, se utilizó una llave de 3 vías y un juego de infusión de mariposa para cada participante, con la finalidad de hacer una sola punción. Todo el procedimiento fue llevado a cabo por una técnica estéril.

Todo el material utilizado fue libre de minerales y estuvo a cargo de la Universidad de Colorado. La sangre se colocó en tubos de ensayo de polipropileno que contienen 120 unidades de heparina libre de metal. Los tubos se invirtieron varias veces inmediatamente después de la recolección. Después de una hora, la sangre fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para separar los eritrocitos del plasma. El plasma se transfirió a tubos de almacenamiento libres de zinc para análisis de zinc en plasma. Se añadieron 6mL 0.9% de cloruro de sodio a los eritrocitos y se mezclaron suavemente. Los eritrocitos se centrifugaron de nuevo a 3000 rpm durante 10 minutos y 0,9% de cloruro de sodio se desecho. El proceso de lavado con cloruro de sodio 0.9% se repitió nuevamente. Se lavaron las células rojas y se almacenaron a -20 ° C hasta su envío a la Universidad de Colorado para su posterior procesamiento y análisis.

6.7.5 PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA

Se recolectó orina el día 1 por la mañana antes de la administración de los isótopos, y en los días 6-9, tomando la primera y la última del día.

El personal de campo capacitó a las madres en la recolección de la muestra de orina, realizando junto con ellas la recolección del día 1, siendo esta la orina basal. Indicándoles orinar directamente en el recipiente, recogiendo entre 20 mL y 50 mL de orina y cerrar la tapa fuertemente.

Los participantes y sus madres fueron citados en el centro de la comunidad a las 9:00 am en los días 6-9 para recolectar diariamente la muestra de orina (se anotó el tiempo y la fecha de recolección en el formato de Recolección de Orina). Al final del estudio se obtuvo un total de 8 muestras de orina, por niño, además de la orina basal. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su envío a la Universidad de Colorado para los análisis.

6.8 INSTRUMENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS

6.8.1 HISTORIA CLÍNICA

Se realizó el día 0, a la madre de los participantes, con la finalidad de conocer el estado de salud del niño. Consta de una entrevista sobre datos generales, aspectos relacionados con las características generales de los niños y con el estado general de salud. La historia clínica fue aplicada por nutriólogas.

6.8.2 CUESTIONARIO NIVEL SOCIOECONÓMICO

Se realizó el día 0, a la madre de los participantes. Cubrió aspectos relacionados con las condiciones de la vivienda, condiciones de hacinamiento, propiedad de la vivienda las cuales son necesarias para la conformación de la variable del nivel socioeconómico de los participantes.

6.8.3 FRECUENCIA DE ALIMENTOS

Se realizó el día 0, a la madre de los participantes, con la finalidad de conocer el consumo habitual de alimentos en los niños. Se hizo de manera cuantitativa, preguntando el número de veces y la cantidad que consumen los alimentos en los últimos 3 meses. La ingestión de nutrimentos se calculó usando tablas de composición de alimentos del Departamento de Agricultura de Estados

Unidos (USDA) y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (Chávez *et al.*, 2006).

6.8.4 ANTROPOMETRÍA

Se realizó el día 0, midiendo el peso, la talla y el perímetro cefálico de los participantes. Se evaluó el estado nutricional del niño, de tal forma que se incluyeron los niños que cumplieron los criterios de inclusión. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y una tercera medición si la diferencia es superior a 5 g peso, 0.4 cm altura o 0.2 cm perímetro cefálico.

Las mediciones fueron realizadas por nutriólogas previamente estandarizadas en forma no consecutiva siguiendo los procedimientos de la Secretaría de Salud (2002).

El perímetro cefálico se midió con una cinta métrica plastificada (Seca 201). El peso se tomó con una báscula electrónica (Seca-Erecta 844, Seca Hanover MD) con capacidad de 140 kg y precisión de 10 g. Los niños fueron pesados sin zapatos, sin suéter o chamarras y sin objetos pesados. Para la talla se utilizó un estadiómetro (Seca-Bodymeter 208, Seca Hanover ND) de 2 m con separación de 0.1 cm. Con el peso y la talla se calculó el IMC para la edad (Z; IMC-Edad) de acuerdo con el Manual WHO Anthro (WHO, 2009).

6.9. TÉCNICAS DE LABORATORIO Y PROCEDIMIENTOS

6.9.1. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

La muestra de sangre se analizó en el Laboratorio de Nutrición Humana de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. Para la determinación de zinc en plasma se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica con flama (Perkin Elmer, Mod. Analyst 700). Para la determinación de hierro se utilizó un kit ELITech y sueros control (normal y patológico) Spinreact, usando el método PIT-FEFR (09/2006) y un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Mod Zeeman 5100). La ferritina en el suero se cuantificó mediante la turbidimetría del método aglutinación de partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-ferritina humana usando un

kit de BioSystems (España), se midió por espectrofotometría (Perkin Elmer, ModZeeman 5100). La proteína C-reactiva se midió utilizando un kit comercial de alta sensibilidad para ELISA (Bioquant, San Diego CA, EUA) con un fotómetro de microplacas MultiskcanAscent (ThermoElectronCorporation, Massachusetts, EUA). La determinación de la hemoglobina y el recuento sanguíneo completo se llevó a cabo utilizando un equipo de Cell-Dyn y los estándares correspondientes (Cell-Dyn 1400, Abbott, EUA) (Veillon C, 1996).

Los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, con los calibrados y controles adecuados.

Los puntos de corte utilizados para niños de 24 a 36 meses se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Puntos de corte para deficiencia de minerales en niños.

Puntos de corte			Referencia
Hierro	Deficiente	<45 µg/dL	WHO, 2011
	Insuficiente	<60 µg/dL	
Ferritina	Deficiencia	<12.9 µg/L	Shamah-Levy <i>et al.</i> , 2012
Zinc	Deficiente	<65 µg/dL	Hotz <i>et al.</i> , 2003; Shamah-Levy <i>et al.</i> , 2012
Hemoglobina	Deficiente	<10.9 g/dL	Schreiber, 2003
Proteína C Reactiva	Infección aguda	>3 mg/L	Sério, 2010
Alfa-1-glicoproteína Ácida	Infección crónica	>150 mg/dL	Sério, 2010

6.9.2. ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Los análisis de zinc, hierro y fitato de la dieta se realizaron en la Universidad de Colorado.

El contenido de zinc y hierro se determinó por espectrofotometría de absorción atómica de flama (EAAF) ajustado con deuterio (Kjellström, 1979). El análisis para el contenido de fitatos se empleó con HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) con intercambio de aniones para hacer una medición directa de fitatos y fosfato penta-/hexa-inositol (Rounds y Nielsen, 1993).

6.9.3. ANÁLISIS DE LA ABSORCIÓN DE ZINC

Las muestras de orina fueron digeridas en humedad para remover toda materia orgánica presente usando un sistema de digestión con horno de microondas, posteriormente el zinc se separó de otros compuestos inorgánicos por quelación/extracción con éter (Veillon *et al.*, 1996). Las relaciones entre los isótopos se midieron por espectrometría de masas de conductividad acoplado (ICP-MS por sus siglas en inglés, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). El ICP-MS fue operado con el modo de detección por conteo de iones, optimizado a una masa de 66 para detectar el índice máximo posible (50PPB ^{66}Zn).

Esta técnica consta de la medición de tres isótopos estables de zinc, donde se considera que, la frecuencia vibracional, asociada con los enlaces del isótopo ligero, será mayor que la asociada a enlaces con el isótopo pesado. Como consecuencia, los enlaces formados con el isótopo ligero serán más débiles y más fáciles de romper que los que se forman con el isótopo pesado (Redondo, 2005). Se midieron las siguientes relaciones entre los isótopos: $^{67}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$ y $^{70}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$, basada en enriquecimiento de orina el cual se define como la cantidad isotópica de zinc en la muestra dividida entre la cantidad total de zinc en la misma. Por último, la ATZ y la AFZ se determinaron, la descripción completa del método analítico ha sido previamente publicada por Krebs en 1995.

En la tabla 8 se muestra de manera resumida las técnicas a utilizar para cada marcador.

Tabla 8. Resumen de técnicas

Fitatos (alimentos y suplemento)	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
Zinc (alimentos y suero)	Espectrometría de absorción atómica
Biometría hemática	Impedancia eléctrica
Proteína C reactiva	Espectrofotometría
Alfa-1 glucoproteína ácida	Inmunoensayos
Proporciones de ^{67}Zn , ^{68}Zn y ^{70}Zn	Espectrometría de masas de conductividad acoplada (ICP-MS).

6.10 Procesamiento de datos

El procesamiento de datos incluyó cálculos del zinc total en la dieta experimental (ZTD), absorción fraccional de zinc (AFZ) y absorción total de zinc (ATZ).

La AFZ se determinó por la técnica de DITR, basada en el enriquecimiento de orina con isótopos estables de zinc (Friel *et al.*, 1993; Krebs *et al.*, 1995). Para cada sujeto los datos del enriquecimiento de orina con el isótopo estable de zinc administrado vía intravenosa (^{68}Zn) fueron extrapolados a 24 horas para calcular la AFZ de los isótopos de zinc administrados por vía oral (^{67}Zn y ^{70}Zn). Así, la AFZ fue determinada a partir de la relación en las concentraciones de los isótopos en la orina (Friel *et al.*, 1992).

La ATZ de las comidas experimentales se determinó multiplicando la cantidad conocida de zinc ingerido por la absorción fraccional previamente determinada.

Así, el ZTD y la ATZ para cada individuo se calculó a partir de las siguientes ecuaciones:

$\text{ZTD (mg Zn)} = \text{mg de Zn en cada gramo de dieta experimental} * \text{gramos de la dieta experimental consumida.}$

$\text{ATZ (mg Zn)} = \text{ZTD (mg Zn)} * \text{AFZ (mg Zn).}$

6.11 Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos en el estudio se calcularon estadísticos descriptivos tales como medidas de tendencia central y de dispersión para conocer de la población estudiada las características descriptivas como edad, estado nutricional por IMC, estado de zinc, hierro, ferritina, PCR y AGP, así como variables de interés propias del estudio como concentraciones de zinc y fitatos en la dieta experimental, AFZ y ATZ.

Se hizo una comparación con prueba de T para muestras pareadas: entre ATZ y la AFZ al consumir la dieta experimental con el suplemento y sin él.

Se aplicaron pruebas de correlación (de Pearson) para conocer las asociaciones entre:

ATZ y AFZ con la edad, IMC, ZTD, contenido de fitatos en la dieta y relación molar ácido fólico:zinc

En todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de significancia de 5%.

Todos los análisis se analizaron utilizando el programa SPSS v18 (SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Inc., Chicago, IL).

VII. RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN

Se realizó un escrutinio en la localidad de Fuentezuelas, Tequisquiapan, donde 20 niños de 24 a 36 meses fueron incluidos (cumpliendo los criterios de inclusión), 2 fueron excluidos por seguir en lactancia materna, un niño por tener un inadecuado control de esfínter y un cuarto niño por falta de consentimiento por parte del padre, quedando así 16 sujetos, de los cuales 2 más fueron eliminados al final del estudio por una aplicación nula del isótopo intravenoso, sólo 14 sujetos completaron el estudio (Figura 6).

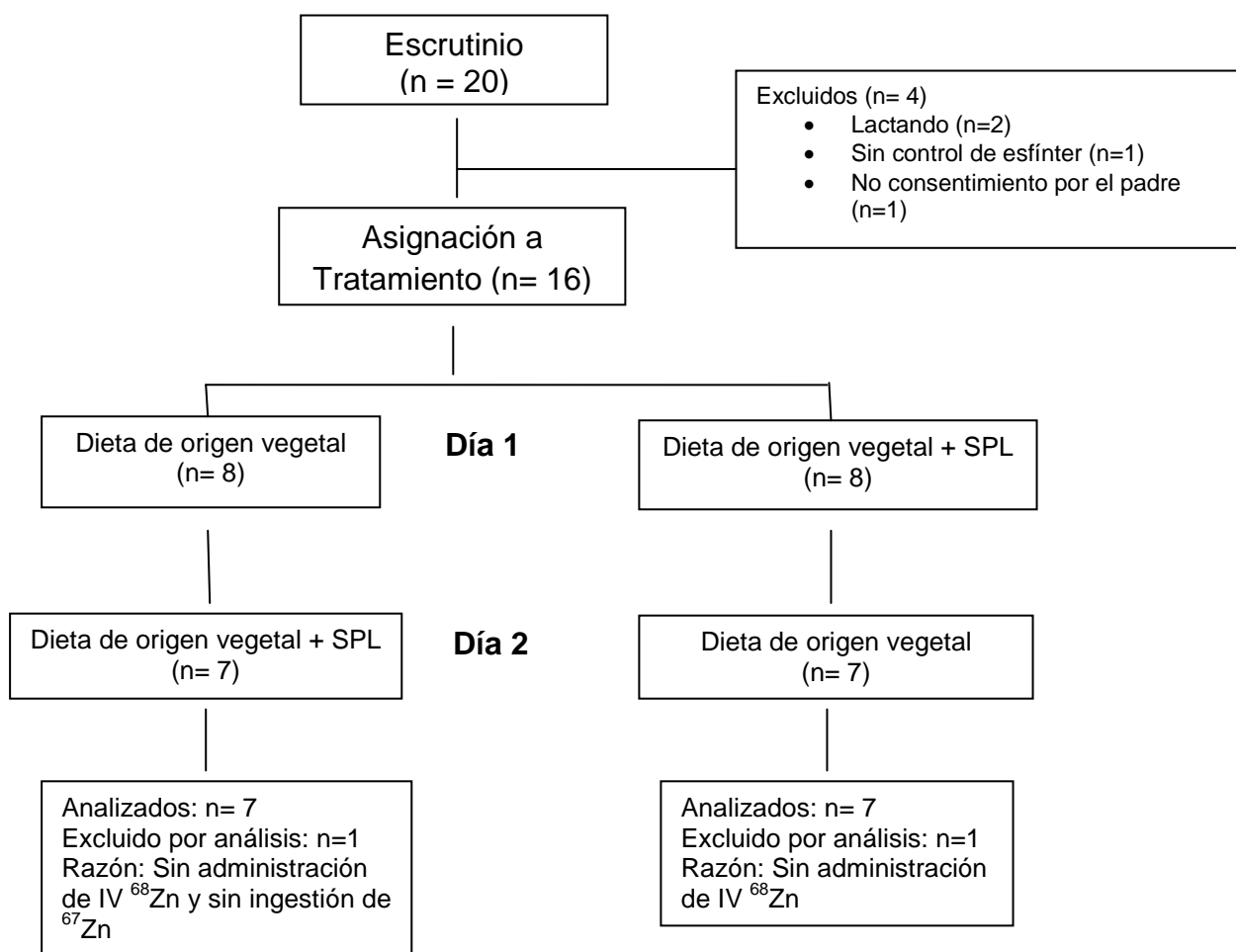


Figura 6. Diagrama de flujo de sujetos participantes, aleatorización de los grupos. SPL: suplemento de proteína láctea.

Las características generales de la población estudiada (n=16) al inicio del estudio se muestra a continuación en Tabla 9.

Tabla 9. Características generales de la muestra (n=16)

Variable	Media	Desviación estandar	
Niños	8		
Niñas	8		
Edad (meses)	31.2	±	4.4
IMC/Edaad (Z score)	1.28	±	0.79
Perímetro cefálico (cm)	48.73	±	1.42
AGP (mg/dL)	126	±	26.78
CRP (mg/dL)	1.26	±	0.85
Hemoglobina (mg/dL)	13.3	±	0.65
Zinc en suero (µg/dL)	75.7	±	11.8

Media ± Desviación Estándar

7.2 DIAGNÓSTICO DE LA POBLACIÓN

De acuerdo al IMC/Edad se determinó que todos los niños se encontraban en la normalidad con un Z score de -1.99 a 1.99, mostrando una tasa de crecimiento adecuado. Este dato lo corroboramos con el perímetro cefálico.

En la Tabla 9 podemos observar que los marcadores de infección, AGP y CRP, se encuentran por debajo de sus puntos de cortes (AGP >150 mg/dL y CRP >3 mg/L), descartando que nuestra población se encontraba con algún proceso infeccioso.

Un sujeto presentó valores por debajo de lo normal en el zinc plasmático (<65 µg/dL).

La población estudiada se encontraba normocrómica con una concentración de hemoglobina corpuscular media entre 36 y 32 g/dL, normocítico con un volumen corpuscular medio entre 76 y 90 fL (datos no mostrados) y con hemoglobina < 10.9 mg/dL, por lo que podemos corroborar que no existía algún tipo de anemia.

El 94% de los sujetos nacieron en término, de los cuales el 80% tuvo un peso adecuado entre 2,500 y 4,000 g; ninguna de las madres fumó ni consumió bebidas alcohólicas durante el embarazo.

Se encontró que 68.6% de los padres tenían secundaria terminada, el 12.5% tenían secundaria incompleta y el 12.5% tenían primaria terminada; el 43.8% de las madres contaban con secundaria completa, el 12.5% tenían secundaria incompleta y el 37.5% tenían primaria completa. La mayoría vivían en casa propia, con tuberías dentro de la vivienda, contando con letrinas (81%), todos tenían paredes de tabique, algunos tenían piso de cemento firme y otros de loseta o duela. El 37.5% de los niños no tenían hacinamiento (menos o igual de 2 personas por dormitorio), el 56.3% tenían un hacinamiento medio (de 3 a 5 personas por dormitorio) y el 6.3% tenían un hacinamiento crítico (más de 5 personas por dormitorio), según los criterios de CELADE (Centro Latinoamericano y Caribeño de Demografía); con todas estas características podemos observar que nuestra población de estudio se encontraba en un entorno rural típico mexicano, con un nivel socioeconómico medio bajo y bajo (López, 2009).

7.3 CONSUMO DE LA DIETA

El consumo de la dieta se administró a libre demanda, esto quiere decir que a los niños se les ofrecían dos tacos de frijol y ellos decidían cuanto querían comer. No existió diferencia significativa en el consumo de la dieta experimental entre ambos grupos, consumiendo en promedio porciones similares de tortilla, frijol y nopal, así como cantidades similares de colación. Sin embargo, el grupo que consumió el suplemento tuvo un mayor aporte tanto de macro como micronutrientes, debido al aporte de estos nutrientes en el suplemento (Tabla 10).

Tabla 10. Diferencia en la ingestión entre el grupo control y el suplementado

	SPL		CONTROL		Sig.	IDR	Porcentaje de adecuación SPL (%)	Porcentaje de adecuación CONTROL (%)
Kilocalorías (Kcal)	1111.34	± 244.14	735.63	± 183.81	.001	1090	102.0	67.5
Hidratos de carbono (g)	193.25	± 42.78	135.46	± 34.18	.001	169.3	114.1	80.0
Proteína (g)	47.58	± 12.08	34.83	± 8.93	.001	37.4	127.2	93.1
Grasa (g)	28.79	± 6.45	19.25	± 2.28	.001	29.1	98.9	66.2
Hierro (mg)	16.19	± 3.71	10.21	± 2.52	.001	13.0 a	124.5	78.6
Zinc (mg)	5.19	± 1.07	2.82	± 0.92	.001	4.0 a	129.7	70.5
Ácido fólico (mg)	1266.49	± 382.57	1348.29	± 322.99	.421	---	---	---

Media ± Desviación Estándar

a Ingestión diaria sugerida (IDS)

SPL: Suplemento de Proteína Láctea

IDR: Ingestión Diaria Recomendada

Prueba t, muestras pareadas

La diferencia en la cantidad de lo ingerido es debido a que los hidratos de carbono, la proteína, la grasa, el hierro y el zinc estaban presentes en el suplemento; en cambio el ácido fólico no tuvo diferencias significativas ya que no se encontraba presente en el suplemento.

7.4 ABSORCIÓN TOTAL Y FRACCIONAL DE ZINC

Como se muestra en la Tabla 11, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la ATZ y la ZTD entre ambos grupos, existiendo un aumento en el grupo suplementando, mientras que la AFZ no mostró diferencia significativa.

Tabla 11. Diferencia de la absorción y concentración de zinc en la dieta entre grupos.

	SPL		CONTROL		Sig.
AFZ	0.092	± 0.037	0.089	± 0.030	.726
ATZ (mg)	0.463	± 0.185	0.256	± 0.137	.001
ZTD (mg)	5.189	± 1.066	2.8200	± 0.920	.001

Media ± Desviación Estándar

AFZ: Absorción Fraccional de Zinc

ATZ: Absorción Total de Zinc

ZTD: Zinc Total en la Dieta

SPL: Suplemento de Proteína Láctea

Cambio significativo en prueba t pareada, $t < 0.05$

El ZTD en el grupo suplementado fue 2.369 mg (46%) mayor que el grupo control, mientras en la ATZ fue 0.207 mg (45%) mayor. La absorción total de zinc se ve de manera gráfica en la Figura 7, observando el comportamiento de cada sujeto durante la suplementación y sin ella.

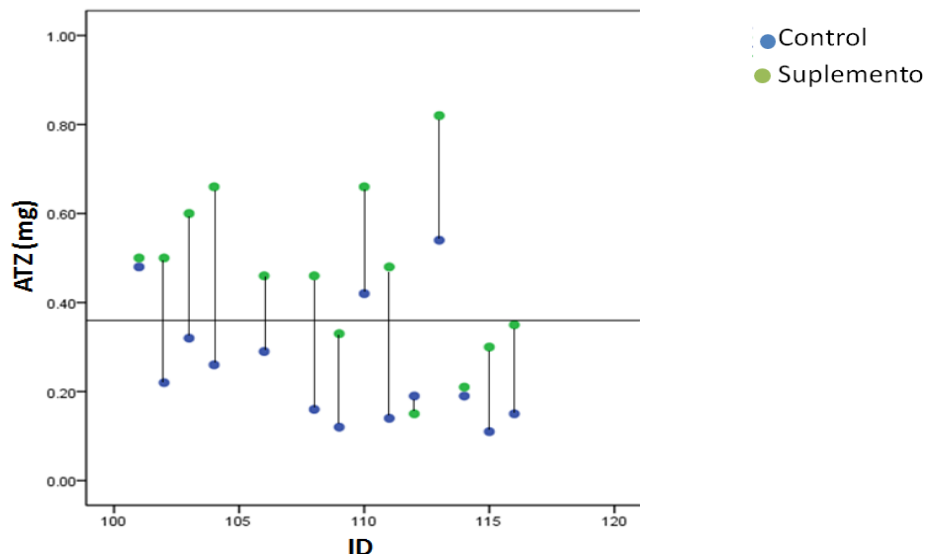


Figura 7. Absorción total de zinc de cada sujeto al ser o no suplementado. ATZ: Absorción total de zinc. Prueba t, muestras pareadas, $t < 0.05$

En las siguientes figuras se compara de manera gráfica ambos grupos, existiendo un aumento de la AFZ (Figura 8) en el grupo suplementado, sin ser este significativo. En cambio el aumento en la ATZ (Figura 9) y la ZTD (Figura 10) en el grupo suplementado, fue estadísticamente significativo.

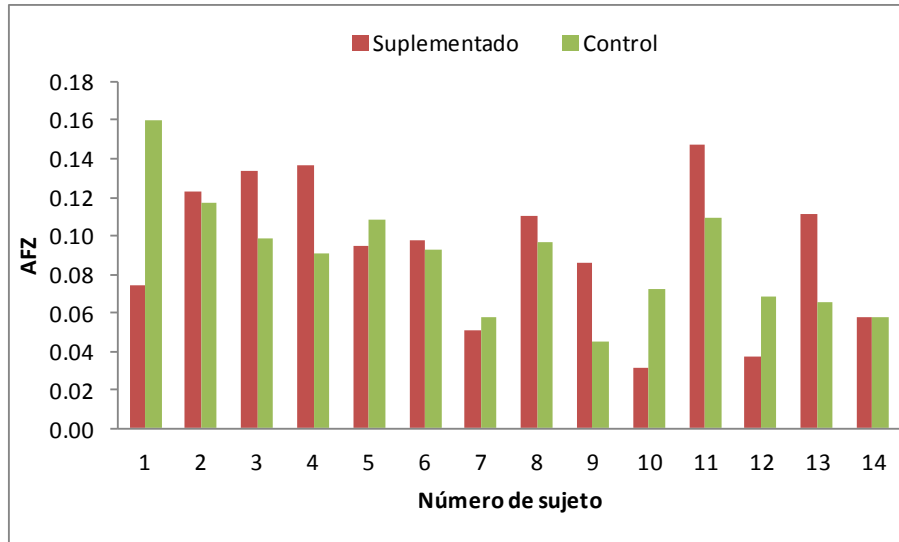


Figura 8. Diferencia en la Absorción Fraccional de Zinc (AFZ) entre el grupo suplementado y el control. No existió diferencia significativa de la AFZ entre los grupos, Prueba t, muestras pareadas, ($p = 0.726$)

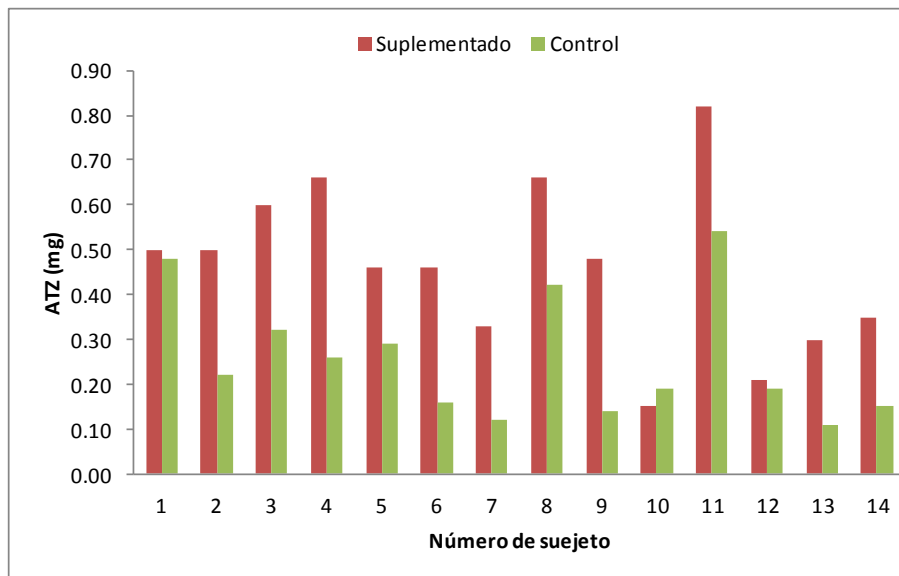


Figura 9. Diferencia en la Absorción Total de Zinc (ATZ) entre el grupo suplementado y el control. El grupo con suplemento aumento significativamente el ATZ con respecto al grupo control, Prueba t, muestras pareadas, ($p = 0.001$)

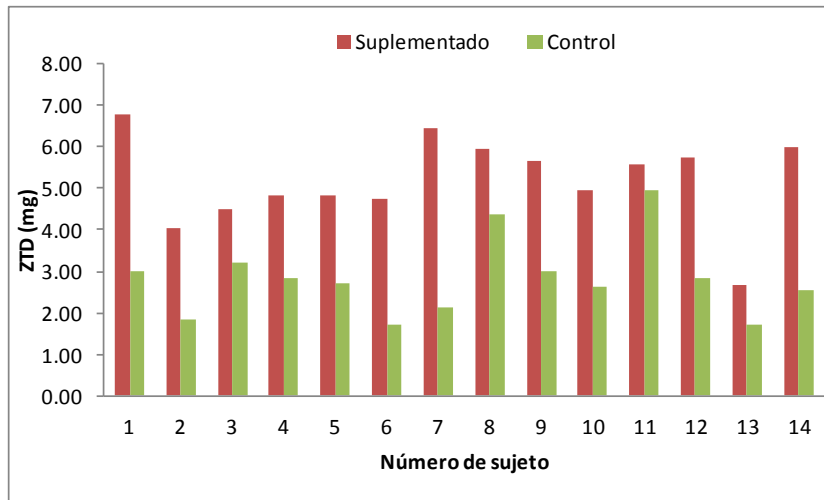


Figura 10. Diferencia del Total de Zinc en la Dieta (ZTD) entre el grupo suplementado y el control. El grupo con suplemento aumento significativamente el ZTD con respecto al grupo control, Prueba t, muestras pareadas, ($p=0.001$)

A un mayor consumo de zinc en la dieta la AFZ puede reducir o ser indiferente (Figura 11), mientras que el ZTD afecta positivamente la ATZ (Figura 12).

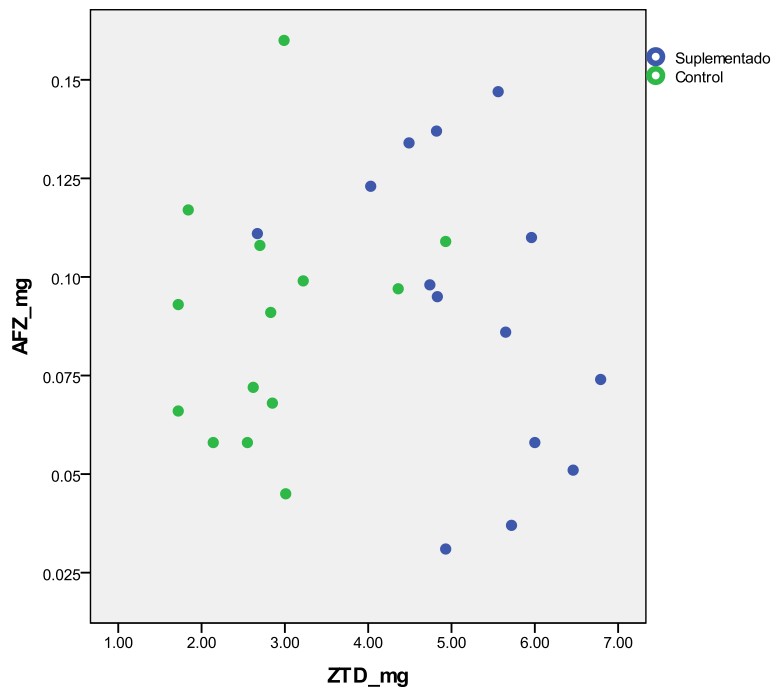


Figura 11. Relación entre consumo de zinc y absorción fraccional de zinc (AFZ). La R de Pearson Total fue $R= -.055$, en el grupo suplementado $R= -.429$ y el grupo control $R=.237$. Ninguno de los coeficientes tuvo una $p < .05$.

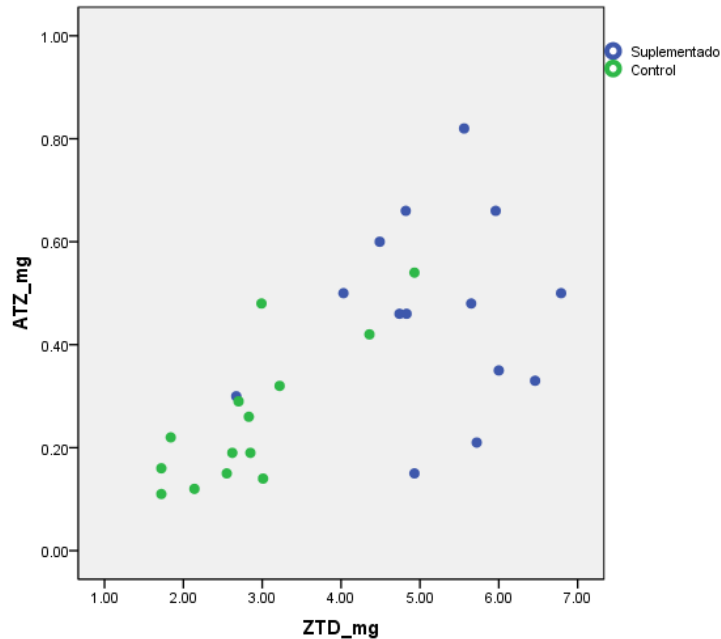


Figura 12. Relación entre consumo de zinc y absorción total de zinc (ATZ). La R de Pearson Total fue $R=0.621$, en el grupo suplementado $R=0.093$ y el grupo control $R=0.802$. La asociación es significativa en una correlación de Pearson ($p = .001$)

La Tabla 12 nos muestra los porcentajes de adecuación de los Requerimientos Fisiológicos (RF), IDR y Límite Superior (LS) en ambos grupos. Se calculó el porcentaje de adecuación según los requerimientos fisiológicos dados por: WHO, FNB/IOM y IZiNCG. El grupo suplementado alcanza a cubrir la IDR, 4mg/d. Sin embargo, esto no es suficiente para cubrir sus RF. En tanto que, el grupo control no cubre la IDR ni sus RF. Ninguno de los grupos llega a exceder del LS. El hecho de que ninguno de los grupos cubra sus RF, puede deberse a la alta presencia de ácido fítico en la dieta mexicana, pues se ha visto que la relación molar de ácido fítico:zinc superior a 15:1 (Hambidge *et al.*, 1998), 18:1 (Hurrell *et al.*, 2010) influye negativamente en la absorción de zinc.

Tabla 12. Porcentaje de adecuación de ambos grupos según el zinc consumido y absorbido

	Requerimientos fisiológicos			IDS Mx (4 mg/d)	LS (8 mg/d)
	WHO	FNB/IOM	IZINCG		
	(0.83 mg/d)	(0.74 mg/d)	(0.53 mg/d)		
Porcentaje de adecuación SPL (%)	55.78	62.57	87.36	129.75	64.88
Porcentaje de adecuación Control (%)	30.84	34.59	48.30	70.50	35.25

IDS: Ingestión Diaria Sugerida

LS: Límite Superior

WHO, por sus siglas en inglés, World Health Organization

FNB/IOM, por sus siglas en inglés, Food and Nutrition Board/ US Institute of Medicine

IZINCG, por sus siglas en inglés, International Zinc Nutrition Consultative Group

SPL: Suplemento de Proteína Láctea

Difícilmente se puede llegar a una relación molar menor de ácido fítico:zinc 15:1 en la dieta mexicana, pero el hecho que la proteínas lácteas puedan promover la absorción de zinc a pesar de la relación molar tan alta es una buena estrategia para aumentar su absorción.

Se encontró una relación molar del ácido fítico:zinc de 21:1 y 41:1 en el grupo suplementado y el control, respectivamente, se vio una diferencia significativa en la relación molar entre ambos grupos, usando una prueba T para muestra pareadas ($p = .001$). Se observó una asociación, con una correlación *de Pearson*, entre la relación molar y la absorción total de zinc en el grupo control ($p = .009$), a diferencia del grupo suplementado donde no hubo dicha asociación ($p = .286$). El que exista asociación en el grupo control y no en el grupo suplementado se puede deber a la presencia de proteínas lácteas que contrarrestan los efectos inhibitorios del ácido fítico en la absorción total de zinc.

No se encontraron asociaciones entre los factores de edad, IMC y sexo con la ATZ y AFZ, ni entre la AFZ, ATZ, ZTD y los pools de zinc intercambiables (EZP, por sus siglas en inglés, Exchangeable Zinc Pool). La absorción fraccional podría tener más interacción con la cantidad de zinc en el lumen intestinal y la presencia de ácido fítico, que del estado de zinc del anfitrión *per se*.

VIII. DISCUSIÓN

Se encontró un aumento en la ATZ al consumir un suplemento a base de proteína láctea.

Algunos estudios han encontrado que la ATZ es directamente proporcional a ZTD y, la AFZ es inversamente proporcional a ZTD (Sandström y Cederbland, 1980; Wada et al., 1985, Reyes, 1996; Tran, 2004; Miller *et al.*, 2007; Hambidge *et al.*, 2010). En este estudio la AFZ no disminuye a pesar de recibir una mayor cantidad ZTD, por lo que la AFZ no fue inversamente proporcional a la ZTD. Esto puede deberse a que no existe una saturación en los transportadores de zinc, no viéndose afectada la absorción de zinc, debido probablemente a la cantidad dada de zinc o al efecto de las proteínas lácteas.

Sin embargo, se ha visto que aunque el consumo de alimentos fortificados con zinc puede reducir la AFZ, el enriquecimiento de zinc afecta positivamente a la absorción total de zinc, incluso después de casi dos meses de exposición al zinc (López *et al.*, 2005), afectando positivamente el enriquecimiento de zinc en la absorción total. Por otro lado, Brown y colaboradores concluyeron en el 2009 que la suplementación de zinc tiene un efecto positivo en la talla. Así mismo, un meta-análisis demostró que la suplementación durante 24 semanas de zinc tiene un efecto positivo en el crecimiento lineal, en niños <5 años de edad, en países en desarrollo (Imdad y Bhutta, 2011).

En el meta-análisis de Imdad y Bhutta, nos habla de un mejor efecto en la suplementación de zinc, cuando se administra sólo, sin embargo, se ha demostrado en muchos estudios que a pesar de que el zinc y el hierro tengan un mecanismo de absorción muy similar, no se ve afectada cuando la relación molar de ambos es 1:1, mientras que si hay una alta proporción de hierro la absorción de zinc se ve inhibida (Troost *et al.*, 2003; Arredondo *et al.*, 2006).

La absorción por transporte activo de zinc en y a través del enterocito ha demostrado ser un proceso saturable, siendo el principal medio para mantener la homeostasis del cuerpo (Reyes, 1996; Hambidge *et al.*, 2010). Se considera que

aunado a este mecanismo, existe un componente de difusión no específica (homeostáticamente regulada), insaturable (Lönnerdal, 2000).

Miller y colaboradores (2007) mencionaron que existe una saturación en los transportadores cuando hay un exceso de zinc, para mantener la homeostasis del zinc. En este estudio no existió una cantidad excesiva de zinc, dicha cantidad fue cercana al IDR (4 mg/d), en comparación a otros estudios donde las cantidades dadas eran 2 veces mayores que lo recomendado. Esto pudiera explicar porque no hubo una disminución en la absorción fraccional del grupo suplementado.

Como se vio la absorción total de zinc del grupo suplementado es 2 veces mayor que el grupo control. La presencia de proteína láctea podría sensibilizar el transporte de zinc, potencializando la absorción de zinc, creando un complejo proteína-zinc ayudando a que entre en el enterocito, por medio de péptidos o aminoácidos (Raikos y Dassios, 2013).

El efecto de la proteína en la absorción de zinc puede deberse a que la α -lactoalbúmina se une a cationes divalentes facilitando su absorción, esto podría deberse a que tiene un sitio de unión específico a zinc (Szymlek-Gay et al., 2012). La α -lactoalbúmina está compuesta principalmente por triptófano (4-5%), lisina (11%) y cisteína (6%) (Lönnerdal y Lien, 2003). Se ha visto que la lisina forma complejos solubles con zinc ayudando en su absorción (Rosado, 1998; Lönnerdal y Lien, 2003). También la histidina es buen quelante de zinc, y los estudios clínicos en sujetos humanos han demostrado su efecto positivo en la absorción de zinc (Lönnerdal, 2000). Durante la hidrólisis de proteínas de la leche son liberados péptidos con N-terminal libres, con amino ácidos libres producidos por la digestión enzimática. Estos ligandos con capacidad quelante, forman complejos solubles de bajo peso molecular con minerales que influyen en su disponibilidad (Drago y Valencia, 2004). La unión de los minerales a péptidos procedentes de las proteínas del suero es menor y menos específica que la unión a péptidos originarios de la caseína, ya que tienen cargas negativas que unen eficientemente metales divalentes (Peso, 2012). El efecto positivo en la absorción de zinc no se ha encontrado en la caseína. Mas sin embargo, la caseína puede contrarrestar el efecto inhibitorio del fitato sobre la absorción de zinc, esto puede deberse a los fosfopéptidos de caseína

(CPP) que hacen complejo con el fitato, aumentando significativamente la absorción de calcio y zinc en crías de ratas lactantes, así como en las células intestinales humanas (células Caco-2) (Lönnerdal, 2000).

Por lo tanto, las proteínas lácteas juegan papeles muy importantes en la disponibilidad del zinc. Por un lado tenemos el suero de leche que potencializa la absorción de zinc y por el otro nos encontramos con la caseína la cual inhibe el efecto del ácido fítico.

El suplemento de proteínas lácteas tiene un cociente de proteínas leche:caseína de 60:40. Dicha relación es similar a la de la leche humana, en la cual se ha encontrado un aumento en la absorción de zinc cercano al 35% (Lönnerdal y Lien, 2003; Drago y Valencia, 2004).

Además de las proteínas lácteas, el suplemento está compuesto por varios micronutrientes, los cuales crean interacciones importantes. Estos micronutrientes se encuentran presentes en cantidades cercanas al IDR. Se ha visto que al no existir cantidades elevadas, los micronutrientes están en equilibrio, compitiendo menos entre ellos (Chen *et al.*, 2006; Imdad y Buhatta, 2011).

Dentro de las limitaciones en este estudio, nos encontramos que no logramos saber con certeza, si el aumento en la ATZ se dio por la proteína de la leche usada como potencializador o el aumento del TZD en el grupo suplementado, siendo diferentes las cantidades de zinc entre los grupos.

IX. CONCLUSIÓN

El consumo de una dieta a base de tortilla y frijol junto con un suplemento de proteína láctea, tiene un efecto positivo en el aumento de la absorción total de zinc, promoviendo así, una mayor biodisponibilidad de este.

X. LITERATURA CITADA

Abdollahi M., Abdollahi Z., Fozouni F., Bondarianzadeh D. (2014). Oral Zinc Supplementation Positively Affects Linear Growth, But not Weight, in Children 6-24 Months of Age. *Int J Prev Med.* 5(3): 280–286

Abrams, S. A. (2008). Assessing Mineral Metabolism in Children Using Stable Isotopes. *Pediatric Blood Cancer*, 50(September 2007), 438–441.

Abrams, S. A., Griffin, I., & Davila, P. M. (2002). Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-. *The American journal of clinical nutrition*, 76, 442–446.

Alfárez M.J.M., López-Aliaga I., Díaz-Castro J., Rodríguez-Ferrer M., y Campos M.S. (2010). Utilización nutritiva de hierro en el transcurso de la ferropdeficiencia. España

Alison Evert (2011). Zinc en la dieta, University of Washington Medical Center Diabetes Care Center, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002416.htm>, última consulta 01/10/12.

Arredondo M, Martinez R, Nunez MT, Ruz M, Olivares M. (2006). Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol Res*, 39(1):95-102.

Bao, B., Prasad, A. S., Beck, F. W. J., Snell, D., Suneja, A., Sarkar, F. H., Swerdlow, P. (2008). Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 152(2), 67–80.

Baro L, Jiménez J, Martínez -Ferez A Y Bouza JJ., 2001, Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales, Granada, España, *Ars Pharmaceutica*, 42:3-4; 135-145.

Black, R. E. (1998). Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. *American Journal Clinical Nutrition*, 68, 476S– 479S.

Bose, A., Coles, C. L., John, H., Moses, P., Raghupathy, P., Kirubakaran, C., & Black, R. E. (2004). Efficacy of zinc in the treatment of severe pneumonia in hospitalized children <2 y old. *American Journal Clinical Nutrition*, 83, 1089–1096.

Bouglé, D., Laroche, D., & Bureau, F. (2000). Zinc and iron status and growth in healthy infants. *European journal of clinical nutrition*, 54(10), 764–7.

- Brown KH, Peerson JM, Baker SK, Hess SY. (2009) Preventive zinc supplementation among infants, preschoolers, and older prepubertal children. *Food Nutr Bull*, 30(1 Suppl):S12-40.
- Buchholz, A. C., & Schoeller, D. a. (2004). Is a calorie a calorie? *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 899S–906S.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 122(2), 402–5.
- CELADE (1996) Déficit Habitacional y Datos Censales Socio-Demográficos: Una Metodología, LC/ DEM/R.267, Centro Latinoamericano y Caribeño de Demografía, Comisión Económica para América Latina y el Caribe, Naciones Unidas
- Chaigne-Delalande, B., & Lenardo, M. J. (2014). Divalent cation signaling in immune cells. *Trends in immunology*, 35(7), 332–344. doi:10.1016/j.it.2014.05.001
- Chen, G., Zhao, L., Bao, S., & Cong, T. (2006). Effects of different proteins on the metabolism of Zn, Cu, Fe, and Mn in rats. *Biological trace element research*, 113(2), 165–75.
- Cheng, Z., Tako, E., Yeung, A., Welch, R. M., & Glahn, R. P. (2012). Evaluation of metallothionein formation as a proxy for zinc absorption in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Food & function*, 3(7), 732–6. doi:10.1039/c2fo10232c
- Chesters, J. K. (1978). Biochemical functions of zinc in animals. *World Rev. Nutrition Diet.* 32:135
- Christian, P., & West, K. P. (1998). Interactions between zinc and vitamin A: an update. *The American journal of clinical nutrition*, 68(2 Suppl), 435S–441S.
- Couderc, R., Mary, R., & Veinberg, F. (2004). Marcadores de inflamación en pediatría. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 6(4), 513–517.
- Cristofalo, E. a, Schanler, R. J., Blanco, C. L., Sullivan, S., Trawoeger, R., Kiechl-Kohlendorfer, U., ... Abrams, S. (2013). Randomized trial of exclusive human milk versus preterm formula diets in extremely premature infants. *The Journal of pediatrics*, 163(6), 1592–1595.e1.
- Cunningham-Rundles, S., McNeeley, D. F., & Moon, A. (2005). Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 115(6), 1119–28.

Davidsson, L., Almgren, a, Sandström, B., Juillerat, M., & Hurrell, R. F. (1996). Zinc absorption in adult humans: the effect of protein sources added to liquid test meals. *The British journal of nutrition*, 75(4), 607–13.

De Benoist, B., Darnton-Hill, I., Davidsson, L., Fontaine, O., & Hotz, C. (2007). Conclusions of the Joint WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG Interagency Meeting on Zinc Status Indicators. *Food and nutrition bulletin*, 28(3 Suppl), S480–4.

Diaz, M., Rosado, J. L., Allen, L. H., Abrams, S. A., & Garcia, O. P. (2003). The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3), 436–40. Digirolamo, A. M., Ramirez-zea, M., Wang, M., Flores-ayala, R., Martorell, R., Neufeld, L. M., Stein, A. D. (2010). Randomized trial of the effect of zinc supplementation on the mental health of school-age children in Guatemala. *The a*, 92, 1241–1250.

Drago, S. R., & Valencia, M. E. (2004). Influence of components of infant formulas on in vitro iron, zinc, and calcium availability. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(10), 3202–7.

Dror, D. K., & Allen, L. H. (2014). Dairy product intake in children and adolescents in developed countries: trends, nutritional contribution, and a review of association with health outcomes. *Nutrition reviews*, 72(2), 68–81.

Echarri, P. P., González Bermúdez, C. A., Vasallo Morillas, M. I., Ros Berruezo, G., Frontela Saseta, C., & Martínez, G. (2012). α -Lactoalbúmina como ingrediente de fórmulas infantiles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(1), 6–14.

Fairall, L. Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., Rhodes, D. (1993). The cristal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extensión to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* 2:366 (6454): 483-87

Fekete, Á. a, Givens, D. I., & Lovegrove, J. a. (2013). The impact of milk proteins and peptides on blood pressure and vascular function: a review of evidence from human intervention studies. *Nutrition research reviews*, 26(2), 177–90.

Feliu, M. S., Piñeiro, A., López, C., & Slobodianik, N. H. (2005). Valores de referencia de cobre , zinc y selenio en niños. *Bioquímica Clínica*, 39(4), 459–462.

Fernando, C., Elia, O., & Rafael, L. (2007). Relación entre la anemia ferropénica y la infección por *Helicobacter pylori*, 23(2).

Fischer Walker, C. L., & Black, R. E. (2007). Functional indicators for assessing zinc deficiency. *Food and nutrition bulletin*, 28(3 Suppl), S454–79.

Fischer Walker, C. L., Kordas, K., Stoltzfus, R., & Black, R. E. (2005). Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional. *The American journal of clinical nutrition*, 85, 5–12.

Forrellat, M., Gautier, H., & Fernandez, N. (2000). Metabolismo del Hierro. *Revisita cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 16(3), 149–160.

Friel JK, Naake VL, Jr., Miller LV, Fennessey PV, Hambidge KM (1992). The analysis of stable isotopes in urine to determine the fractional absorption of zinc. *The American journal of clinical nutrition*, Feb;55(2):473-7.

Gaitán C, D., Olivares G, M., Arredondo O, M., & Pizarro A, F. (2006, August). Biodisponibilidad De Hierro En Humanos. *Revista chilena de nutrición*.

Garcia-Nerbot, M., Reyes, B., & Alegría, A. (2013). Iron and zinc bioavailability in Caco-2 cells: Influence of caseinophosphopeptides, 138(june), 1298–1303.

Garibay, E. M. V., Ángel, M., Ortega, O., Velarde, E. R., & Rodríguez, F. N. (2008). Factores de riesgo de retraso en el crecimiento lineal en niños de 12 a 120 meses de edad en Arandas, Jalisco, México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(4), 336–342.

Gibson, R. S. (1994). Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *American Journal Clinical Nutrition*, 59(2), 1223–1232.

Gibson, R. S., Bailey, K. B., Gibbs, M., & Ferguson, E. L. (2010). A review of phytate, iron, zinc, and calcium concentrations in plant-based complementary foods used in low-income countries and implications for bioavailability. *Food and Nutrition Bulletin*, 31(2), S134–146.

Gómez, M. M., Garríguez, A. C., Erce, J. A. G., & Ramírez, G. (2005). Fisiopatología del metabolismo del hierro: implicaciones diagnósticas y terapéuticas. *Nefrología*, XXV(1), 9–19.

Gunnarsson, B. S., Thorsdottir, I., & Palsson, G. (2005). Iron status in 6-y-old children: associations with growth and earlier iron status. *European journal of clinical nutrition*, 59(6), 761–7.

Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

Halsted J. A., Smith, J.C., Irwin, M. I. (1974). A conspectus of research on zinc requirements of man. *Journal nutrition*.104:347.

Hambidge, K. M., Huffer, J. W., Raboy, V., Grunwald, G. K., Westcott, J. L., Sian, L., Krebs, N. F. (2004). Zinc absorption from low-phytate hybrids of maize and their. *The American journal of clinical nutrition*, 79, 1053–9.

Hambidge, K. M., Krebs, N. F., & Miller, L. (1998). Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. *The American journal of clinical nutrition*, 68(2 Suppl), 410S–413S.

Hambidge, K. M., Krebs, N. F., Westcott, J. E., & Miller, L. V. (2006). Changes in zinc absorption during development. *The Journal of pediatrics*, 149(5 Suppl), S64–8.

Hambidge, K. M., Miller, L. V., Westcott, J. E., & Krebs, N. F. (2008). Dietary Reference Intakes for Zinc May Require Adjustment for Phytate Intake Based upon Model Predictions 1, 2. *The Journal of Nutrition*, 138(September), 2363–2366.

Hambidge, K. M., Miller, L. V., Westcott, J. E., Sheng, X., & Krebs, N. F. (2010). Zinc bioavailability and homeostasis 1 – 4. *The American journal of clinical nutrition*, 91, 1478–1483.

Hess, S. Y., Peerson, J. M., King, J. C., & Brown, K. H. (2007). Use of serum zinc concentration as an indicator of population zinc status. *Food and nutrition bulletin*, 28(3 Suppl), S403–29.

Hotz, C. (2007). Dietary indicators for assessing the adequacy of population zinc intakes. *Food and nutrition bulletin*, 28(3 Suppl), S430–53.

Hotz, C., & Brown, K. H. (2004). Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in Populations and Options for Its Control. *Contents International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG)*, 25, 91–204.

Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American journal of clinical nutrition*, 91, 1461–1467.

Imdad, A., & Bhutta, Z. a. (2011). Effect of preventive zinc supplementation on linear growth in children under 5 years of age in developing countries: a meta-analysis of studies for input to the lives saved tool. *BMC public health*, 11 Suppl 3(Suppl 3), S22.

Islam, M. M., Woodhouse, L. R., Hossain, M. B., Ahmed, T., Huda, M. N., Ahmed, T., Brown, K. H. (2013). Total Zinc Absorption from a Diet Containing either Conventional Rice or Higher-Zinc Rice Does Not Differ among Bangladeshi Preschool. *The Journal of Nutrition*, 143(October), 519–525.

Jasso, I. M., & Becerra, P. A. V. (2003). La alimentación en México : un estudio a partir de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares. *Revista de información y análisis*, 01(81), 26–37.

Jones, G., Steketee, R. W., Black, R. E., Bhutta, Z. A., & Morris, S. S. (2003). Bellagio child survival study group. How many child deaths can we prevent this year?, 362(9377), 65–71.

Kazal, L. a. (2002). Prevention of iron deficiency in infants and toddlers. *American family physician*, 66(7), 1217–24.

Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K., & Lönnerdal, B. (2003). Glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation of infant formula

affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American journal of clinical nutrition*, 77(5), 1261–8.

Kibangou, I. B., Bouhallab, D., Henry, G., Bureau, F., Allouche, S., Blais, A., Bouglé, D. (2005). Milk proteins and iron absorption: contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatric research*, 58(4), 731–4.

King, J., & Keen, C. (2002). Zinc. In M. Shils, J. Olson, M. Shike, & C. Ross (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* (Williams a., pp. 257–276). Pennsylvania.

Kordas, K., Stoltzfus, R., Lopez, P., Alatorre, J., & Rosado, J. L. (2005). IRON AND ZINC SUPPLEMENTATION DOES NOT IMPROVE PARENT OR TEACHER RATINGS OF BEHAVIOR IN FIRST GRADE MEXICAN. *journal Pedatric*, 147, 632–639.

Krebs N, Miller LV, Naake VL, Lei S, Westcott JE, Fennessey PV. (1995) The use of stable isotope techniques to assess zinc metabolism. *Journal Nutrition Biochem*. 6:292-307.

Krebs, N. F., Hambidge, K. M., Westcott, J. E., Miller, L. V, Sian, L., Bell, M., & Grunwald, G. K. (2003). Trace Elements , Growth and Development Exchangeable Zinc Pool Size in Infants Is Related to Key Variables. *The Journal of nutrition*, 133(4), 1498–1501.

Lo, B. (2000). Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *The Journal of Nutrition*, 130, 1378–1383.

Lo, B., Ph, D., & Lien, E. L. (2003). Nutritional and Physiologic Significance of Infants -Lactalbumin in. *Nutrition reviews*, 61(9), 295–305.

Long, K., Montoya, Y., Hertzmark, E., Santos, J. I., & Rosado, J. L. (2006). A double-blind, randomized, clinical trial of the effect of vitamin A and zinc supplementation on diarrheal disease and respiratory tract infections in children in Mexico City, Mexico. *American Journal Clinical Nutrition*, 83, 693–700.

López, D., Salazar, M., Hambidge, K. M., Penny, M. E., Peerson, J. M., & Krebs, N. F. (2005). Longitudinal measurements of zinc absorption in Peruvian children consuming wheat products fortified with iron only or iron and 1 of 2 amounts of zinc 1 – 3. *The Journal of Clinical Nutrition*, 81(7), 637–647.

Lozoff, B., Brittenham, G., Viteri, F., Wolf, A., & Urrutia, J. (1982). The effects of short-term oral iron therapy on developmental deficits in iron-deficient anemic infants. *journal Pedatric*, 100(3), 351–357.

Lukaski, H. C. (2005). Low dietary zinc decrease erythrocyte carbonic anhydrase activities and impairs cardiorespiratory function in men during exercise. *American Journal Clinical Nutrition*. 81: 1045-51

Madhav, S. (1982). Inhibition of Trypsin Activity in Vitro by Phytate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 30, 799–800.

Manary, M. J., Hotz, C., Krebs, N. F., Gibson, R. S., Westcott, J. E., & Broadhead, R. L. (2002). Zinc homeostasis in Malawian children consuming a high-phytate,. *The American journal of clinical nutrition*, 75, 1057–61.

Mataix, J. Llopis, J. 2005. Minerales. En: *Nutrición y Alimentación Humana*. Mataix J. ed Vol 1 p 211-46. Barcelona, España: Oceano

Maywald M., Rink L. (2014) Zinc homeostasis and immunosenescence. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. DOI: 10.1016/j.jtemb.2014.06.003

McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, Benoist B, 2008, Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral. Nutrition Information System.

Miller, L V, Hambidge, K. M., Naake, V. L., Hong, Z., Westcott, J. L., & Fennessey, P. V. (1994). Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake. *The Journal of nutrition*, 124(2), 268–76.

Miller, Leland V, Krebs, N. F., & Hambidge, K. M. (2007). A mathematical model of zinc absorption in humans as a function of dietary zinc and phytate. *The Journal of nutrition*, 137(1), 135–41.

Muñoz Gomez, M., Molero Leon, S., & Garcia-Erce, J. A. (2008). Fisiopatología del metabolismo del hierro y sus implicaciones en la anemia perioperatoria. *Anemia Revista*, 1(2), 47–60.

Olivares G, M., & Walter, T. (2003). Consecuencia de la deficiencia de hierro. *Revista chilena de nutrición*, 30(Diciembre), 0717 – 7518.

Olivares, M., Pizarro, F., Ruz, M., & de Romaña, D. L. (2012). Acute inhibition of iron bioavailability by zinc: studies in humans. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 25(4), 657–64.

Oliveira, M. A. A., & Osório, M. M. (2005). Cow's milk consumption and iron deficiency anemia in children. *Jornal de Pediatria*, 81(5), 361–367.

Olney, D. K., Pollitt, E., Kariger, P. K., Khalfan, S. S., Ali, N. S., Tielsch, J. M., Black, R. E. (2006). Combined iron and folic acid supplementation with or without zinc reduces time to walking unassisted among Zanzibari infants 5 to 11-mo old. *Journal of nutrition*, 136, 2427–2434.

Overbeck, S., Rink, L., & Haase, H. (2008). Modulating the immune response by oral zinc supplementation: a single approach for multiple diseases. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 56(1), 15–30.

P., T., A., Y., S., S., & M., P. (2001). Dietary Reference Intakes: Vitamina A, Vitamina K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. *The American Dietetic Association*, 101(3), 294–301.

Pachón, H., Ortiz, D. a, Araujo, C., Blair, M. W., & Restrepo, J. (2009). Iron, zinc, and protein bioavailability proxy measures of meals prepared with nutritionally enhanced beans and maize. *Journal of food science*, 74(5), H147–54.

Parsonnet, J. (1998). *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut*, 43, S6–9.

Pechin, G. H. (2012). Absorción, metabolismo y homeostasis del zinc en los animales y el hombre Absorption, metabolism and homeostasis of zinc in animals and human beings. *Cienciasveterinaria*, 14(1), 1515–1883.

Pita Rodriguez, G. (2010). ¿cuál es la asociación entre la inflamación y la anemia? *Revista Cubana Alimentos y Nutricion.*, 20(1), 129–134.

Powell, C. A., Walker, S. P., Himes, J. H., Fletcher, P. D., & Grantham-McGregor, S. M. (1995). Relationships between physical growth, mental development and nutritional supplementation in stunted children: the Jamaica study. *Acta Pediatric*, 84, 22– 29.

Prasad, A. S. (n.d.). Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *Journal Infection*, 182, S62– 68.

Prasad, Ananda S, & Boa, B. (2013). Zinc: papel en la inmunidad, el estrés oxidativo y la inflamación crónica. *Nutrilearning*, 5, 115–119.

Prasad, Ananda S. (2008). Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental gerontology*, 43(5), 370–7.

Prasad, Ananda S. (2009). Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 12(6), 646–52.

R. Redondo Ortega. (2005). Fundamentos teóricos y técnicos de los isótopos estables. In *Fundamentos teóricos y técnicos* (pp. 1–16). Madrid.

Rahman, M. M., Wahed, M. a, Fuchs, G. J., Baqui, A. H., & Alvarez, J. O. (2002). Synergistic effect of zinc and vitamin A on the biochemical indexes of vitamin A nutrition in children. *The American journal of clinical nutrition*, 75(1), 92–8.

Raikos, V., & Dassios, T. (2014). Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy science & technology*, 94, 91–101.

Ramiel, N. (2010). Preparing Grains, Nuts, Seeds and Beans for Maximum Nutrition. *Living With Phytic Acid*, 11(09).

Rivera, J. A., Shamah, T., Villalpando, S., & Monterrubio, E. (2010). Effectiveness of a large-scale iron-fortified milk distribution program on anemia and iron deficiency in low-income young children in Mexico 1 – 3. *The Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 431–439.

Rivera-Domarco J, Shama-Levy T, Villalpando-Hernandez S, González-de Cossío T, Hernández-Prado B, Sepúlveda J, (2001). Encuesta Nacional de Nutrición 1999. (National Nutrition Survey 1999.). Cuernavaca, Mexico: Instituto Nacional de Salud Publica.

Rosado JL. (2005) Zinc. En Bourges, Casanueva y Rosado, Recomendaciones de Ingestión de Nutrientes para la población mexicana, editorial Panamericana

Rosado, J. L. (1998). Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública Méx*, 40(2), 181–188.

Rosado, J. L., Arellano, M. de R., Montemayor, K., Garcia, O. P., & Caamaño, M. D. C. (2008). An increase of cereal intake as an approach to weight reduction in children is effective only when accompanied by nutrition education: a randomized controlled trial. *Nutrition journal*, 7, 28. doi:10.1186/1475-2891-7-28

Rosado, J. L., Camacho, R., & Rh, B. (1999). Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Salud Pública Méx*, 41(2), 130–137.

Rosado, J. L., Camacho, R., & Rh, B. (1999). Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Salud Pública Méx*, 41(2), 130–137.

Rosado, J. L., Diaz, M., Gonzalez, K., Griffin, I., Abrams, S. A., & Preciado, R. (2005). Community and International Nutrition The Addition of Milk or Yogurt to a Plant-Based Diet Increases Zinc Bioavailability but Does Not Affect Iron Bioavailability in Women 1. *The Journal of Nutrition*, 135(December 2004), 465–468.

Rosado, J. L., Hambidge, K. M., Miller, L. V, Garcia, O. P., Westcott, J., Gonzalez, K., Krebs, N. F. (2009). The Quantity of Zinc Absorbed from Wheat in Adult Women Is Enhanced. *The Journal of Nutrition*, 139, 1920–1925.

Rosado, J. L., López, P., Morales, M., Munoz, E., & Allen, L. H. (1992). Bioavailability of energy, nitrogen, fat, zinc, iron and calcium from rural and urban Mexican diets. *The British journal of nutrition*, 68(1), 45–58.

Rosado, J. L., López, P., Muñoz, E., Martínez, H., & Allen, L. H. (1997). Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers. *American Journal Clinical Nutrition*, 65, 160– 161.

Rosado, J.L., (2005). definiciones y conceptos básicos. valores nutrimentales de referencia. en: recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. bases fisiológicas. ed. p. 245-272. México: medica panamericana

Ruiz-álvarez, V., & Hernández-triana, J. R. M. (2005). Asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y anemia en niños de edad escolar. *Revista Cubana Investigacion Biomedica*, 24(2).

Salgueiro, J., Weill, R., & Zubillaga, M. (2004). Deficiencia de zinc en relación con el desarrollo intelectual y sexual. *Revista Cubana Salud Pública*, 30(2).

Sandstead, H. H., Penland, J. G., Alcock, N. W., Dayal, H. H., Chen, X. C., Li, J. S., Yang, J. J. (1998). Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. *The American journal of clinical nutrition* (Vol. 68, p. 470S–475S).

Scott, K. G., Avchen, R. N., & Hollomon, H. A. (1999). Special Issue on Early Childhood Development. *Food and Nutrition Bulletin*, 20(1).

Shamah-levy, T., & Villalpando, S. (2012). Overview of the nutritional status of selected micronutrients in Mexican children in 2006. *Salud Pública Méx*, 54(2), 146–151.

Shils, M. 2002. Cinc. En: *Nutricion Salud y Enfermedad*. King J. C. y Keen, C. L. ed. vol 1. p 257-276. McGraw Hill, Interamericana

Smith, K. T., R. J. Cousins, B. L. Silbon, and M. L. Failla. (1978). Zinc absorption and metabolism by isolated, vascularly perfused rat intestine. *J. Nutr.* 108:1849–1857.

Solomons, N. W., & Cousins, R. J. (1984). Absorption and Malabsorption of mineral nutrients. In N. W. Solomons & I. H. Rosenberg (Eds.), (Liss, A. R., pp. 125 – 197). New York.

Sotelo, A., Gonzalez-Osnaya, L., Sanchez-Chinchillas, A., & Trejo, A. (2010). Role of oxate, phytate, tannins and cooking on iron bioavailability from foods commonly consumed in Mexico. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 29–39.

Szymlek-gay, E. A., Lo, B., Abrams, S. A., & Kvistgaard, A. S. (2012). a - Lactalbumin and Casein-Glycomacropeptide Do Not Affect Iron Absorption from Formula in Healthy Term Infants 1 – 3. *The Journal of Nutrition*, 142, 2–7. doi:10.3945/jn.111.153890.constituents

The Mendeley Support Team. (2011). Getting Started with Mendeley. Mendeley Desktop, 1–16. Retrieved from <http://www.mendeley.com>

The World Bank., 2006. *Repositioning Nutrition as Central to Development: A Strategy for Large Scale Action*. Washington DC: The World Bank.

Trabulsi, J., Capeding, R., Lebumfacil, J., Ramanujam, K., Feng, P., McSweeney, S., DeRusso, P. (2011). Effect of an α -lactalbumin-enriched infant formula with lower protein on growth. *European journal of clinical nutrition*, 65(2), 167–74.

Uauy, R. (2007). Definición y estudio de las necesidades nutrimentales en poblaciones 2da parte. *Cuadernos de Nutrición*, 30(1), 17– 24.

UNICEF (2010). <http://www.zincsavekids.org/>, última consulta 22/11/12

Veillon C, Patterson KY, Moser-Veillon PB. (1996) Digestion and extraction of biological materials for zinc stable isotope determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal Anal Atomic Spectrom.*11:727-30.

Walter, T., Andraca, I. De, Chadud, P., & Perales, C. G. (1989). Iron Deficiency Anemia : Adverse Effects on Infant Psychomotor Development The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at: Iron Deficiency Anemia: Adverse Infant Psychomotor Develop. *Official Journal of the american academy of pediatrics*, 84(1), 7–18.

West, A. R. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World Journal of Gastroenterology*, 14(26), 4101.

World Health Organization (2009), *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, ISBN 978 92 4 156387 1

Yu, Y., Lu, L., Luo, X. G., & Liu, B. (2008). Kinetics of zinc absorption by in situ ligated intestinal loops of broilers involved in zinc transporters. *Poultry science*, 87(6), 1146–55. doi:10.3382/ps.2007-00430