



UNIVERSIDAD DE CHILE



Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

**DURACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LA
ADMINISTRACIÓN DE CINCO SOBRE LA ABSORCIÓN DE
HIERRO**

Diego Alejandro Gaitán Charry

Tesista

Manuel Olivares Grohnert

Director de Tesis

**Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias de la Nutrición,
Mención Nutrición Humana**

Santiago, octubre de 2006

Comisión de Tesis

Dr. Manuel Olivares – Tutor

Dra. Eva Herptrampf – Profesora INTA

Dr. Daniel López De Romaña – Profesor INTA

Dr. Iván Palomo – Profesor Universidad de Talca

Fecha de Examen de Grado: 24 de octubre de 2006

Calificación Final: _____

Agradecimientos

A los profesores Manuel Olivares, Fernando Pizarro, Eva Herptrampf y Miguel Arredondo por sus enseñanzas y apoyo durante la realización del programa de Magister.

A la profesora Mireya Fernández y la señora Rosemarie Valenzuela por la colaboración que desde la parte administrativa me brindaron durante este tiempo.

A Angélica Letelier, Paula Quezada, Liliana Lazo, Joel Maldonado y los demás miembros del Grupo de Micronutrientes del INTA por su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio.

Al Conicyt y al Nestlé Research Center por el apoyo financiero.

Desde lo personal, doy las gracias a todas las personas que conocí en esta etapa y se convirtieron en el complemento emocional que permitió llevar a feliz término esta meta: Yare, Celes, Cecy, Anita, Vicky, Mario, Pilar, Stefa, Hugo y muy especialmente a Feli.

Financiamiento

Este trabajo es parte del proyecto titulado “Efectos del cinc sobre la biodisponibilidad y nutrición de hierro”, cuyo objetivo general es: determinar el efecto del cinc sobre el metabolismo del hierro en humanos. El proyecto se encuentra financiado por un período de 3 años por Fondecyt (1040879), investigador responsable: Manuel Alonso Olivares Grohnert.

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	3
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	6
Resumen	7
Summary	8
Introducción	9
Efectos del Cinc (Zn) sobre la Biodisponibilidad del Fe-No Hem	12
Estudios <i>in vitro</i>	12
Estudios en Animales	13
Estudios en Humanos	14
Problema: ¿Cuál es la duración del efecto inhibitorio del Zn sobre la Bio Fe?	19
Objetivos	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Hipótesis	20
Materiales y Métodos	20
Muestra	20
Protocolo Experimental	21
Estudios de Biodisponibilidad	23
Valoración del Estado Nutricional del Fe y el Zn	25
Variables	26
Protocolo experimental	26
Resultados	27
Discusión	31
Bibliografía	34

Índice de Figuras

Figura 1: protocolo experimental realizado a cada una de las participantes en el estudio.	22
Figura 2: diagrama de dispersión de la correlación de Pearson entre el Ln de la Fn sérica y el Ln de la Bio Fe del tratamiento sin Zn (día 1)	29
Figura 3: promedio y desviaciones estándar del Ln de la Bio Fe en cada uno de los tratamientos.	31

Índice de tablas

Tabla 1: fórmulas utilizadas para el cálculo de la Bio Fe mediante la utilización de los isótopos ^{55}Fe y ^{59}Fe .	24
Tabla 2: clasificación de las variables de interés para el estudio.	27
Tabla 3: parámetros hematológicos de las participantes en el estudio.	28
Tabla 4: correlación de Pearson entre el Ln de la Bio Fe del tratamiento sin Zn (día 1) y las variables del estado nutricional del Fe.	30
Tabla 5: efecto del Zn sobre la Bio Fe al administrar el Zn simultáneamente con el Fe o 30 y 60 minutos antes.	30

Resumen

La administración conjunta de Fe y Zn produce una inhibición de la biodisponibilidad del Fe (Bio Fe), sin embargo, no se conoce el tiempo que dura este efecto. Objetivo: determinar el tiempo que dura el efecto inhibitorio de la administración de una dosis de Zn sobre la Bio Fe. Métodos: se estudiaron 15 mujeres quienes ingirieron una solución de 0,5 mg de Fe sin administración de Zn, con administración simultánea de 11,71 mg Zn y luego de 30 y 60 minutos de la administración de 11,71 mg Zn. Se determinó el estado nutricional de Fe y Zn y la Bio Fe. Resultados: los promedios geométricos y los rangos de ± 1 DS de la Bio Fe, durante la administración de Fe solo, conjunta con Zn o luego de 30 y 60 minutos de la administración de Zn, fueron: 41,9 (42,4–41,5), 25 (25,6–24,4), 35 (35,4–34,6) y 40 (40,5–39,4), respectivamente; las pruebas estadísticas mostraron diferencia entre la Bio Fe cuando se ingirió solo y la administración conjunta de Fe y Zn ($F=5,68$, $p<0,001$). Conclusión: la administración conjunta de Fe y Zn disminuye la Bio Fe, este efecto dura menos de 30 minutos.

Palabras claves:

Biodisponibilidad, hierro, cinc, micronutrientes, interacción.

Abreviaturas usadas:

Hierro (Fe), cinc (Zn), biodisponibilidad de hierro (Bio Fe), transportador de metales divalentes (DMT1), hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM), ferritina (Fn), transferrina (Tf), porcentaje de saturación de transferrina (% Sat), cinc protoporfirina (ZPP), capacidad total de unión de hierro (TIBC).

Summary

Fe and Zn combine administration produces inhibition of Fe bioavailability (Bio Fe), however, the time that this effect persists is not known. Objective: to determine the time of inhibitory effect of a single dose of Zn on Bio Fe. Methods: 15 women ingested a solution of 0.5 mg of Fe without Zn administration and, with combined administration of 11.71 mg Zn. We determined Fe and Zn status and the Bio Fe. Results: Bio Fe geometric means and \pm 1SD range during administration of Fe alone or combined with Zn or after 30 and 60 minutes of Zn administration were: 41.9 (42.4-41.5), 25 (25.6-24.4), 35 (35.4-34.6) and 40 (40.5-39.4), respectively. A statistically significant difference was observed between Bio Fe of Fe given simultaneously with Zn and Fe ingested without Zn ($F=5.68$, $p<0.001$). Conclusion: Fe and Zn combine administration decreased Bio Fe, this effect lasted less than 30 minutes.

Key words:

Bioavailability, iron, zinc, micronutrients, interaction.

Introducción

La deficiencia de hierro (Fe) continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública, aún en los países desarrollados. Durante los primeros años de vida, esta deficiencia nutricional afecta el desarrollo cognitivo de los individuos y, en la edad adulta, disminuye la capacidad productiva (1), en las mujeres embarazadas se ha asociado la deficiencia de este mineral con el aumento en los riesgos de muerte materna durante el parto y el puerperio, además, los hijos de madres deficientes en Fe tienen mayor riesgo de bajo peso al nacer, lo cual condiciona el desarrollo de enfermedades crónicas asociadas a la nutrición (2). Estos datos son relevantes, si se tiene en cuenta que 1 billón de personas y el 40% de las mujeres en los países en vías de desarrollo sufren de anemia ferropénica (3, 4); el déficit de Fe afecta directamente las condiciones socioeconómicas de un país, por estos motivos, los esfuerzos destinados a mejorar la nutrición de este micronutriente en Latinoamérica son una de las prioridades de trabajo en materia de salud pública.

En un hombre adulto la cantidad aproximada de Fe es de 4 g, distribuidos en: la hemoglobina (Hb) (~2,5 g), las reservas, principalmente hepáticas (~1 g) y en la mioglobina y otras enzimas que son dependientes del metal (~0,3 g). Diariamente, un adulto sano pierde ~0,025% de su Fe total (equivalente a 1 mg), el cual debe ser reemplazado por la dieta (5); estas pérdidas son producidas por la descamación de las células epidérmicas y las epiteliales del tracto gastrointestinal y por el micro sangrado fisiológico intestinal, para el caso de las mujeres, los niños

y los adolescentes en crecimiento esta cifra aumenta debido al sangrado menstrual y las necesidades del crecimiento, respectivamente (6).

En la dieta humana el Fe se encuentra, principalmente, asociado a moléculas de Hb (Fe-Hem) o en solución (Fe-No Hem). El Fe-Hem se halla en las carnes y la sangre, también existe un contenido muy bajo de Fe-Hem en las semillas de las plantas, asociado a los anillos tetrapirrólicos de la clorofila, el sirohemo, la fitocromobilina e incluso al grupo Hem (7). Por otro lado, el Fe-No Hem son las sales de Fe^{+2} o Fe^{+3} y otro compuesto químico (por ejemplo: con el azufre se forma la sal sulfato ferroso), este se encuentra en cantidades apreciables en los alimentos de origen vegetal y en los derivados lácteos (8).

El Fe-No Hem es la mayor fuente del mineral en la dieta de las poblaciones de los países en vías de desarrollo. Los mecanismos mediante los cuales el tracto gastrointestinal lo capta consisten en: 1) solubilización y reducción en el medio ácido gástrico (8); 2) absorción en el duodeno proximal (en el pH básico el Fe tiende a formar precipitados con otros componentes de la dieta, disminuyendo su solubilidad, con lo cual se hace más difícil su absorción, por este motivo, el Fe-No Hem se absorbe en su mayoría en el duodeno proximal); 3) reducción en el borde en cepillo, la cual se realiza por una oxidoreductasa: la citocromo b reductasa duodenal, conocida como Dcytb, que tiene como función cambiar el estado de oxidación del metal de Fe^{+3} a Fe^{+2} ; 4) co-transporte de Fe^{+2} y H^+ a través del transportador de metales divalentes (DMT1), ubicado en la membrana apical del

enterocito, el Fe^{+3} no pasa a través del DMT1; 5) según las necesidades corporales del nutriente, se almacena, unido a la proteína citoplasmática ferritina (Fn), se utiliza en los procesos metabólicos celulares o se transporta hacia la sangre; 6) el eflujo del Fe desde el enterocito hacia la sangre se realiza a través de la membrana basolateral mediante la proteína transportadora ferroportina, luego es reoxidado a Fe^{+3} por una de dos proteínas dependientes de cobre, la hefestina o la ceruloplasmina y, finalmente, es captado y transportado por la proteína plasmática transferrina (Tf) hacia los tejidos periféricos (9, 10).

Se ha postulado también una vía de absorción para el Fe^{+3} a través de la membrana apical del enterocito, la cual involucraría a dos proteínas: una de la familia de las β_3 integrinas y otra conocida como molibferrina, sin embargo, actualmente no existe consenso sobre la participación de esta vía en la homeostasis del Fe (11).

La biodisponibilidad del Fe (Bio Fe), definida como la eficiencia con la cual el metal obtenido de la dieta es utilizado biológicamente (12), depende del tipo de Fe que se suministre en los alimentos, de la cantidad del mismo, de la combinación de alimentos en una comida, del estado nutricional del Fe en el individuo y de algunos eventos fisiológicos y patológicos como la eritropoyesis aumentada, la hipoxia y las infecciones (13-16). El Fe es el único micronutriente cuya biodisponibilidad puede determinarse directamente, esto se logra mediante técnicas que cuantifican la cantidad de una dosis de isótopos, radioactivos ^{55}Fe o ^{59}Fe o estables ^{57}Fe o

^{58}Fe , que se incorpora a la Hb; se asume como constante que entre el 80 y 90% del metal absorbido es usado para la síntesis de Hb (17).

A pesar del alto contenido de Fe-No Hem de los alimentos, su biodisponibilidad varía desde menos del 1% hasta el 20%, esto se debe a que otros nutrientes de la dieta pueden aumentar o disminuir la eficiencia con la cual este es solubilizado y/o reducido por el pH gástrico, competir por los mecanismos de transporte en el enterocito o afectar el metabolismo del metal; uno solo de estos efectos o la combinación de varios hace que algunos compuestos tengan importancia como inhibidores o estimuladores de la Bio Fe (10, 14, 16, 18).

Efectos del cinc (Zn) sobre la biodisponibilidad del Fe-No Hem

Se han diseñado varios modelos experimentales *in vitro* (cultivos celulares), en animales y en humanos, con el fin de esclarecer el efecto y los mecanismos mediante los cuales el Zn puede afectar la biodisponibilidad del Fe-No Hem, la suma de las evidencias de estos tres tipos de estudios genera el conocimiento necesario para implementar estrategias que buscan disminuir la deficiencia del mineral.

Estudios *in vitro*: Hill y Matrone demostraron que los elementos de transición con similar configuración electrónica y coordinación, como son el Fe y el Zn, interactúan en el tracto gastrointestinal a nivel de la absorción (19); estudios realizados en células Caco-2 evidencian competencia por la captación de estos

metales (20) y se ha postulado que esta interacción se da en la membrana apical del enterocito, específicamente, en el DMT1, sin embargo, recientemente, como resultado de estudios *in vitro* se piensa en un mecanismo de competencia o de interacción distinto al DMT1 debido a que este transportador tiene afinidad baja por el Zn e incluso podría no estar implicado en su absorción en el intestino (21).

Los estudios celulares también han mostrado que el Zn^{+2} se une a los canales de entrada de Fe presentes en el oligómero de Fn, por lo tanto, podría bloquear la incorporación del Fe a esta proteína y disminuir, probablemente, el almacenamiento de Fe corporal (22, 23).

Por otro lado, hay evidencia de un efecto estimulador del Zn sobre la Bio Fe que puede ser explicado porque el Zn es un reconocido modulador de la expresión génica de proteínas implicadas con la absorción del Fe; Yamaji y col encontraron en células Caco-2 que la sobrecarga de Zn aumentaba la captación del Fe desde el borde apical y su posterior salida desde el borde basolateral, asociado a un aumento en la expresión del DMT1 y la ferroportina, respectivamente (24). Los mecanismos mediante los cuales el Zn ejerce su efecto sobre la expresión de las proteínas involucradas en la absorción del Fe aún se encuentran en controversia y estudio.

Estudios en animales: trabajos en animales deficientes en Zn muestran un marcado aumento del contenido de Fe y una disminución en la concentración de

Zn en el hígado, hueso, páncreas y testículo (25-28), estos cambios se revierten con la suplementación con Zn. La absorción de Fe está aumentada en animales alimentados con dietas deficientes en Zn (29), lo que puede explicar, en parte, el aumento de la concentración de Fe en los órganos.

Una suplementación con altas dosis de Zn afecta el almacenamiento de Fe en roedores, codornices y primates no humanos (30-39), lo cual se puede deber a una inhibición de la absorción de Fe o a una competencia en el transporte del mismo entre los tejidos, dado que la Tf puede transportar también Zn (40).

El modelo animal también sugiere que el efecto del Zn sobre la Bio Fe es dependiente de la edad; en un estudio realizado en crías de ratas, durante el período de amamantamiento, se encontraron diferencias en la distribución y expresión del DMT1 y la ferroportina entre ratas de infancia temprana y tardía, estos cambios produjeron, solo en las ratas más jóvenes, un efecto inhibitorio del Zn sobre la retención de ⁵⁹Fe (41).

Estudios en humanos

Efectos agudos: en adultos, la administración simultánea de 3 mg de Zn y 0,01 de Fe (relación molar Zn:Fe = 300:1) no disminuyó la Bio Fe, pero, si se observó un efecto inhibitorio cuando se administró el Fe a una dosis de 3 mg con una proporción de Zn:Fe mayor de 5:1, este efecto no se observó cuando se administraron ambos minerales en un alimento completo; la explicación dada por

los investigadores fue que el Fe y el Zn no comparten el mecanismo de paso a través de la mucosa, sin embargo, el efecto inhibitorio de la absorción cuando se administraron los 3 mg de Fe sugiere una interacción en el lumen intestinal con ligandos que normalmente favorecen la absorción de Fe, esta interpretación es compatible con la pérdida del efecto inhibitorio que se logró en presencia de un alimento (42). Crofton y col, utilizando la curva de aparición plasmática de Fe como medida de su absorción, demostraron una reducción de la absorción cuando se administró simultáneamente una solución de Zn y Fe en una proporción molar 1:1 y 2,5:1 (43). Al agregar Zn a una solución salina en una proporción 4:1 (Zn:Fe) se redujo la absorción de Fe en prematuros, sin embargo, esto no se observó cuando los minerales se administraron en fórmulas infantiles o en leche humana (44). En un estudio realizado en niños, la absorción de 60 mg/kg de Fe, en una harina fortificada, se redujo cuando se agregaron 60 mg de sulfato de Zn (45). En un estudio de biodisponibilidad, realizado en humanos por el grupo de micronutrientes del INTA, se estableció que el Zn inhibe la biodisponibilidad de 0,5 mg de Fe, solo a relaciones Zn:Fe mayores a 20:1, además, la curva de dosis respuesta evidenció un plateau, lo cual está en acuerdo con la hipótesis de que la inhibición se da a nivel de un mecanismo saturable, de otro lado, cuando se administraron ambos minerales, en relación molar 1:1, la Bio Fe no se disminuyó a dosis bajas (Zn 0,59 mg y Fe 0,50 mg), pero si a dosis altas (Zn 11,71 mg y Fe 10 mg).

En contraposición a los estudios anteriores, López De Romaña y col no encontraron disminución de la Bio Fe en niños peruanos, luego de la administración conjunta de Fe y Zn en un alimento de trigo fortificado (datos suministrados por el autor, aún no publicados).

Efectos de la suplementación o fortificación con Zn: Yardick y col demostraron, en mujeres adultas, que la suplementación diaria con 50 mg de Zn durante 10 semanas reduce significativamente el hematocrito y la Fn sérica (46). En dos estudios, realizados en lactantes indonesios, la reducción de la prevalencia de anemia fue mayor en los lactantes suplementados diariamente, durante 6 meses, con 10 mg de Fe comparada con la administración conjunta de 10 mg de Fe y 10 mg de Zn (47-49). La recuperación de lactantes y preescolares anémicos fue menor cuando recibieron durante 2 meses una fortificación en forma de “sprinkle” simultánea con Fe y Zn (80 y 10 mg) que cuando recibieron sólo Fe (50). La suplementación con 22 mg de Zn diarios, por 6 semanas, a mujeres con bajas reservas de Fe, produjo un deterioro de la nutrición del Fe caracterizado por disminución de la Fn y del porcentaje de saturación de la Tf (% Sat) y un aumento de la protoporfirina libre eritrocitaria y de la concentración sérica del receptor de Tf (51); llamativamente, se observó un aumento de la absorción de Fe, debido a que probablemente primó el efecto del deterioro de los depósitos de este metal (a menores depósitos de Fe la absorción de este mineral es más alta), por otra parte, el suplemento se administró con el estómago vacío, luego de un ayuno nocturno, y por ello no hubo interacción con el Fe dietario. Los niveles de Fe sérico fueron

menores en embarazadas suplementadas con 60 mg de Fe y 15 mg de Zn comparado con las que recibieron sólo Fe, no se observaron diferencias entre los grupos en los valores de Hb, receptor de Tf sérica o Fn ni en la absorción de Fe (52).

Recientemente, se publicó un estudio que involucró a 26250 niños de 1 a 36 meses de edad de Nepal, quienes fueron asignados aleatoriamente a uno de 3 grupos con el fin de administrar diariamente un suplemento así: un grupo placebo y dos grupos de estudio con 12,5 mg de Fe, uno de ellos con Zn, todos los grupos recibieron además ácido fólico y vitamina A, se administró la mitad de la dosis de minerales a los niños menores de 12 meses. Los resultados de este estudio evidenciaron que el grupo que recibió el placebo y el suplementado con Zn tuvieron mayor incidencia de anemia por deficiencia de Fe que el grupo que recibió sólo Fe (placebo=26%, Fe+Zn=12% y Fe=4%), sin embargo, los grupos no se diferenciaron en la mortalidad global, pero el grupo que recibió Zn tuvo una menor morbilidad debida a enfermedades infecciosas (53).

En contraste con los datos anteriores, en un estudio de suplementación con ambos minerales, en niños vietnamitas menores de un año, no se encontró disminución del impacto de la suplementación de Fe cuando se administró conjuntamente con Zn (54). Fischer y col, realizando una revisión de 9 estudios de suplementación conjunta de Fe y Zn, concluyeron que aún en presencia de Zn existe un beneficio de la suplementación de Fe sobre los parámetros

hematológicos y, por lo tanto, no atribuye un efecto negativo a la suplementación conjunta de estos micronutrientes (55).

La suma de los hallazgos de los estudios en humanos sugiere que aún no existe un consenso claro sobre el efecto de la administración conjunta de Zn y Fe sobre la Bio Fe (56), pero el estudio reciente realizado en los niños de Nepal vuelve a abrir la controversia de si es adecuado administrar ambos minerales en un mismo suplemento o alimento fortificado.

Los estudio *in vitro*, en animales y humanos, hacen pensar que existe interacción entre el Fe y el Zn en el enterocito, cuyo mecanismo no está claramente establecido, pero puede ser debido a: 1) competencia por el DMT1 u otro mecanismo de absorción en el epitelio intestinal; 2) competencia por la Tf, la cual también transporta Zn; 3) bloqueo de la incorporación del Fe a la Fn y; 4) en menor medida, a la disminución de la vida media de los eritrocitos, que actúa como otro posible factor, debido a que se presenta a niveles muy altos de Zn en la dieta (57). La hipótesis más estudiada es la primera y la mayoría de los autores piensa que la suplementación con Zn puede saturar un número limitado de sitios de transporte intestinal; a dosis altas de Zn la competencia con el Fe podría darse al nivel de mecanismos de baja afinidad.

Actualmente, los programas de suplementación y fortificación implican el uso combinado de Fe y Zn, debido a que las poblaciones presentan riesgos de

deficiencia de ambos micronutrientes (58, 59); por esto, es necesario conocer las potenciales interacciones entre ambos minerales tanto en sus aspectos cualitativos como cuantitativos. Una de las preguntas que es necesario esclarecer, con el fin de dar pautas adecuadas para la formulación de programas de suplementación y fortificación es: ¿cuál es la duración del efecto inhibitorio del Zn sobre la Bio Fe? Resolver esta pregunta, será un aporte al conocimiento de las interacciones entre los dos metales, lo cual tendrá implicaciones prácticas a la hora de establecer el tiempo mínimo que debe existir entre la administración de Zn y la ingesta de productos o suplementos que contengan Fe.

Problema de investigación: ¿Cuál es la duración del efecto inhibitorio del Zn sobre la Bio Fe?

Objetivos

Objetivo general

- Determinar el tiempo que dura el efecto inhibitorio de la administración de una dosis constante de Zn sobre la Bio Fe (relación Molar Zn:Fe = 20:1).

Objetivos específicos

- Determinar el estado nutricional del Zn y el Fe en los individuos que participan en el estudio.
- Determinar la Bio Fe, en los individuos que participan en el estudio, bajo condiciones basales (sin administración conjunta de Fe y Zn).

- Determinar la Bio Fe, en los individuos que participan en el estudio, cuando se administra conjuntamente con Zn y luego de 30 y 60 minutos de la administración de Zn.

Hipótesis

El efecto inhibitorio del Zn sobre la absorción de Fe es de corta duración, menor a 30 minutos.

Materiales y métodos

Muestra: las causas de las variabilidades fisiológicas y día a día que presenta la absorción de Fe, en un mismo individuo (intra-sujeto), no han sido plenamente identificadas, pero presumiblemente se asocian con cambios en la motilidad gastrointestinal y las secreciones gástrica, pancreática o biliar (60); sin embargo, es adecuado realizar estudios de absorción de Fe, incluyendo grupos de entre 12 y 13 sujetos con un mínimo de 8 por estudio de absorción (61), de otro lado, en un modelo de mediciones repetidas 13 sujetos son suficientes para determinar diferencias de ± 1 desviación estándar (DS) de la misma variable, con un error $\alpha = 0.05$ y un poder = 90% (62). Basado en lo anterior, se decidió trabajar con 15 sujetos teniendo en cuenta las posibles pérdidas durante el protocolo experimental.

Se seleccionaron 15 mujeres en edad fértil, las cuales no presentaron patologías

del tracto gastrointestinal y no consumieron fármacos ni suplementos de minerales o multivitamínicos durante los 6 meses anteriores ni durante el estudio. Dado que se utilizaron isótopos radioactivos, sólo se permitió la participación a mujeres que usaban un método anticonceptivo (dispositivo intrauterino, anticonceptivos orales, ligadura de trompas) y previo al estudio de absorción de Fe se les realizó una prueba de embarazo. Todas las participantes conocieron los efectos adversos que se pueden ocasionar por el consumo de los isótopos estables y radioactivos y firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del INTA.

Protocolo experimental: las mujeres seleccionadas asistieron a las 8 de la mañana al Laboratorio de Micronutrientes del INTA los días 1, 2, 14, 15 y 28, luego de un ayuno de 12 horas. Durante el día 1 se obtuvieron los pesos (báscula de plataforma marca SECA con una precisión de 50 g) y las tallas (tallímetro metálico de pared con una precisión de 0,1 cm), con el fin de calcular la volemia de cada una utilizando la tabla de Tulane (63). Posteriormente, se realizaron, con los sujetos en ayunas, cuatro estudios de biodisponibilidad según el siguiente protocolo.

El día 1 cada una de las participantes ingirió 50 mL de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe marcada con 111 kBq de ^{55}Fe . El día 2 ingirió 50 mL de una solución acuosa con 11,71 mg de Zn y 0,5 mg de Fe marcada con 37 kBq de ^{59}Fe (relación molar Fe:Zn = 1:20). El día 14 ingirió 50 mL de la solución con 11,71 mg de Zn y 30 minutos después 50 mL de la solución de 0,5 mg de Fe marcada con 111 kBq

de ^{55}Fe . El día 15 ingirió 50 mL de la solución con 11,71 mg de Zn y 60 minutos después 50 mL de la solución de 0,5 mg de Fe marcada con 37 kBq de ^{59}Fe . El día 28 asistió para la extracción de una de las muestras de sangre. Las soluciones se ofrecieron en vasos desechables, los cuales fueron pesados antes y después de ofrecerlos a las participantes, con el objetivo de utilizar el volumen exacto ingerido en mL. Se instruyó a las participantes para que se abstuvieran de consumir cualquier tipo de alimento dentro de las 4 horas posteriores a la ingesta de las soluciones; la figura 1 esquematiza el protocolo experimental realizado. Las dosis de isótopos administradas fueron autorizadas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

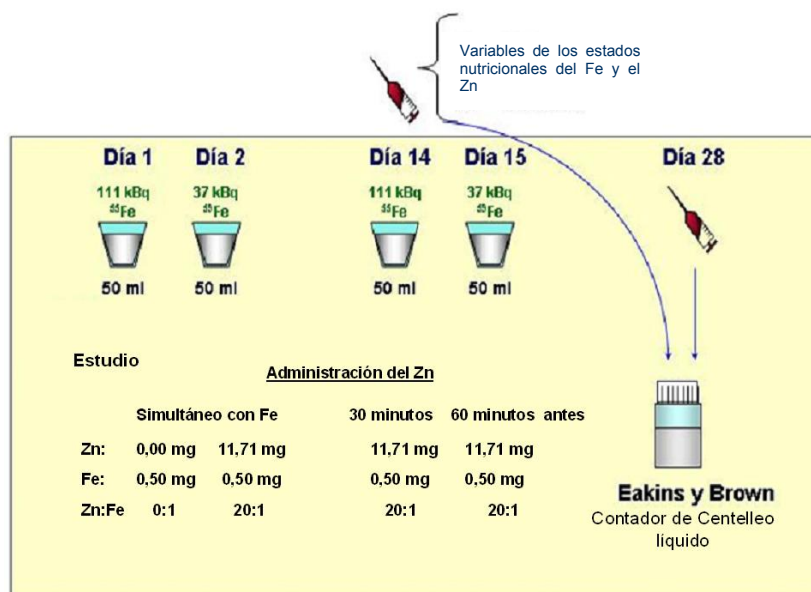


Figura 1: protocolo experimental realizado a cada una de las participantes en el estudio. Los días 1 y 14 se utilizaron soluciones marcadas con ^{55}Fe y los días 2 y 15 se utilizaron soluciones marcadas con ^{59}Fe . El día 14 se extrajeron 30 mL de sangre para los estudios de absorción y de los estados nutricionales del Fe y el Zn y el día 28 se extrajeron 20 mL para el estudio de absorción. Se muestra la composición de cada una de las soluciones administradas.

El día 14, a la llegada al laboratorio, se extrajeron 20 mL de sangre para el estudio de biodisponibilidad del día con ingesta única de Fe (día 1) y de ingesta conjunta de Fe y Zn (día 2) y 10 mL para la determinación del estado nutricional del Fe y el Zn. El día 28 se extrajeron 20 mL para el estudio de biodisponibilidad de los días 14 y 15 (ingesta de Zn y Fe a intervalos de 30 y 60 minutos, respectivamente).

Estudios de biodisponibilidad: para el cálculo de la biodisponibilidad se utilizó la técnica de doble marcaje isotópico descrita por Eakins y Brown (17), utilizando como trazadores los isótopos radioactivos ^{55}Fe y ^{59}Fe (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA). Inicialmente, cada una de las muestras se digirió en medio ácido y se precipitó el contenido total de Fe. Luego se determinó la radioactividad emitida en un contador de centelleo líquido LS 5000 TD, para lo cual se utilizaron 2 muestras blanco, cuadruplicados de un estándar y duplicados de las muestras de cada sujeto. Las muestras permanecieron en el contador el tiempo necesario para tener un error menor al 3%, el equipo reportó las cuentas por minuto (CPM) de radioactividad emitida de ^{55}Fe (carril A) y de ^{59}Fe (carril B).

Debido a que existe un traslape de las cuentas en cada uno de los carriles del contador de centelleo, se hizo necesario determinar la magnitud de este traslape y calcular a partir de esto la Bio Fe de la siguiente manera: 1) corrección de las CPM totales en cada carril por las muestras blanco; 2) corrección de las CPM para cada uno de los isótopos según el traslape; 3) cálculo de las CPM por mL de sangre para cada isótopo; 4) cálculo de las CPM totales circulantes de cada

isótopo; 5) cálculo del total de cuentas ingeridas de cada uno de los isótopos; 6) cálculo del total de cuentas absorbidas de cada isótopo; 7) cálculo del porcentaje de absorción y; 8) cálculo de la biodisponibilidad de los isótopos. La tabla 1 muestra las fórmulas utilizadas en cada uno de los pasos mencionados anteriormente.

Tabla 1: fórmulas utilizadas para el cálculo de la Bio Fe mediante la utilización de los isótopos ^{55}Fe y ^{59}Fe .

Pasos	Ecuación
1	CPM A = CPM en A – Promedio de los blancos en A CPM B = CPM en B – Promedio de los blancos en B
2	CMP ^{55}Fe = CPM en A – CPM B CMP ^{59}Fe = CPM en A – CPM B
3	CMP $^{55}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre = CMP $^{55}\text{Fe}/8$ mL sangre ^a CMP $^{59}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre = CMP $^{59}\text{Fe}/8$ mL sangre ^a
4	CMP totales ^{55}Fe = CMP ^{55}Fe * volemia ^b CMP totales ^{59}Fe = CMP ^{59}Fe * volemia ^b
5	CMP ingeridas ^{55}Fe = gr de solución ingeridos * 32385 CPM ^{55}Fe ^c / gr de solución CMP ingeridas ^{59}Fe = gr de solución ingeridos * 10931 CPM ^{59}Fe ^c / gr de solución
6	CMP absorbidas ^{55}Fe = CMP ingeridas ^{55}Fe - CMP totales ^{55}Fe CMP absorbidas ^{59}Fe = CMP ingeridas ^{59}Fe - CMP totales ^{59}Fe
7	% ^{55}Fe absorbido = CMP absorbidas ^{55}Fe * 100 / CMP ingeridas ^{55}Fe % ^{59}Fe absorbido = CMP absorbidas ^{59}Fe * 100 / CMP ingeridas ^{59}Fe
8	Bio ^{55}Fe = % ^{55}Fe absorbido * 0,8 ^d Bio ^{59}Fe = % ^{59}Fe absorbido * 0,8 ^d

^a Se procesaron 8 mL de sangre total por muestra. ^b La volémia se calculó según la tabla de Tulane. ^c CPM de ^{55}Fe y de ^{59}Fe por gramo de solución ingerida. ^d Se asume que un 80% del Fe absorbido se incorpora a la Hb y es la cantidad que se considera biodisponible (13).

El ^{55}Fe utilizado durante los días 1 y 14 provenía de un mismo vial, lo cual garantiza que el decaimiento en la radioactividad es el mismo, por lo tanto el cálculo de la biodisponibilidad del día 14 se realizó restando a las CMP de ^{55}Fe

obtenidas el valor de las CPM del día 1. De la misma manera se relacionaron las CPM del ^{59}Fe utilizado en los días 2 y 15.

Valoración del estado nutricional del Fe y el Zn: la determinación de las variables bioquímicas del estado nutricional del Fe fue realizada en el Laboratorio de Micronutrientes del INTA y las del Zn en el Laboratorio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se realizaron las siguientes pruebas:

Estado nutricional del Fe:

- Hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM): determinadas en un contador electrónico de células marca CELL-DYN 1700.
- Fn sérica: se realizó mediante una prueba de ELISA en sandwich, para lo cual, se utilizó como anticuerpo primario anti-Fn (Ref: A0362) y como secundario anti-Fn conjugado con peroxidasa (Ref: A0031), ambos de marca Dako Corporation (64).
- Fe en suero: se realizó mediante fotolorimetría, utilizando el cromógeno TPTZ.
- Capacidad total de unión a Fe (TIBC): según la metodología propuesta por Fischer (65).
- Porcentaje de saturación de la transferrina (% Sat): se calculó mediante la fórmula de Fe en suero / TIBC (65).

- Cinc protoporfirina (ZPP): determinada en un hematofluorómetro marca AVIV 206D.

Estado nutricional del Zn:

- Zn plasmático: determinado en un espectrómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer AAnalyst 100 (66).
- Zn en pelo: se realizó calcinación y disolución de las muestras y se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica.
- Actividad de la fosfatasa alcalina en el plasma: determinada mediante una técnica colorimétrica con Kit Sigma 104-LL.
- Actividad de la fosfatasa alcalina en la membrana del eritrocito: se aislaron las membranas de los eritrocitos según Ruz y col (67), posteriormente, se determinó la actividad de fosfatasa alcalina de las muestras mediante técnica colorimétrica con Kit Sigma 104-LL.

Variables: la tabla 2 muestra las variables determinadas durante el estudio, todas se clasificaron como continuas.

Análisis estadístico: las comparaciones estadísticas se realizaron intra grupo en donde cada sujeto fue su propio control. Se realizó estadística descriptiva a cada una de las variables y se describieron como promedio y desviación estándar (DS); dado que los valores de Fn y Bio Fe presentan distribución asimétrica en la

población normal fueron transformadas a sus logaritmos naturales antes de realizar los contrastes de hipótesis y posteriormente se retransformaron estos resultados, mediante el uso del antilogaritmo, con el fin de reportar los promedios geométricos y los rangos de ± 1 DS en las unidades originales. Se utilizó la correlación de Pearson para observar la relación entre las variables del estado nutricional del Fe y la Bio Fe del día 1 (administración de la solución con Fe sin Zn). Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para determinar las diferencias en la Bio Fe entre los distintos tratamientos y se utilizó como prueba *pos hoc* la prueba de Dunnett para hallar diferencias entre la Bio Fe del día 1 y las de los demás días.

Tabla 2: clasificación de las variables de interés para el estudio.

<i>Variable</i>	<i>Tipo de variable</i>
Peso	Interviniente
Estatura	Interviniente
Volemia	Interviniente
Hemoglobina (Hb)	Interviniente
Volumen corpuscular medio (VCM)	Interviniente
Fn sérica	Interviniente
Porcentaje de saturación de la transferrina (% Sat)	Interviniente
Fe sérico	Interviniente
Cinc protoporfirina (ZPP)	Interviniente
Zn plasmático	Interviniente
Zn en pelo	Interviniente
Actividad de fosfatasa alcalina en plasma	Interviniente
Actividad de fosfatasa alcalina en membrana de eritrocito	Interviniente
Biodisponibilidad del Fe (Bio Fe)	Dependiente
Soluciones del estudio	Independientes

Resultados

El promedio de edad de las 14 participantes fue $36,6 \pm 4,4$ años. El índice de masa corporal promedio de $26,7 \pm 2,9$ Kg/m² y el estado nutricional de la muestra, valorado por este índice, fue 9 normales, 3 con sobrepeso y 2 obesas.

La tabla 3 muestra los valores de los parámetros hematológicos determinados durante el día 14, se usaron como referencia para la clasificación los valores que recomienda el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (68). El promedio de Hb fue $13,7 \pm 1,0$ mg/dL, una de las participantes presentó anemia por deficiencia de Fe (Hb < 12g/dL; ZPP > 70 μ g/dL/GR y VCM < 80fL), 2 presentaron Hb normal con 2 de los otros parámetros de laboratorio alterados, por lo cual se clasifican como deficientes de Fe sin anemia. Se reportan el promedio geométrico y el rango de ± 1 DS de la Fn en suero.

Tabla 3: parámetros hematológicos de las participantes en el estudio. La participante número 5 fue la única anémica.

Parámetros Bioquímicos del Estado Nutricional del Fe							
Sujeto	Hb (g/dL)	VCM (fL)	ZPP (μg/dL GR⁺)	Fe sérico (μg/dL)	TIBC (μg/dL)	% Sat (%)	Fn sérica (μg/L)
1	14,0	91	51,4	88,9	302,4	29,4	28,7
2	13,0	95	54,4	88,9	299,6	29,7	12,8
3	12,6	91	65,8	82,3	244,8	33,6	30,1
4	14,7	88	80,0	163,2	402,6	40,5	26,8
5	11,2	63	105,6	74,8	337,3	22,2	20,1
6	15,5	87	65,8	85,7	331,8	25,8	12,6
7	13,6	88	68,7	61,2	307,4	19,9	26,5
8	14,0	93	45,7	40,8	301,9	13,5	22,0
9	13,7	90	80,0	35,4	380,8	9,3	16,7
10	13,5	90	51,4	75,5	345,4	21,8	14,4
11	14,0	88	45,6	76,2	541,3	14,1	33,3
12	14,2	94	62,8	60,5	225,8	26,8	72,9
13	13,5	90	57,2	79,6	408,0	19,5	24,3
14	13,8	95	82,8	61,9	334,6	18,5	23,7
Promedio	13,7	88,8	65,5	76,8	340,3	23,2	23,4*
DS	1,0	7,9	16,9	29,9	77,7	8,4	24–23**

* Promedio del logaritmo natural y ** rango que comprende ± 1 DS de la Fn sérica. + μ g /dL Glóbulos Rojos

Las concentraciones de Zn sérico, Zn en pelo, y las actividades de fosfatasa alcalina en plasma y en la membrana del eritrocito fueron de: $94,1 \pm 10,7 \mu\text{g/dL}$, $149,1 \pm 16,7 \mu\text{g/dL}$, $30,2 \pm 7,6 \text{ U/L}$ y $0,3 \pm 0,1 \text{ mmol/min/mg}$, respectivamente. Ninguna de las participantes en el estudio presentó deficiencia de Zn.

El resultado de la correlación de Pearson entre la Bio Fe del día 1 (sin administración de Zn) y la Fn sérica fue $r = -0,587$ ($p = 0,027$), figura 2. La Bio Fe del día 1 no se correlacionó con las demás variables del estado nutricional del Fe, los datos se muestran en la tabla 4. Estos datos son similares a los de otros trabajos realizados por el Laboratorio de Micronutrientes del INTA.

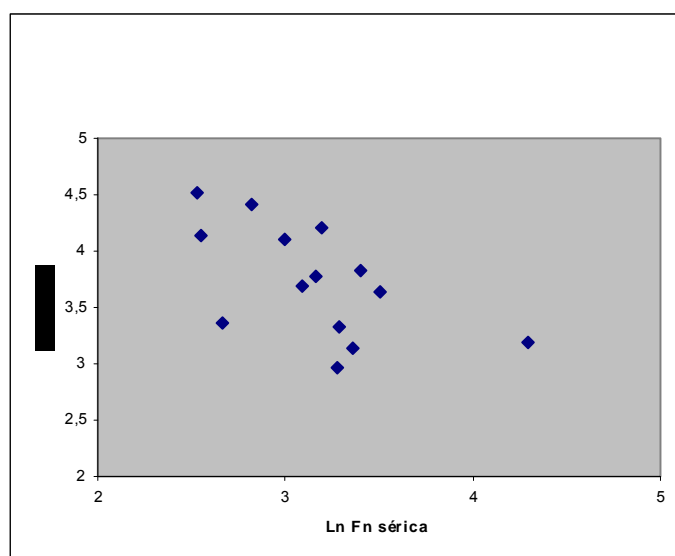


Figura 2: diagrama de dispersión de la correlación de Pearson entre el Ln de la Fn sérica y el Ln de la Bio Fe del tratamiento sin Zn (día 1), $r=-0,587$ y $p<0,027$.

Tabla 4: correlación de Pearson entre el Ln de la Bio Fe del tratamiento sin Zn (día 1) y las variables del estado nutricional del Fe.

Variable	r	p<
Hb	-0,117	0,688
VCM	-0,206	0,4788
ZPP	0,247	0,393
Fe sérico	-0,184	0,527
TIBC	0,1829	0,531
% Sat	-0,268	0,3531
Ln Fn sérica	-0,587	0,027*

* Única correlación estadísticamente significativa.

Los promedios geométricos y los rangos correspondientes a ± 1 DS de la Bio Fe, en cada uno de los tratamientos, se muestran en la tabla 5 y la figura 3. La prueba de ANOVA para mediciones repetidas reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, $p < 0,0020$. La prueba de Dunnett encontró diferencia significativa entre la Bio Fe del tratamiento con administración exclusiva de Fe y el de administración conjunta de Fe y Zn ($F=5,68$, $p < 0,001$); con los demás tratamientos no hubo diferencias.

Tabla 5: efecto del Zn sobre la Bio Fe al administrar el Zn simultáneamente con el Fe o 30 y 60 minutos antes.

Zn:Fe (mg)	0:0,50	11,71:0,50	11,71:0,50	11,71:0,50
Tiempo de administración del Zn (minutos)		0	-30	-60
Bio Fe (%)				
Promedio geométrico	41,9 ^a	25,0 ^b	35,0 ^a	40,0 ^a
Rango correspondiente a ± 1 DS	42,4 – 41,5	25,6 – 24,4	35,4 – 34,6	40,5 – 39,4

^{a,b} Diferencias significativas según la prueba de Dunnett ($F=5,68$, $p < 0,001$).

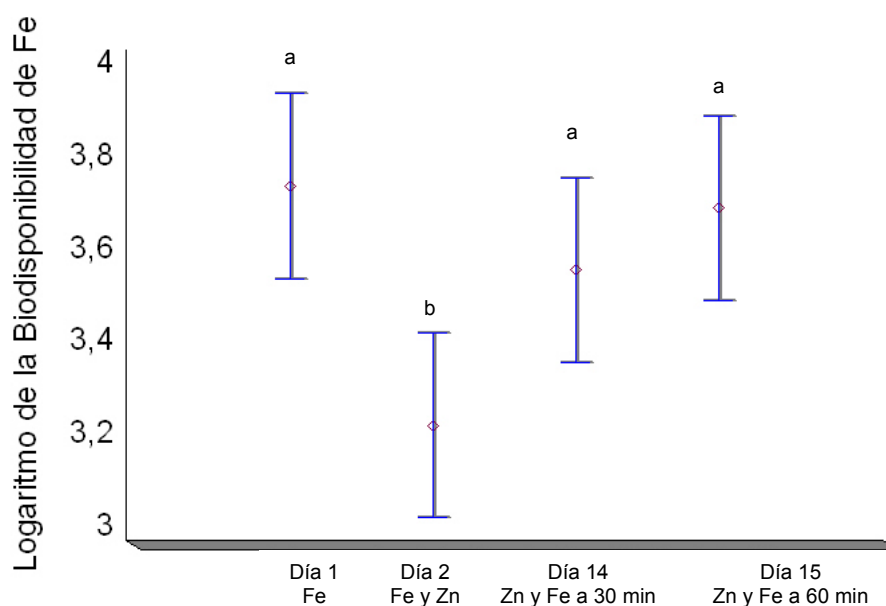


Figura 3: promedio y desviaciones estándar del Ln de la Bio Fe en cada uno de los tratamientos. ^{a,b} Diferencias significativas según la prueba de Dunnett ($F=5,68$, $p<0,001$).

Discusión

El Fe y el Zn administrados simultáneamente en solución compiten por su absorción en el tracto gastrointestinal mediante un mecanismo aún no esclarecido totalmente; conocer la dinámica de esta interacción es necesario para diseñar estrategias de prevención de las deficiencias de ambos microminerales y de esta manera disminuir el impacto social de las mismas. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el tiempo que dura el efecto inhibitorio de una dosis constante de Zn sobre la biodisponibilidad de Fe.

La comparación de los estudios de biodisponibilidad de los días sin administración de Zn y con administración conjunta de Zn y Fe evidencian la interacción del Fe y el Zn en el tracto gastrointestinal durante la administración conjunta y su impacto sobre la Bio Fe, además, concuerdan con los datos obtenidos en otros estudios (42, 43, 69). El mecanismo que más se ha relacionado con este fenómeno es la competencia que puede existir por el DMT1 en el borde en cepillo, a pesar de que se ha cuestionado el rol de este transportador en la absorción intestinal del Zn (21, 24). Los estudios realizados durante la caracterización de este transportador evidenciaron, mediante experimentos de clamp de voltaje, que el Zn genera cambios en los potenciales de membrana en ovocitos de *Xenopus*, similares a los generados por el Fe y otros metales divalentes distintos al Ca^{+2} al pasar a través del DMT1 (70). La evidencia actual hace pensar que el Fe y el Zn pueden competir por el DMT1 de la membrana apical de los enterocitos, sin que necesariamente se de un paso de grandes cantidades de Zn hacia el citoplasma de las células, pero si, una disminución del paso del Fe. De otro lado, hay un número de proteínas transportadoras de metales identificadas en levaduras, bacterias y plantas para las cuales no se han realizado los estudios de identificación de sus homólogos en mamíferos (71), en una de estas proteínas podría encontrarse, en parte, la explicación a la interacción que se encuentra entre el Fe y el Zn en el lumen intestinal.

Otro posible mecanismo de interacción entre los dos metales es la capacidad de algunos microminerales de modular la expresión de las proteínas implicadas en su

propia absorción o en la de otros minerales. Frazer y col describieron en células Caco-2 el fenómeno del “bloqueo de la mucosa”, que consiste en una disminución en la expresión de las proteínas implicadas en la absorción y transporte del Fe ante una precarga del mismo metal, la cual produce, luego de 2 horas, una disminución en los niveles del DMT1, la Dcytb y sus RNA mensajeros con recuperación de los mismos 72 horas después (72). Este fenómeno podría también producirse por otros metales, sin embargo, los estudios celulares previos muestran un aumento en la expresión del DMT1 y la ferroportina ante una sobrecarga de Zn, lo cual, favorecería el aumento y no la disminución de la Bio Fe (24).

Con el fin de evitar la interacción del Zn y el Fe, en el tracto gastrointestinal, sería necesario administrarlos en soluciones distintas y a un intervalo de tiempo que sea suficiente para que la primera de estas se desplace totalmente de la luz. Trabajos realizados por el grupo de Gisolfi, con individuos en reposo y durante actividad física, evidencian que la velocidad de vaciamiento gástrico del agua pura o de una solución hipotónica puede ser de hasta 17 mL/min y en los primeros 50 cm del intestino se puede absorber una cantidad mayor a 16 mL/min (68, 73). Basado en esto, se puede esperar que bastan solo 3 minutos para que los 50 mL de la solución hipotónica de Zn, dada inicialmente, pasen al duodeno y en 30 minutos esta ya habrá sobrepasado las primeras porciones de este órgano, en donde la existencia de mecanismos de absorción de alta capacidad permitirían la absorción de la mayor parte de la solución; los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con esta hipótesis: la Bio Fe sólo disminuyó cuando fueron

administrados de Zn y de Fe conjuntamente y no se afectó cuando los minerales fueron administrados con al menos 30 minutos de diferencia. Además, este resultado hace pensar que el fenómeno de bloqueo de la mucosa no está implicado, debido a que no es de esperar una modulación tan rápida de la expresión de proteínas en el enterocito y a que se requieren al menos 72 horas para que la célula se recupere de este bloqueo (72).

En conclusión se puede mencionar que la administración conjunta de Fe y Zn disminuyó la Bio Fe y este efecto no se observó cuando las dosis del Zn y del Fe se administraron con 30 minutos o más de diferencia. Esto se debió, probablemente, a la competencia que existe entre los dos minerales, en el borde en cepillo, por un mecanismo inespecífico de transporte. Estos hallazgos aportan al conocimiento sobre las interacciones del Fe y el Zn en el lumen intestinal y es importante tenerlos en cuenta a la hora de generar estrategias destinadas a disminuir la prevalencia de la deficiencia de Fe.

Bibliografía

1. Darnton-Hill I, Webb P, Harvey PW, Hunt JM, Dalmiya N, Chopra M, et al. Micronutrient deficiencies and gender: social and economic costs. *Am J Clin Nutr* 2005;81(5):1198S-1205S.
2. Singh R, Shaw J, Zimmet P. Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world. *Pediatr Diabetes* 2004;5(3):154-68.
3. Muller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *Cmaj* 2005;173(3):279-86.
4. Darnton-Hill I, Coyne ET. Feast and famine: socioeconomic disparities in global nutrition and health. *Public Health Nutr* 1998;1(1):23-31.
5. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29(3):336-55.

6. Iron. Bangkok, Thailand: FAO/WHO; 2002.
7. Santana MA, Pihakaski-Maunsbach K, Sandal N, Marcker KA, Smith AG. Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant Physiol* 1998;116(4):1259-69.
8. Yip R. Hierro. In: Bowman B, Rusell R, editors. *Conocimientos actuales en nutrición*. Washintong D.C.: Organización Mundial de la Salud; 2003. p. 340-359.
9. Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med* 2005;352(17):1741-4.
10. Miret S, Simpson RJ, McKie AT. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr* 2003;23:283-301.
11. Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Hainsworth LN, Porubcin M, Simovich MJ, et al. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(4):G767-74.
12. Wienk KJ, Marx JJ, Beynen AC. The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr* 1999;38(2):51-75.
13. Hallberg L, Hulthen L, Garby L. Iron stores in man in relation to diet and iron requirements. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(9):623-31.
14. Lynch SR. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr Rev* 1997;55(4):102-10.
15. Raja KB, Simpson RJ, Pippard MJ, Peters TJ. In vivo studies on the relationship between intestinal iron (Fe³⁺) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse. *Br J Haematol* 1988;68(3):373-8.
16. Hallberg L. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr* 1981;1:123-47.
17. Eakins JD, Brown DA. An improved method for the simultaneous determination of iron-55 and iron-59 in blood by liquid scintillation counting. *Int J Appl Radiat Isot* 1966;17(7):391-7.
18. Sandstrom B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr* 2001;85 Suppl 2:S181-5.
19. Hill CH, Matrone G, Payne WL, Barber CW. In vivo interactions of cadmium with copper, zinc and iron. *J Nutr* 1963;80:227-35.
20. Arredondo M, Martinez R, Nunez MT, Ruz M, Olivares M. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol Res* 2006;39(1):95-102.
21. Kordas K, Stoltzfus RJ. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J Nutr* 2004;134(6):1295-8.
22. Niederer W. Ferritin: iron incorporation and iron release. *Experientia* 1970;26(2):218-20.
23. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275(3):161-203.
24. Yamaji S, Tennant J, Tandy S, Williams M, Singh Srani SK, Sharp P. Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett* 2001;507(2):137-41.
25. Prasad AS, Oberleas D, Wolf P, Horwitz JP. Effect of growth hormone on nonhypophysectomized zinc-deficient rats and zinc on hypophysectomized rats. *J Lab Clin Med* 1969;73(3):486-94.

26. Prasad AS, Oberleas D, Wolf P, Horwitz HP. Studies on zinc deficiency: changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats. *J Clin Invest* 1967;46(4):549-57.
27. Prasad AS, Oberleas D, Wolf P, Horwitz JP, Miller ER, Luecke RW. Changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient pigs. *Am J Clin Nutr* 1969;22(5):628-37.
28. Moses H, Parker H. Influence of dietary zinc and age on the mineral content of rat tissues. *Fed Proc* 1964;23:132 (Abstract).
29. Hahn CJ, Evans GW. Absorption of trace metals in the zinc-deficient rat. *Am J Physiol* 1975;228(4):1020-3.
30. Storey ML, Greger JL. Iron, zinc and copper interactions: chronic versus acute responses of rats. *J Nutr* 1987;117(8):1434-42.
31. Settlemire CT, Matrone G. In vivo interference of zinc with ferritin iron in the rat. *J Nutr* 1967;92(2):153-8.
32. Cox DH, Harris DL. Effect of excess dietary zinc on iron and copper in the rat. *J Nutr* 1960;70:514-20.
33. Magee AC, Matrone G. Studies on growth, copper metabolism of rats fed high levels of zinc. *J Nutr* 1960;72:233-42.
34. Kang HK, Harvey PW, Valentine JL, Swendseid ME. Zinc, iron, copper, and magnesium concentrations in tissues of rats fed various amounts of zinc. *Clin Chem* 1977;23(10):1834-7.
35. Reinstein NH, Lonnerdal B, Keen CL, Hurley LS. Zinc-copper interactions in the pregnant rat: fetal outcome and maternal and fetal zinc, copper and iron. *J Nutr* 1984;114(7):1266-79.
36. Hamilton R, Fox M, Fry B, Jones A, Jacobs R. Zinc interference with copper, iron and manganese in young Japanese quail. *J Food Sci* 1979;44:738-741.
37. Lonnerdal B, Davidson L, Keen C. Effect of varying dietary iron and zinc levels on tissue concentrations in the rat. *Nutr Res (Suppl)* 1985;1:277-280.
38. Hamilton R, Fox M, Tao S, Fry B. Zinc-induced anemia in young Japanese quail ameliorated by supplemental copper and iron. *Nutr Res (Suppl)* 1981;1:589-599.
39. Kelleher SL, Casas I, Carbajal N, Lonnerdal B. Supplementation of infant formula with the probiotic lactobacillus reuteri and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35(2):162-8.
40. Harris WR. Thermodynamic binding constants of the zinc-human serum transferrin complex. *Biochemistry* 1983;22(16):3920-6.
41. Kelleher SL, Lonnerdal B. Zinc supplementation reduces iron absorption through age-dependent changes in small intestine iron transporter expression in suckling rat pups. *J Nutr* 2006;136(5):1185-91.
42. Rossander-Hulten L, Brune M, Sandstrom B, Lonnerdal B, Hallberg L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am J Clin Nutr* 1991;54(1):152-6.

43. Crofton RW, Gvozdanovic D, Gvozdanovic S, Khin CC, Brunt PW, Mowat NA, et al. Inorganic zinc and the intestinal absorption of ferrous iron. *Am J Clin Nutr* 1989;50(1):141-4.
44. Friel JK, Serfass RE, Fennessey PV, Miller LV, Andrews WL, Simmons BS, et al. Elevated intakes of zinc in infant formulas do not interfere with iron absorption in premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27(3):312-6.
45. Herman S, Griffin IJ, Suwanti S, Ernawati F, Permaesih D, Pambudi D, et al. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in Indonesian children. *Am J Clin Nutr* 2002;76(4):813-7.
46. Yadrick MK, Kenney MA, Winterfeldt EA. Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron in adult females. *Am J Clin Nutr* 1989;49(1):145-50.
47. Lind T, Lonnerdal B, Stenlund H, Ismail D, Seswandhana R, Ekstrom EC, et al. A community-based randomized controlled trial of iron and zinc supplementation in Indonesian infants: interactions between iron and zinc. *Am J Clin Nutr* 2003;77(4):883-90.
48. Lind T, Lonnerdal B, Stenlund H, Gamayanti IL, Ismail D, Seswandhana R, et al. A community-based randomized controlled trial of iron and zinc supplementation in Indonesian infants: effects on growth and development. *Am J Clin Nutr* 2004;80(3):729-36.
49. Dijkhuizen MA, Wieringa FT, West CE, Martuti S, Muhilal. Effects of iron and zinc supplementation in Indonesian infants on micronutrient status and growth. *J Nutr* 2001;131(11):2860-5.
50. Zlotkin S, Arthur P, Schauer C, Antwi KY, Yeung G, Piekarz A. Home-fortification with iron and zinc sprinkles or iron sprinkles alone successfully treats anemia in infants and young children. *J Nutr* 2003;133(4):1075-80.
51. Donangelo CM, Woodhouse LR, King SM, Viteri FE, King JC. Supplemental zinc lowers measures of iron status in young women with low iron reserves. *J Nutr* 2002;132(7):1860-4.
52. O'Brien KO, Zavaleta N, Caulfield LE, Yang DX, Abrams SA. Influence of prenatal iron and zinc supplements on supplemental iron absorption, red blood cell iron incorporation, and iron status in pregnant Peruvian women. *Am J Clin Nutr* 1999;69(3):509-15.
53. Tielsch JM, Khatry SK, Stoltzfus RJ, Katz J, LeClerq SC, Adhikari R, et al. Effect of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on preschool child mortality in southern Nepal: community-based, cluster-randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2006;367(9505):144-52.
54. Berger J, Ninh NX, Khan NC, Nhien NV, Lien DK, Trung NQ, et al. Efficacy of combined iron and zinc supplementation on micronutrient status and growth in Vietnamese infants. *Eur J Clin Nutr* 2006;60(4):443-54.
55. Fischer Walker C, Kordas K, Stoltzfus RJ, Black RE. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am J Clin Nutr* 2005;82(1):5-12.

56. Brzozowska A. [Harmful elements and iron, zinc and copper: Interactions in the animal and human organism. Part III. Cadmium]. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1991;42(3):269-76.
57. Ettlemire CT, Matrone G. In vivo effect of zinc on iron turnover in rats and life span of the erythrocyte. *J Nutr* 1967;92(2):159-64.
58. International Zinc Nutrition Consultative Group. Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in Populations and Options for Its Control. *Food and Nutrition Bulletin* 2004;25:S91-S204.
59. Allen LH. Iron supplements: scientific issues concerning efficacy and implications for research and programs. *J Nutr* 2002;132(4 Suppl):813S-9S.
60. Layrisse M, Martinez-Torres C. Model for measuring dietary absorption of heme iron: test with a complete meal. *Am J Clin Nutr* 1972;25(4):401-11.
61. Cook JD, Lipschitz DA. Clinical measurements of iron absorption. *Clin Haematol* 1977;6(3):567-81.
62. Glantz S.A. Primer of biostatistics: The program. In. 3.02 ed: McGraw -Hill Inc; 1992.
63. Nadler S, Hidalgo I, Block T. The Tulane Table of Blood Volume in Normal Man. *Surgeon* 1962;51:224-232.
64. International Anemia Consultative Group. Measurements of iron status. Washington: Nutrition Foundation; 1985.
65. Fischer DS, Price DC. A Simple Serum Iron Method Using the New Sensitive Chromogen Tripyridyl-S-Triazine. *Clin Chem* 1964;10:21-31.
66. Smith JC, Jr., Butrimovitz GP, Purdy WC. Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem* 1979;25(8):1487-91.
67. Ruz M, Cavan KR, Bettger WJ, Gibson RS. Erythrocytes, erythrocyte membranes, neutrophils and platelets as biopsy materials for the assessment of zinc status in humans. *Br J Nutr* 1992;68(2):515-27.
68. Gisolfi CV, Summers RW, Lambert GP, Xia T. Effect of beverage osmolality on intestinal fluid absorption during exercise. *J Appl Physiol* 1998;85(5):1941-8.
69. Olivares M, Pizarro F, Ruz M. Inhibition of iron absorption by zinc. In: XLII Reunión Anual de la Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica; 2005; Lima, Perú: *Pediatr Res*; 2005. p. 924-b.
70. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388(6641):482-8.
71. Rolfs A, Hediger MA. Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications. *J Physiol* 1999;518 (Pt 1):1-12.
72. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Murphy TL, Vulpe CD, McKie AT, et al. A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut* 2003;52(3):340-6.
73. Shi X, Summers RW, Schedl HP, Chang RT, Lambert GP, Gisolfi CV. Effects of solution osmolality on absorption of select fluid replacement solutions in human duodenojejunum. *J Appl Physiol* 1994;77(3):1178-84.