

00567



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFEECTO DE LA SUPLEMENTACION CON ZINC
Y/O HIERRO EN EL ESTADO NUTRICIO DE LA
VITAMINA A DE NIÑOS MEXICANOS DE UNA
ZONA RURAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA DE ALIMENTOS)
P R E S E N T A :
ELSA CONCEPCION MUÑOZ LOZANO



MEXICO, D.F.

290381

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Efecto de la suplementación con zinc y/o hierro en el estado nutricional de la vitamina A de niños Mexicanos de una zona rural”

Trabajo realizado en el Depto de Fisiología de la Nutrición de la Dirección de Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F.

Director de tesis

Dr. Jorge Luis Rosado Loria,

*Investigador titular del Depto de Fisiología de la Nutrición del
INCMNSZ*

Jurado asignado para el examen:

<i>Presidente</i>	<i>Dr. Héctor Bourges Rodríguez</i>
<i>Vocal</i>	<i>Dr. Armando Tovar Palacio</i>
<i>Secretario</i>	<i>Dra. Evangelina Camacho Frías</i>
<i>Primer suplente</i>	<i>M. en C. Angela Sotelo López</i>
<i>Segundo suplente</i>	<i>M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo</i>

AGRADECIMIENTOS :

*Al Dr. Jorge Luis Rosado Loria
Por su valiosa dirección de este estudio*

*Al Dr Héctor Bourges Rodríguez
Por su apoyo para la realización de mis estudios de
Maestría*

*A todos los miembros de mi jurado
por sus valiosas observaciones y aportaciones para la
presentación de este trabajo*

*A la M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo
por la claridad y calidad de sus clases en los cursos de la
Maestría, y por la paciencia brindada para aclarar mis dudas*

A mis compañeros y amigos de la Maestría: Silvana, Elsa, Mónica, Gerardo[†] y Hugo[†], quiero agradecerles su camaradería y amistad que siempre me brindaron. A todos ellos todo mi cariño y recuerdo imborrable.

***DEDICO ESTE TRABAJO
A MI HIJA ADRIANA
CON TODO MI AMOR***

ÍNDICE

	Pag.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. HIPÓTESIS	8
IV. OBJETIVOS	9
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	10
V.1 Sujetos y localidad.....	10
V.2 Suplementación.....	10
V.3 Evaluación bioquímica.....	11
V.4 Análisis estadístico.....	13
VI. RESULTADOS	
VI.1 <i>Distribución, características y estado nutricional</i> <i>de los niños al inicio del estudio</i>	16
VI.2 <i>Efecto de la suplementación en el estado nutricional</i> <i>de zinc y hierro</i>	18

VI.3 Efecto de la suplementación en el estado nutricional de vitamina A.....	20
VI.4 Efecto del estado inicial de hierro, zinc y vitamina A en el incremento de la concentración del retinol.....	23
VI.5 Efecto de la suplementación en la prevalencia de deficiencia de zinc, hierro y vitamina A.....	25
VII. DISCUSIÓN.....	26
VIII. CONCLUSIONES.....	34
ANEXO 1. GENERALIDADES SOBRE VITAMINA A Y ANTECEDENTES DE LA INTERACCIÓN DEL ZINC Y DEL HIERRO CON LA VITAMINA A.....	36
A1.1 Estructura, componentes y su presencia en los alimentos y el organismo.....	36
A1.2 Fuentes de vitamina A en la alimentación en general y en la alimentación en las zonas rurales y urbanas marginadas de México.....	39
A1.3 Unidades y recomendaciones de ingestión de vitamina A para la población mexicana.....	40

	<i>Pag</i>
<i>A1.4 Importancia de la vitamina A desde el punto de vista nutricional.....</i>	<i>41</i>
<i>A1.5 Metabolismo de la vitamina A.....</i>	<i>43</i>
<i>A1.6 Interacción metabólica Zn / Vit A.....</i>	<i>45</i>
<i>A1.7 Interacción Fe / Vit A.....</i>	<i>52</i>

ANEXO 2. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA METODOLOGÍA

UTILIZADA PARA EL ANÁLISIS DE LOS

INDICADORES BIOQUÍMICOS.....55

<i>A2.1 Zinc en plasma</i>	<i>55</i>
<i>A2.2 Ferritina en plasma.....</i>	<i>58</i>
<i>A2.3 Retinol en plasma.....</i>	<i>60</i>
<i>A2.4 Proteína transportadora del retinol (RBP).....</i>	<i>64</i>
<i> y Prealbúmina (PA)</i>	<i>64</i>
<i>A2.5 Proteína C reactiva (CRP).....</i>	<i>67</i>

LX. BIBLIOGRAFÍA.....70

ANEXO 3. PUBLICACIÓN DEL ESTUDIO EN LA REVISTA

AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION.....81

I. RESUMEN

En el presente estudio se investigó el efecto de la suplementación con zinc o hierro o ambos, sobre el estado nutricional de la vitamina A y las proteínas relacionadas con su metabolismo, la proteína transportadora del retinol (RBP) y la prealbúmina (PA), en 219 niños de 18 a 36 meses de edad de ambos sexos, residentes de 5 comunidades rurales del Valle de Solís, en México. El estudio fue longitudinal, doble ciego y controlado con placebo. Los niños se distribuyeron en 4 grupos y se suplementaron durante 6 meses con zinc (20mg/d), hierro (20mg/d), zinc más hierro (20mg/d de cada uno) o placebo.*

Después de la suplementación, el retinol plasmático se incrementó en todos los grupos suplementados. En comparación con el grupo placebo, la suplementación con zinc incrementó significativamente el retinol y la prealbúmina. La suplementación con hierro produjo un incremento significativo en la concentración del retinol, RBP y la PA. La suplementación zinc/hierro incrementó significativamente el retinol pero no la RBP ni la PA. Otra observación fue que los niños que al tiempo basal estaban deficientes de zinc, hierro o vitamina A, después de la

suplementación, tuvieron un incremento del retinol, significativamente mayor que los niños con estado adecuado.

Se concluye que la suplementación con zinc, hierro o ambos, mejora el estado nutricional de vitamina A y que la deficiencia de estos micronutrientes juega un papel importante en la respuesta de la vitamina A a la suplementación. Este estudio apoya observaciones previas de la existencia de una interrelación metabólica entre el zinc y la vitamina A y sugiere la existencia de una interacción entre el hierro y el metabolismo de la vitamina A.

Palabras clave

Deficiencia de micronutrientes, suplementación, vitamina A, retinol, zinc, hierro. proteína transportadora del retinol (RBP), prealbúmina (PA), interacción zinc-vitamina A, interacción hierro-vitamina A.

** El estudio ha sido recientemente publicado en la revista científica American Journal of Clinical Nutrition 2000;71:789-94*

II. INTRODUCCIÓN

En muchas regiones del mundo, en especial de los países en desarrollo, la coexistencia de deficiencias múltiples de micronutrientes se reconoce como un problema de Salud Pública cada vez más generalizado¹⁻⁴. En las zonas rurales de México, la prevalencia de concentraciones bajas de vitamina A en el plasma de los niños es muy alta, así como la deficiencia de zinc y hierro, entre otras^{1, 2, 5, 6} y se presume se debe en gran parte, al tipo de dieta que se tiene en estas regiones, baja en alimentos de origen animal y alta en alimentos de origen vegetal, los cuales tienen un alto contenido de fitatos y fibra que disminuyen la biodisponibilidad de los minerales⁷.

Mediante encuestas recientes, llevadas a cabo con niños del Valle de Solís, población sujeto de este estudio, se encontró que la ingestión de alimentos de origen animal ofrece en promedio, solamente el 9% de la energía total de los niños en edad preescolar; que la ingestión de vitamina A es aproximadamente de 176 µg/día, lo cual resulta deficiente al comparar con los 400 µg/día recomendados para este grupo de edad⁸; también se encontró que el 68% de los niños tenían una ingestión

inadecuada de zinc después de ajustar su biodisponibilidad mediante el uso de la relación molar ácido fítico-zinc, que el 43% presentaban ingestión inadecuada de hierro biodisponible, asumiendo que sólo 25% y 5% del hierro heme y no heme que se ingiere se absorbe, respectivamente; y que el 88% tenían reservas inadecuadas de hierro^{4,6}.

Mediante éste y otros estudios^{1,2,5}, se han encontrado concentraciones bajas de vitamina A en suero en 27 a 40 % de los niños de Solís. El 45 a 80% presentan concentraciones bajas de hemoglobina y 33 a 55%, concentraciones bajas de ferritina en suero. La deficiencia de zinc en estos niños casi no ha sido estudiada, aunque algunos datos previos mostraron que el 92% presentaba concentraciones bajas de zinc en eritrocitos¹:

Algunos estudios en México muestran que entre el 25 y 50% de los niños en edad preescolar de las áreas rurales tienen retraso en su crecimiento³, así como investigaciones recientes muestran que la deficiencia de hierro, zinc y vitamina A causan efectos similares en la funcionalidad de los niños, afectándose principalmente el crecimiento⁹⁻¹¹ y la incidencia de enfermedades infecciosas¹²⁻¹⁴ así como su desarrollo cognocitivo^{15,16}.

A través de varias investigaciones con animales¹⁷⁻²⁴ y seres humanos²⁵⁻²⁹ se ha demostrado que el zinc y la vitamina A se interrelacionan funcional y metabólicamente. La deficiencia de zinc se asocia frecuentemente con bajas concentraciones de vitamina A circulante aún con las reservas hepáticas normales, sugiriéndose que el defecto no es en la absorción o el transporte de la vitamina hasta el hígado, sino en su movilización. En casos de deficiencia de zinc, se afecta la síntesis de proteínas de vida media corta, tales como la proteína transportadora del retinol o RBP, afectándose consecuentemente la movilización de la vitamina A almacenada en el hígado hacia los tejidos. Existen revisiones previas y estudios de suplementación con zinc en niños desnutridos²⁵, niños prematuros²⁶, adultos con cirrosis hepática²⁷, fibrosis quística²⁸; y en la mayoría de ellos se informa un efecto benéfico del zinc sobre las concentraciones de vitamina A circulante. Otros estudios no informan tal efecto^{28,29}, sin embargo sugieren una interacción funcional entre el zinc y la vitamina A al observarse anomalías en la impresión citológica de la conjuntiva (CIC) de niños desnutridos suplementados con sólo zinc o vitamina A y no en los suplementados con zinc más vitamina A²⁹. Estas diferencias de los resultados en algunos estudios, se explican en términos de diferencias de los sujetos en el estado basal de zinc, vitamina A y quizás otros nutrimentos²⁵. Existen estudios de suplementación con

vitamina A en los que no se ha aliviado la deficiencia de la vitamina A y sus consecuencias en la salud³⁰; se sugiere que la deficiencia de zinc bien podría haber sido la causa de ese fracaso.

Estudios con seres humanos^{31,32} y animales³³⁻³⁵ han mostrado que la deficiencia de vitamina A está asociada con anormalidades del metabolismo del hierro, y que la suplementación con vitamina A mejora los índices hematológicos del estado de hierro³⁶⁻⁴². En algunos de ellos, se sugiere que la vitamina A regula la liberación del hierro del hígado hacia el plasma y tejidos, por lo que en caso de deficiencia de vitamina A se afecta esta liberación provocándose anemia aún con ingestión y reservas adecuadas de hierro. Sin embargo hasta el momento no se conoce el mecanismo preciso de esta interacción. Existen trabajos de suplementación con vitamina A en niños y mujeres embarazadas anémicos^{32, 40-42} encaminados a estudiar su efecto sobre el estado nutricional y el metabolismo del hierro, sin embargo no se han informado estudios longitudinales para evaluar el efecto de la suplementación con hierro en el metabolismo y estado nutricional de la vitamina A.

Consecuentemente en este estudio se investigó el efecto de la suplementación con zinc o hierro o ambos, sobre las concentraciones

plasmáticas de la vitamina A y las proteínas relacionadas con su metabolismo: la proteína transportadora del retinol (RBP) y la prealbúmina (PA), en niños preescolares residentes del Valle de Solís, en México.

III. HIPÓTESIS

La suplementación de niños con zinc o hierro o ambos, mejora el estado nutricional de la vitamina A.

IV. OBJETIVOS

- *Investigar el efecto de la suplementación con zinc o hierro o ambos, en las concentraciones plasmáticas de la vitamina A y las proteínas asociadas con su metabolismo: la proteína transportadora de retinol (RBP) y la prealbúmina (PA), en un grupo de preescolares de una población rural de México.*
- *Estudiar una posible interrelación del hierro con el metabolismo de la vitamina A.*
- *Confirmar la existencia de una interacción metabólica entre el zinc y la vitamina A.*

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

V.1 Sujetos y localidad

El estudio se realizó con 219 niños en edad preescolar (110 hombres y 109 mujeres) de 18 a 36 meses de edad, residentes de 5 comunidades del Valle de Solis, zona rural localizada 150 km al noreste de la Ciudad de México. El número de niños incluidos en el estudio, se estableció después de que un censo de población infantil reveló que había 290 niños de la edad requerida en las diferentes comunidades, aunque solamente 219 madres de los niños acudieron a la invitación para participar. Previamente se obtuvo por escrito el consentimiento de las madres, una vez que se les explicó el diseño, riesgos potenciales y beneficios del estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

V.2. Suplementación

Los niños se dividieron de acuerdo a su edad, sexo y déficit de talla para la edad, se asignaron a cuatro tratamientos o grupos en forma homogénea y se suplementaron con 20 mL/día de una bebida que

contenía ya sea, 20 mg de hierro en forma de sulfato ferroso, ó 20 mg de zinc en forma de zinc metionina (se eligió esta forma debido a que en un estudio previo se demostró que ésta se absorbió mejor que otras fuentes de zinc³⁸), ó 20 mg de zinc más 20 mg de hierro, o placebo. Todos los suplementos tuvieron la misma formulación, que consistió en una solución azucarada adicionada de ácido cítrico y sabor artificial de naranja o limón, el cual se les cambió en forma alterna cada semana con el fin de evitar rechazo de los niños al mismo sabor por tiempo prolongado.

Los niños de los cuatro grupos bebieron el suplemento por 6 meses durante 5 días de la semana de lunes a viernes en presencia de una trabajadora de campo de la comunidad, con el fin de asegurar su ingestión. Sólo desertaron 15 niños en el transcurso de los 6 meses.

V.3 Evaluación bioquímica

Los niños se presentaron en ayunas al inicio, así como a los 6 meses del estudio. Se les tomó una muestra de 2mL de sangre venosa mediante un tubo vacutainer libre de minerales que contenía 0.05 mL de citrato de sodio como anticoagulante, con el fin de realizar las mediciones de los indicadores bioquímicos del estado de zinc, hierro y vitamina A. La hemoglobina se midió dentro de las tres horas siguientes a la extracción de

la sangre, mediante un analizador Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, FL). El plasma se separó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, teniendo cuidado de no hemolizar la sangre para no afectar la determinación de zinc. El plasma se dividió en porciones de 100 μ l para las diferentes mediciones y de 500 μ l para la del zinc. Las muestras del plasma se congelaron de inmediato y se conservaron a -70°C hasta el momento de su análisis y protegidas de la luz para no afectar la actividad del retinol.

El zinc se cuantificó mediante espectroscopía de absorción atómica^{45,46}. La ferritina en plasma se analizó mediante un radioinmunoensayo en fase sólida utilizando el kit Coat-A-Count ferritin "IRMA" (Diagnostic Products Corp los Angeles, CA)⁴⁷. La extracción de la vitamina A del plasma, se basó en los métodos de Catignani⁴⁸, y Catignani y Bieri⁴⁹, sólo que en lugar de añadir acetato de retinol, se añadió retinil miristato como estándar interno y se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) fase reversa de acuerdo al método de Barua y col.⁵⁰. La proteína transportadora de retinol (RBP) y la prealbúmina (PA) en el plasma se analizaron mediante un inmunoensayo y nefelometría láser (Behring Diag.Inc.Somerville,NJ)⁵¹. La proteína C-reactiva (CRP) se analizó mediante nefelometría y el NA

latex CRP kit de Behring (Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ)⁵². Todos los análisis se hicieron por duplicado. En cada corrida se usaron soluciones estándar y sueros control certificados con el fin de asegurar la confiabilidad de los resultados.

V.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos, se analizaron mediante el paquete estadístico SAS para PC⁵³. De cada uno de los indicadores bioquímicos medidos (variables dependientes) se obtuvo su valor promedio y la desviación estándar ($\alpha = 0.05$), así como para el cambio ocurrido en éstos al término de la suplementación (los niños que no tenían dato a los cero y 6 meses se eliminaron de la estadística).

Para evaluar la homogeneidad de la varianza de cada una de las variables independientes se usó la prueba de Bartlett. Se aplicaron análisis de varianza aleatorios o de una vía para establecer si cada una de las variables independientes presentaba o no un efecto significativo sobre la respuesta evaluada (variable dependiente).

Para evaluar el efecto de la suplementación (Tablas 2, 3 y 5), y debido a la gran variabilidad del estado nutricional de los sujetos al inicio del

estudio, en lugar de analizar valores iniciales y finales, se decidió analizar los cambios ocurridos entre los cero y 6 meses para cada una de las variables dependientes evaluadas mediante un diseño cuadrado latino para mediciones repetitivas desbalanceado (se aplicó este diseño debido a que previamente se observó que en el modelo factorial las interacciones no presentaron efecto significativo).

Las pruebas de rango múltiple Duncan y rango fijo Tukey, se utilizaron para evaluar el nivel de significancia de las variables independientes que tuvieron efecto significativo sobre cada una de las variable dependientes, así como para concluir sobre el tratamiento o grupo que propició mayores incrementos en las concentraciones de cada una de las variables dependientes medidas.

Diseño del cuadrado latino

Variables independientes:

V1 = Grupos o tratamientos (4 niveles: placebo, zinc, hierro, zinc/hierro)

V2 = Sexo (2 niveles: hombres, mujeres)

V3=Estado nutricional inicial de vitamina A o zinc o hierro
(2 niveles: adecuados y suficientes).

V4=Repeticiones o valor de cada una de las variables dependientes por duplicado para cada niño.

Variables dependientes:

V5=Cambio en las concentraciones de retinol o RBP o PA o hemoglobina o ferritina o zinc

Interpretación de los resultados

Los grupos suplementados se compararon con el grupo placebo para evaluar si hubo o no efecto significativo de la suplementación. Se consideró efecto significativo cuando la probabilidad (p) fue igual o menor de 0.05

VI. RESULTADOS

VI.1 Distribución, características y estado nutricio de los niños al inicio del estudio

La Tabla 1 muestra las características y el estado nutricio de los niños al inicio del estudio. No hubo diferencia significativa entre los grupos en el número, edad promedio, distribución de los sexos, y déficit de peso y talla. En promedio, los niños tenían un retraso de talla y peso para la edad de -1.6 y -1.4 desviaciones estándar, respectivamente, por debajo de los valores de referencia internacionales del National Center for Health Statistics (NCHS). Los valores promedio de hemoglobina se encontraban por debajo del intervalo de concentración normal, considerando como límite inferior de concentración normal 11.7 g/dL; mientras que las concentraciones promedio de zinc y retinol en plasma eran adecuadas, considerando como criterio de adecuación 70 a 120 y 20 a 50 µg/dL, respectivamente. La prevalencia de anemia en todos los niños, fue en promedio del 73%, el 51% presentaban valores plasmáticos bajos de ferritina, 25% valores bajos de zinc y 29% valores bajos de retinol en plasma.

Tabla 1. Características y estado nutricional de los niños al inicio del estudio

	Placebo	Zinc	Hierro	Zinc+Hierro	Todos
No.de niños (H/M)	30/26	27/27	30/24	30/25	117/102
Edad (m) ¹	28.9±7.9	28.4±7.5	27.5±6.9	28.8±8.9	28.4±7.8
Antropometría (calificación Z)¹					
Peso para edad	-1.4±0.6	-1.4±0.8	-1.6±0.9	-1.2±0.9	-1.4±0.8
Talla para edad	-1.8±0.9	-1.6±1.0	-1.6±1.2	-1.5±1.0	-1.6±1.0
Peso para talla	-0.4±0.08	-0.4±0.08	-0.7±0.08	-0.3±0.12	-0.5±0.09
Indicadores Bioquímicos					
Hemoglobina (g/dL) ¹	10.8±1.4	10.9±1.1	10.8±1.3	10.7±1.0	10.8±1.2
(%deficientes) ²	71	70	67	82	73
Ferritina plasmática(μg/L) ¹	20.0±44.6	18.9±15.8	21.2±38.2	14.7±15.6	18.7±28.5
(%deficientes) ³	57	43	49	55	51
Zinc en plasma (μg/dL) ¹	92.9±31.3	86.4±27.7	99.2±28.7	107.6±31.0	96.5±29.7
(%deficientes) ⁴	27	26	28	18	25
Retinol plasmático (μg/dL) ¹	33.9±12.4	29.0±12.6	28.1±15.8	29.0±16.3	30.0±14.2
(%deficientes) ⁵	28	23	34	33	29

¹ $\bar{x} \pm DE$. calificación Z=desviación del valor individual en relación al valor de referencia

²⁻⁵ Niños (%) con valores : ²<11.7 g/dL de hemoglobina, ³<12 μg/L de ferritina, ⁴<70 μg/dL de zinc,

⁵<20 μg/dL de retinol.

No hubo diferencia significativa entre los grupos para ninguna de las variables.

VI.2 Efecto de la suplementación con zinc o hierro en el estado nutricional del zinc y hierro

La Tabla 2 muestra las concentraciones promedio de hemoglobina, ferritina y zinc de los niños al inicio del estudio y después de 6 meses de suplementación. Como se esperaba, la suplementación sólo con hierro o en combinación con zinc, incrementó significativamente las concentraciones de hemoglobina y ferritina; mientras que la suplementación sólo con zinc o en combinación con hierro, incrementó las concentraciones plasmáticas de zinc.

Tabla 2. Indicadores bioquímicos del estado de zinc y hierro al inicio y después de 6 meses de suplementación ¹

	Placebo	Zinc	Hierro	Zinc+Hierro
<i>Hemoglobina (g/dL)</i>				
Inicio	10.8 ± 1.4	10.9 ± 1.1	10.8 ± 1.3	10.7 ± 1.0
Post-tratamiento	11.6 ± 1.0	11.8 ± 0.9	12.2 ± 0.9	11.9 ± 1.0
Cambio ²	0.8 ± 1.63 ^a	0.8 ± 1.29 ^a	1.4 ± 1.4 ^b	1.3 ± 1.3 ^b
<i>Ferritina plasmática (µg/L)</i>				
Inicio	20.0 ± 44.6	18.9 ± 15.8	21.2 ± 38.2	14.7 ± 15.6
Post-tratamiento	16.2 ± 13.8	16.6 ± 15.4	37.3 ± 17.2	33.6 ± 18.7
Cambio ²	-4.6 ± 41.6 ^a	-2.3 ± 15.6 ^a	15.4 ± 38.7 ^c	18.6 ± 20 ^c
<i>Zinc plasmático (µg/dL)</i>				
Inicio	92.9 ± 31.3	86.4 ± 27.7	99.2 ± 28.7	107.6 ± 31
Post-tratamiento	94.0 ± 30.8	110.3 ± 37.0	97.4 ± 29.6	118.6 ± 33
Cambio ²	1.2 ± 21.2 ^a	23.7 ± 30.8 ^c	1.8 ± 22.3 ^a	10.6 ± 32 ^c

¹ $\bar{x} \pm DE$.

² Valores en el mismo renglón, con superíndices diferentes, son significativamente diferentes, $p < 0.05$

^{b,c} significativamente diferente del grupo placebo: ^b $p < 0.05$, ^c $p < 0.001$ (cuadrado latino)

VI.3 Efecto de la suplementación con zinc o hierro en el estado nutricional de la vitamina A

En la Tabla 3 se muestran los cambios en las concentraciones plasmáticas de retinol, RBP y PA después de 6 meses de suplementación. Al comparar con el grupo placebo, el incremento del retinol y PA, fue significativamente más alto en el grupo suplementado con zinc ($p \leq 0.05$), mientras que el cambio en RBP no fue significativo ($p = 0.15$). La suplementación sólo con hierro, incrementó significativamente el retinol, RBP y PA. La suplementación con zinc más hierro incrementó el retinol y RBP, en forma similar a la suplementación con sólo zinc, pero no tuvo efecto significativo en la PA ($p = 0.25$). La suplementación sólo con hierro produjo un incremento del retinol y RBP, aún mayor que la suplementación con zinc o zinc más hierro, y un efecto sobre la PA similar al de la suplementación sólo con zinc. Al comparar los valores promedio iniciales y finales de retinol (Tabla 4), se observó que el grupo que incrementó más sus concentraciones de retinol, fue el suplementado sólo con hierro (27.8%) siguiéndole el grupo suplementado con zinc más hierro (8.6%) y sólo zinc (8.3%); por el contrario, el grupo placebo disminuyó sus concentraciones de retinol en aproximadamente 3.8%.

Tabla 3. Indicadores bioquímicos del estado de vitamina A al inicio y después de 6 meses de suplementación ¹

	Placebo	Zinc	Hierro	Zinc+Hierro
<i>Retinol (µg/dL)</i>				
Inicio	33.9 ± 12.4	29.0 ± 12.6	28.1 ± 15.8	29.0 ± 16.3
Post-tratamiento	32.6 ± 10.8	35.0 ± 10.0	35.9 ± 11.0	31.5 ± 8.8
Cambio ²	-1.3 ± 21.7 ^a	5.7 ± 14.4 ^b	7.8 ± 15.4 ^b	2.4 ± 16.3 ^b
<i>Proteína transportadora del retinol (mg/L)</i>				
Inicio	21.5 ± 8.1	24.2 ± 7.7	22.9 ± 8.7	22.8 ± 10.
Post-tratamiento	22.4 ± 7.2	26.2 ± 8.7	28.4 ± 10.7	24.8 ± 7.2
Cambio ²	0.9 ± 8.6 ^a	1.9 ± 10.2 ^a	5.4 ± 7.8 ^b	2.0 ± 9.9 ^a
<i>Prealbúmina (mg/dL)</i>				
Inicio	19.2 ± 4.1	19.9 ± 5.0	20.5 ± 5.3	20.8 ± 6.3
Post-tratamiento	20.7 ± 5.0	24.1 ± 5.6	23.9 ± 4.9	23.0 ± 5.0
Cambio ²	1.4 ± 4.5 ^a	4.2 ± 6.6 ^b	3.3 ± 5.6 ^b	2.3 ± 5.9 ^a

¹ $\bar{x} \pm DE$

² Valores en el mismo renglón, con superíndices diferentes, son significativamente diferentes, $p < 0.05$

^b significativamente diferente del grupo placebo: $p < 0.05$ (cuadrado latino)

Tabla 4. Cambio en las concentraciones promedio de retinol después de la suplementación.

	Placebo	Zinc	Hierro	Zinc + Hierro
Inicio ($\mu\text{g/dL}$) ¹	33.9 ± 12.4	29.0 ± 12.6	28.1 ± 15.8	29.0 ± 16.3
Post-tratamiento ($\mu\text{g/dL}$) ¹	32.6 ± 10.8	35.0 ± 10.0	35.9 ± 11.0	31.5 ± 8.8
Cambio (%)	-3.8	8.3	27.8	8.6

¹ $\bar{x} \pm DE$

VI.4 Efecto del estado inicial de vitamina A, zinc y hierro en el incremento de las concentraciones del retinol

La Tabla 5 muestra el efecto del estado nutricional inicial de vitamina A, zinc y hierro, en la respuesta del retinol a la suplementación con zinc o hierro. Los niños inicialmente deficientes en vitamina A y que fueron suplementados con zinc, hierro y zinc más hierro, tuvieron un incremento del retinol, significativamente mayor que los niños con estado adecuado de la vitamina. Los niños que eran deficientes en zinc al inicio del estudio, y que fueron suplementados con zinc o zinc más hierro, incrementaron significativamente sus concentraciones de retinol, en comparación con los niños que tenían concentraciones adecuadas de zinc. Similarmente, el incremento de retinol fue significativamente mayor en los niños inicialmente deficientes en hierro y suplementados con hierro.

Tabla 5. Cambio en las concentraciones de retinol¹ después de la suplementación con zinc o hierro de acuerdo al estado nutricional inicial de los niños.

	Zinc	Hierro	Zinc+Hierro
<i>Estado nutricional de vitamina A</i>			
Deficientes ²	18.5 ± 8.5 ^a	17.1 ± 8.5 ^a	15.2 ± 5.7 ^a
Adecuados	-2.7 ± 11.4	4.3 ± 14.2	-5.3 ± 14.2
<i>Estado nutricional de zinc</i>			
Deficientes ³	7.4 ± 2.9 ^a	1.4 ± 22.8	10.9 ± 5.7 ^a
Adecuados	-1.4 ± 17.1	8.9 ± 14.2	-0.2 ± 8.5
<i>Estado nutricional de hierro</i>			
Deficientes ⁴	-4.2 ± 14.2	11.7 ± 11.4 ^a	8.2 ± 11.4 ^a
Adecuados	6.8 ± 14.2	5.1 ± 17.1	-7.3 ± 17.1

¹ $\bar{x} \pm DE$ ($\mu\text{g/dL}$)

² Definido como niños con concentraciones de retinol en plasma < 20 $\mu\text{g/dL}$.

³ Definido como niños con concentraciones de zinc en plasma < 70 $\mu\text{g/dL}$.

⁴ Definido como niños con concentraciones de ferritina en plasma < 12 $\mu\text{g/L}$.

^a significativamente diferente de niños con estado adecuado : $p < 0.05$

VI.5 Efecto de la suplementación en la prevalencia de deficiencia de vitamina A, zinc y hierro.

Después de la suplementación, la deficiencia de vitamina A se disminuyó en 94%, 82% y 78% en los grupos suplementados con hierro, zinc más hierro y zinc, respectivamente. La deficiencia de zinc se disminuyó en 42% y 56% en los grupos suplementados con zinc y zinc más hierro, respectivamente. La deficiencia de hierro se mejoró en 96% y 82% en los grupos suplementados con hierro y zinc más hierro, respectivamente. (Tabla 6).

	Placebo	Zinc	Hierro	Zinc + Hierro
<i>Retinol (% deficientes)</i>				
Inicio	28	23	34	33
Post-tratamiento	26	5	2	6
Cambio (%)	-7	-78	-94	-82
<i>Zinc (% deficientes)</i>				
Inicio	27	26	28	18
Post-tratamiento	27	15	21	8
Cambio (%)	0	-42	-25	-56
<i>Ferritina (% deficientes)</i>				
Inicio	57	43	49	55
Post-tratamiento	44	55	2	10
Cambio (%)	-23	0	-96	-82

VII. DISCUSION

En el presente estudio, se encontró que la suplementación con hierro, zinc y zinc más hierro, produjo un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas del retinol de los niños estudiados, y que el efecto fue mayor en los niños que inicialmente eran deficientes en zinc, hierro o vitamina A. La RBP y PA también se incrementaron significativamente al suplementar con hierro. En los grupos suplementados con zinc y zinc más hierro no hubo incremento significativo de la RBP ($p=0.15$), y de la PA hubo incremento significativo sólo en el grupo suplementado con zinc. Lo anterior muestra que la suplementación con hierro fue la que tuvo mayor efecto sobre las concentraciones de la vitamina A circulante y las proteínas relacionadas con su metabolismo. Este hallazgo es novedoso debido a que no existen evidencias previas del efecto de la suplementación con hierro sobre el metabolismo de la vitamina A.

En estudios previos llevados a cabo por otros investigadores, se ha encontrado que la suplementación con zinc tiene un efecto positivo en el estado nutricional de la vitamina A^{28,29} y sugieren una interacción metabólica entre los dos nutrientes. En otro estudio, Shingwekar y col²⁵ observaron un incremento altamente significativo del retinol plasmático y la RBP, al

suplementar con 40 mg de zinc/d, durante 5 días, niños de la India con desnutrición energética proteica (PEM). Antes de la suplementación los niños mostraban concentraciones plasmáticas muy disminuidas de vitamina A, zinc y RBP. Este efecto no lo encontraron en los niños sin PEM y que eran menos deficientes en zinc. Antes de la suplementación, sus concentraciones promedio de zinc, vitamina A, y RBP eran de 57.0 $\mu\text{g/dL}$, 12.5 $\mu\text{g/dL}$ y 20 mg/L, respectivamente, en los niños con PEM; y de 72.3 $\mu\text{g/dL}$, 15.2 $\mu\text{g/dL}$ y 21.9 mg/L, respectivamente, en el grupo sin PEM.

En otros estudios, llevados a cabo en poblaciones sin manifestaciones claras de deficiencia de zinc, no se encontró efecto de la suplementación con zinc en la vitamina A^{28,29}. Udomkesmalee y col²⁹ observaron que ni la vitamina A ni la RBP se elevaron significativamente en niños Tailandeses suplementados con 25 mg/d de zinc durante 6 meses. Los niños en ese estudio, tenían concentraciones iniciales de zinc y retinol en plasma de $86.3 \pm 9.1 \mu\text{g/dL}$ y $11.49 \pm 2.64 \mu\text{g/dL}$, respectivamente. Palin y col²⁸ informaron que la suplementación con zinc no mejoró los índices bioquímicos de la vitamina A en pacientes con fibrosis quística cuyo estado de zinc en plasma se encontraba dentro del intervalo normal.

Los estudios anteriores sugieren que la suplementación con zinc beneficia el metabolismo de la vitamina A, sólo cuando el estado de zinc es deficiente ($< 70 \mu\text{g/dL}$ de zinc en plasma)). Sin embargo Ette y col²² sugirieron que es posible aumentar la concentración de la vitamina A circulante en ratas recién destetadas con estado de nutrición adecuado mediante la suplementación con sulfato de zinc.

Los resultados del presente estudio, en que la suplementación con zinc mejoró significativamente las concentraciones de retinol plasmático y la RBP sufrió un ligero aumento (2 veces más que el grupo placebo), aunque no significativo ($p = 0.15$) (Tabla 3), concuerdan con lo encontrado por Husted y col²⁶ en un estudio de suplementación con niños prematuros del estado de Winsconsin a los cuales se les suplementó con una dosis de zinc intravenosa de $400 \mu\text{g/kg/d}$ durante 3 semanas. Al cabo de la primera semana de vida los niños elevaron significativamente sus concentraciones de vitamina A circulante; sin embargo, no mostraron cambio significativo en la concentración de RBP aún al cabo de los 21 días, aunque sí había diferencias de 3 veces más alto el valor de RBP en el grupo suplementado en comparación con el control. Al inicio de ese estudio, los niños no mostraban signos clínicos de deficiencia de zinc aunque sí un alto riesgo de adquirirlo.

Los niños del presente estudio, habitantes de una comunidad rural de México, tampoco mostraban signos clínicos de deficiencia de zinc ni de vitamina A al tiempo basal, sin embargo estaban en riesgo de deficiencia marginal de varios nutrimentos. Al inicio del estudio sus concentraciones promedio de zinc y retinol plasmáticos, estaban dentro de los intervalos normales (96.5 $\mu\text{g/dL}$ y 30.0 $\mu\text{g/dL}$, respectivamente). Sin embargo 29% de ellos tenían concentraciones bajas de retinol (<20 $\mu\text{g/dL}$), y 25% concentraciones bajas de zinc (<70 $\mu\text{g/dL}$). Las concentraciones promedio de RBP y PA estaban bajas (22.8 mg/L y 201.0 mg/L, respectivamente), en comparación a las encontradas en niños con estado adecuado de vitamina A (26-76 mg/L y 250-450 mg/L, respectivamente⁵⁴).

Una observación importante, aunque esperable, del presente estudio, fue que el efecto de la suplementación en las concentraciones de retinol (Tabla 5) fue significativamente mayor en los niños inicialmente deficientes en zinc o vitamina A, en comparación con los adecuados, lo cual sugiere que la interacción del zinc con la vitamina A depende del estado nutricional de ambos nutrimentos.

La asociación entre la vitamina A y el hierro se ha explicado por

medio de varios estudios de interrelación entre deficiencia de vitamina A y la presencia de anemia en seres humanos^{30,32, 38-42, 55-58} y ratas^{28,54}. Algunos estudios muestran que la suplementación con vitamina A mejora los indicadores bioquímicos del estado nutricional de hierro, tales como hierro en suero, transferrina, saturación de transferrina, hematocrito y hemoglobina; y sugieren que la vitamina A afecta el metabolismo del hierro^{38, 39, 42}. En algunos estudios con niños^{32, 40-42, 55,56} y mujeres embarazadas⁵⁷, se ha encontrado que las concentraciones de hemoglobina y ferritina en plasma, se correlacionaban con las concentraciones de retinol en plasma, y en algunos casos con la RBP y PA³⁹. Casi no existen estudios del efecto del hierro sobre la vitamina A. Sólo Mejia y col³⁸ han informado el efecto de la suplementación con hierro sobre las concentraciones de vitamina A circulante, en un estudio en el que suplementaron durante 2 meses niños anémicos de 1 a 8 años de edad, con 3 mg de hierro elemental /kg/d y no encontraron efecto positivo sobre las concentraciones del retinol en plasma. Inicialmente los niños de ese estudio no eran deficientes en vitamina A y su deficiencia de hierro era marginal. Hasta el momento no existen informes previos de suplementación con hierro en humanos y su efecto en las proteínas asociadas con el transporte de la vitamina A (la RBP y PA). Sin embargo, en una investigación preliminar llevada a cabo por otros

investigadores⁶⁰ con animales deficientes en hierro, se encontró una reducción significativa de las concentraciones plasmáticas de retinol, aún cuando las concentraciones de la vitamina en el hígado, eran normales y en algunos casos hasta incrementadas, lo cual sugiere que la deficiencia de hierro se interrelaciona con el transporte de la vitamina A. Asimismo, Staab y col³⁵ encontraron concentraciones de la vitamina significativamente más bajas, en el suero de ratas alimentadas con dietas bajas en hierro, en comparación con el de las alimentadas con dietas con alto contenido del mineral.

En el presente estudio con niños habitantes de una zona rural, con alta incidencia de deficiencia de hierro (51% con valores bajos de ferritina) y anemia (72% con valores bajos de hemoglobina), se encontró que la suplementación sólo con hierro o en combinación con zinc, mejoró el estado de la vitamina A, incrementando las concentraciones plasmáticas de retinol, RBP y PA, lo cual sugiere una interacción entre la deficiencia de hierro y el metabolismo de la vitamina A. El efecto de la suplementación sobre las concentraciones del retinol fue significativamente mayor en los niños que inicialmente eran deficientes en hierro o vitamina A. Más aún, los niños que inicialmente eran deficientes en zinc o hierro, tenían concentraciones promedio más bajas de retinol, en comparación la de los

niños que tenían estado adecuado ($25.4 \pm 10 \mu\text{g/dL}$ vs $31.0 \pm 17.0 \mu\text{g/dL}$, $p=0.04$ y $27.7 \pm 13.0 \mu\text{g/dL}$ vs $31.2 \pm 18.5 \mu\text{g/dL}$, $p=0.1$, respectivamente). Después de la suplementación se encontró una correlación significativa entre los incrementos de hemoglobina y RBP, ferritina y retinol, ferritina y RBP, hemoglobina y retinol, pero sólo en los niños que eran deficientes en hierro al inicio del estudio, lo cual reafirma que el estado de deficiencia es definitivo en la respuesta a la suplementación.

Los resultados encontrados en el presente estudio, son relevantes en virtud de que son los primeros informes de suplementación en seres humanos, que sugieren una interacción entre el hierro y el metabolismo de la vitamina A.

Comentario final

La coexistencia de la deficiencia marginal de vitamina A, con la deficiencia de zinc y hierro, entre otras, es áltamente frecuente en las poblaciones marginadas de México y del mundo entero, por lo que la atención al estado de un sólo nutrimento, puede no ser apropiado en los estudios y programas de suplementación para aliviar la deficiencia de uno

de ellos. En este estudio se demostró que la deficiencia de zinc o hierro, afecta el estado de vitamina A. Lo anterior podría ser una explicación del fracaso de algunos estudios de suplementación con sólo vitamina A para aliviar la deficiencia de la vitamina^{20, 61}. Asimismo, se requiere de más estudios para explicar el mecanismo preciso por el cual se interrelacionan estos nutrimentos.

VIII. CONCLUSIONES

- *La suplementación por 6 meses, con hierro o zinc o ambos, mejoró el estado de vitamina A, por medio de una elevación de las concentraciones plasmáticas de retinol, RBP y PA, de niños Mexicanos de una zona rural en alto riesgo de deficiencia marginal de micronutrientes.*
- *La suplementación con hierro tuvo mayor efecto sobre el estado de vitamina A, al incrementar en mayor magnitud tanto el retinol como la RBP y disminuir la deficiencia de vitamina A en 94%. La suplementación con zinc más hierro y zinc tuvieron un efecto positivo similar, aunque menor al de la suplementación sólo con hierro, al incrementar en menor magnitud la RBP y la PA, y disminuir la deficiencia de vitamina A en 82% y 78%, respectivamente.*
- *El efecto de la suplementación en las concentraciones de la vitamina A plasmática, fue mayor en los niños que inicialmente eran deficientes en zinc, hierro o vitamina A.*

- *La deficiencia de zinc disminuyó en 56%, 42% y 25% en los grupos suplementados con zinc más hierro, zinc y hierro, respectivamente.*
- *La deficiencia de hierro disminuyó en 96%, 82% y 0% en los grupos suplementados con hierro, zinc más hierro y zinc, respectivamente.*
- *La deficiencia de vitamina A, disminuyó en 94%, 82% y 78% en los grupos suplementados con hierro, zinc más hierro y zinc, respectivamente.*

ANEXO 1

GENERALIDADES SOBRE VITAMINA A Y ANTECEDENTES DE LA INTERACCIÓN DEL ZINC Y DEL HIERRO CON LA VITAMINA A

A1.1 Estructura, componentes y su presencia en los alimentos y el organismo^{62,63}

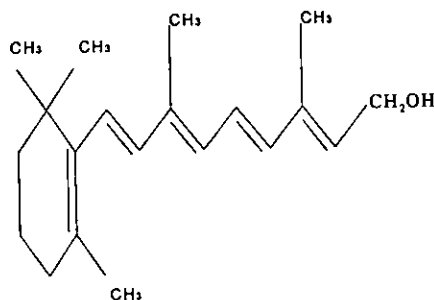


fig 1. estructura química de la vitamina A (retinol)

La vitamina A fue la primera de las vitaminas liposolubles que se descubrió. Su fórmula condensada es $C_{20}H_{29}OH$. Es un alcohol isoprenoide (fig 1), cuya cadena insaturada la hace lábil a reacciones de oxidación que pueden hacerle perder su actividad. Es fácilmente destruída por oxidación, luz ultravioleta, presencia de iones metálicos como el Fe y el Cu y por temperaturas altas. La vitamina A como alcohol primario

tiende a formar fácilmente ésteres (acetato y palmitato de vitamina A) y éteres que pueden usarse para su caracterización porque presentan mayor estabilidad que el alcohol libre.

Su actividad vitamínica no se circunscribe a una substancia sino a varias substancias afines que producen un efecto semejante en el organismo; así encontramos que existe un grupo de compuestos con gran afinidad estructural, que tienen actividad de vitamina A. Los que se encuentran en forma de retinol (vitamina A-alcohol) o ésteres de retinol (el más común es el ácido palmítico que hace más estable a la vitamina), son incoloros o con muy poca pigmentación y están presentes principalmente en alimentos de origen animal. Otras formas que tienen funciones fisiológicas específicas son su forma aldehído o retinal y ácido o ácido retinoico. La más abundante de las vitaminas preformadas es la 1-alcohol o retinol, y la 2,3-deshidroretinol..

Por su estructura molecular teóricamente son posibles 16 isómeros de los que se conocen 6, pero sólo 2 tienen importancia práctica: la todo-trans-retinol, que es la forma biológicamente más activa y el 13-cis-retinol, isómero generalmente llamado neovitamina A que tiene una actividad biológica relativa de aproximadamente 75%.

En los alimentos vegetales existen los llamados carotenos que poseen actividad vitamínica A y que son conocidos como provitaminas A o precursores de la vitamina A. Son pigmentos amarillos frecuentemente asociados con la clorofila y son responsables en alto grado del color de las verduras rojas y amarillas. Los animales y seres humanos no pueden sintetizarlos, pero pueden convertirlos en vitamina A mediante reacciones enzimáticas en la mucosa intestinal y en el hígado.

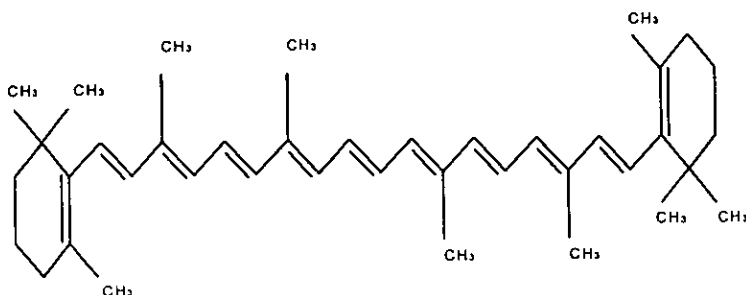


fig 2. estructura química del beta caroteno

Los carotenoides están presentes en cantidades substanciales en relativamente pocos alimentos, los cuales están sujetos a fluctuaciones estacionales. El beta caroteno (fig 2) es el precursor de vitamina A que posee la actividad vitamínica relativa más alta (100%), siguiéndole el alfa (50-54%) y gamma caroteno (42-50%), la beta criptoxantina (50-60%) y el beta zeacaroteno (20-40%).

Los seres humanos y los animales sólo pueden sintetizar vitamina A activa a partir de carotenos, y sólo en cierta proporción (5-50%), por lo que deben ingerirla en los alimentos en forma de vitamina A preformada (principalmente retinol y esteres de retinol) o precursores (principalmente beta-caroteno).

La vitamina A está presente en los tejidos humanos y en los fluidos fisiológicos en varias formas: como alcohol (retinol), aldehído (retinal), ácido (ácido retinoico) o como ester (retinil palmitato). En el suero o plasma del hombre y animales se encuentra principalmente como retinol y en el hígado como esteres de retinol.

A1.2 Fuentes de vitamina A en la alimentación en general y en la alimentación en las zonas rurales de México

Las fuentes naturales más ricas de vitamina A son los aceites de hígado de peces, el hígado y visceras de los animales, la leche y los productos lácteos elaborados con leche entera tales como la mantequilla, quesos y crema. Los alimentos vegetales como la zanahoria y verduras foliáceas verdes también son una fuente importante de carotenos que proporcionan gran parte del requerimiento de vitamina A al ser convertidos a vitamina A activa por el organismo.

Los carotenoides contenidos en los alimentos vegetales constituyen la principal fuente de vitamina A en los países en desarrollo, principalmente en las zonas rurales y áreas urbanas marginadas, donde la ingestión de alimentos de origen animal es baja. Para los preescolares de las zonas urbanas de México la leche entera, aunque no es una fuente importante de vitamina A (aprox 30 μg ER en 100 g), constituye el aporte más importante del total de la vitamina A ingerida (20.7%), seguida de la zanahoria (14.8 %) y el hígado (7.7%) (Rivera J y col, 1993. Datos sin publicar). En una encuesta de ingestión de alimentos de los preescolares de la comunidad rural del Valle de Solís en México, se encontró que la principal fuente de vitamina A es la leche pasteurizada y la leche cruda, seguida de los productos lácteos y las frutas y verduras (Allen LH y col, 1991. Datos sin publicar).

A1.3 Unidades y recomendaciones de ingestión de vitamina A (IDR) para la población Mexicana.

Inicialmente, la unidad para expresar el contenido de vitamina A, fue la Unidad Internacional (UI). Posteriormente se acordó que el nombre oficial de la vitamina A sea retinol, que la unidad para expresarla sea el microgramo equivalente (μg ER), en lugar del confuso sistema de

Unidades Internacionales; además de que se establecieron los factores de conversión para carotenos a retinol. De esta manera el factor de conversión para el beta caroteno a retinol es 6:1, por lo que 6 µg de beta caroteno = 1 µg de retinol = 1 equivalente de retinol. Para otras provitaminas (PVA), el factor es 12:1, por lo que 12 µg PVA carotenoides = 1 µg retinol = 1 equivalente de retinol. Y relacionando con el viejo sistema de unidades internacionales 1 µg ER = 3.3 UI

La ingestión diaria recomendada (IDR) de vitamina A por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ⁸, para los niños de 0 a 3 años es de 400 µg ER, 450 µg ER para niños de 4 a 6 años, 1000 µg ER para niños de 7 años hasta adultos, 800 µg ER para embarazadas y 1300 µg ER para mujeres lactantes. Estas cifras son una simplificación de las recomendadas por la FAO/OMS en 1965, de manera que sólo sean recordadas 3 cifras al expresarlas en µg ER

A1.4 Importancia de la vitamina A desde el punto de vista nutricional.

La importancia de tener un estado adecuado de vitamina A se deduce del análisis de las diversas funciones en que ésta participa en el organismo, así como de las consecuencias que su deficiencia provoca.

Las principales funciones de la vitamina A son la visión nocturna, la diferenciación celular y la morfogénesis^{62, 64}. El transporte activo de algunas sustancias y protones a través de la membrana es una función que sólo se ha observado en bacterias^{62,65}. Otros procesos fisiológicos más complejos como el crecimiento, reproducción y respuesta inmune, pueden afectarse a consecuencia de la deficiencia de la vitamina y su participación en los fenómenos descritos^{31,32,36}. La función biológica de la vitamina A en el ciclo visual es la única que ha sido bien establecida desde el punto de vista bioquímico por George Wald ganador del Premio Nobel en 1967^{66,67}.

Algunos estudios realizados en Centroamérica han mostrado una relación entre anemia y deficiencia de vitamina A en niños y adolescentes^{38,56}. Se han encontrado concentraciones bajas de vitamina A en la sangre de niños con diversas infecciones, sobretudo, las del tracto respiratorio superior¹⁴. Estas infecciones superimpuestas, pueden hacer descender las concentraciones de la vitamina en los tejidos, provocando un cuadro agudo de hipovitaminosis A en los niños. Algunos estudios muestran que la deficiencia de vitamina A afecta la absorción y movilización del hierro, provocando alteraciones en el transporte del oxígeno en los tejidos y produciendo limitaciones graves en la capacidad física del

individuo y alteraciones en las funciones mentales^{15,10}. Los niños con concentraciones bajas de vitamina A tienden a tener crecimiento más lento^{9,11} y a disminuir la eficiencia de su sistema inmunológico de defensa^{12,13}, además de alterar algunas funciones hepáticas e interferir en la utilización de otros micronutrientes⁶⁸.

A1.5 Metabolismo de la vitamina A^{62,63, 69-71}

La vitamina A o retinol preformado, los esterios de retinol y los carotenoides precursores de vitamina A, que se ingieren en la dieta, se dispersan y emulsifican en el estómago y a continuación pasan al duodeno, donde los retinil esterios son hidrolizados por acción de una lipasa pancreática no específica.

El retinol y el beta caroteno se solubilizan en micelas mezcladas, lo cual permite atravesar las microvellosidades de la membrana intestinal. La absorción del retinol y beta caroteno en el intestino se lleva a cabo probablemente por difusión pasiva.

Después de la absorción dentro de las células de la mucosa intestinal, el beta caroteno es hidrolizado por una dioxigenasa hasta retinaldehído, el cual se reduce subsecuentemente a retinol. La mayor parte del retinol se reesterifica con ácidos grasos de cadena larga, predominantemente ácido

palmítico y esteárico. Dos enzimas microsomales participan en este proceso, la lecitin: retinol aciltransferasa (LRAT) y la acil coenzima A:retinol aciltransferasa (ARAT). Posteriormente los esteres de retinol se incorporan a las lipoproteínas en la mucosa para ser transportados en la linfa con los quilomicrones. Los quilomicrones son transportados a través del sistema linfático vía el conducto torácico dentro del plasma. En el plasma, los quilomicrones toman apolipoproteínas específicas (apo C y apo E) de lipoproteínas plasmáticas de alta densidad. La apo C activa la enzima lipoprotein lipasa para hidrolizar los triglicéridos de los quilomicrones. Al final de este proceso se libera una partícula pequeña llamada remanente de quilomicron. Los retinil esteres se retienen casi por completo en el remanente de quilomicron. La apo E en el remanente de quilomicron es la responsable de la rápida incorporación de éstos en el hígado.

La captación hepática de los remanentes de quilomicron debe ocurrir probablemente a través de un receptor mediador de la endocitosis. Dentro de las células hepáticas, ocurre una degradación lisosomal de los remanentes junto con la hidrólisis de los retinil esteres. Después de esta hidrólisis, el retinol libre puede reesterificarse por LRAT o ARAT, hasta formar palmitato de retinol, principalmente.

La movilización de la vitamina A almacenada en el hígado, se lleva a cabo por una proteína específica del suero de aproximadamente 20,000 daltons, la proteína transportadora de retinol o RBP. La RBP humana contiene un sitio específico de unión para una molécula de retinol, y el complejo RBP-retinol viaja en la circulación en asociación con una molécula de prealbúmina (54,000 daltons) hacia los tejidos. Hasta la fecha se han encontrado cinco de estas proteínas específicas además de RBP, para el transporte del retinol en sus diferentes formas.

Los tejidos periféricos, como el tejido ocular, tienen receptores celulares de superficie específicos para el complejo RBP del suero que facilitan la captación de la vitamina A. En la translocación intracelular del retinol, probablemente participan proteínas celulares específicas de enlace.

A1.6 Interacción metabólica Zn - Vit A . Principales estudios que muestran el papel del zinc en el transporte de la vitamina A y su función.

Los primeros hallazgos que sugirieron la existencia de una relación metabólica entre el zinc y la vitamina A, surgieron hace poco más de medio siglo ⁷²⁻⁷⁶, cuando Patek y Haig en 1939⁷⁶ encontraron que ciertos pacientes cirróticos con dificultad de adaptación a la obscuridad, no

mejoraron a pesar de que se sometieron a terapia con vitamina A, lo cual sugirió que había otro factor involucrado. Asimismo, en otros estudios se demostró que los pacientes cirróticos tienen concentraciones reducidas de zinc en plasma, por lo que Vallee y col. en 1957⁷⁷ sugirieron que la baja respuesta a la suplementación con vitamina A de los pacientes cirróticos estudiados por Patek y Haig, se debió al estado de nutrición de zinc de los sujetos, el cual se encontraba alterado por este padecimiento. Los razonamientos que Vallee y col. sugerían para explicar una posible relación metabólica entre el zinc y la vitamina A, incluían lo siguiente: I) El zinc es una parte integral de la metaloenzima alcohol deshidrogenasa en el hígado del caballo, y años antes se había reportado que la enzima alcohol deshidrogenasa obtenida del hígado de caballo deshidrogenaba en forma reversible la vitamina A en su forma alcohol a vitamina A aldehído en los bastones de la retina así como en extractos de hígado. II) El ojo, el cual es un sitio activo del metabolismo de la vitamina A, es uno de los órganos con mayores concentraciones de zinc del cuerpo humano. III) Cerdos deficientes en zinc mostraron concentraciones bajas de vitamina A, y no respondieron a la terapia con vitamina A.

Años más tarde, Stevenson y Earle⁷⁸ observaron, casualmente, concentraciones bajas de vitamina A en el suero de cerdos con

parakeratosis, la cual es causada por deficiencia de zinc en la dieta. Y cuando a estos cerdos se les suministraron dosis masivas de vitamina A, los niveles de ésta en el suero no se normalizaron.

Sarawswat y Arora en 1972⁷⁹, observaron que corderos deficientes en zinc y vitamina A sólo respondieron a la terapia con vitamina A después de suplementarlos con zinc. Esta observación sugirió un papel regulatorio del zinc en el metabolismo de la vitamina A. En un estudio clásico, JC Smith y col. ¹⁷ confirmaron la observación anterior usando un modelo experimental con ratas. Ellos mostraron que la deficiencia de zinc se acompañó con concentraciones bajas de vitamina A en plasma. Más aún, cuando las ratas deficientes en ambos nutrientes se suplementaron con sólo vitamina A, se produjo una acumulación de la vitamina en el hígado y las concentraciones en el plasma permanecieron bajas. La suplementación con zinc y vitamina A en los animales doblemente deficientes (tanto en zinc como en vitamina A) produjo no sólo una elevación significativa de la concentración de vitamina A en el plasma sino que también no hubo una elevación anormal de la vitamina almacenada. En un experimento subsecuente⁸⁰ ellos demostraron que las concentraciones de RBP en el hígado y el plasma de ratas deficientes en zinc eran más bajas que el de las ratas con estado adecuado de zinc,

sugiriendo que en un estado de deficiencia de zinc hay un deterioro en el sistema de transporte de la vitamina A. Basados en estas observaciones y en estudios adicionales llevados a cabo por el mismo investigador, se ha postulado que el defecto metabólico producido por la deficiencia de zinc, es el fracaso en la movilización de la vitamina A del hígado. Sin embargo, este concepto ha sido seriamente cuestionado por el trabajo de Carney y col.⁸¹. En un estudio controlado con ratas usando alimentación por pares, ellos mostraron que la deficiencia de zinc no produjo acumulación de la vitamina A hepática. Más aún, usando retinil acetato marcado con tritio demostraron que la deficiencia de zinc no tuvo efecto en la movilización de la vitamina A. La excreción urinaria de vitamina A tampoco se alteró. Ellos concluyeron que la baja concentración de vitamina A en plasma observada en los animales deficientes en zinc, no es un efecto directo de la disminución o falta de zinc, sino más bien el resultado del retraso en el crecimiento.

Se sabe que en presencia de deficiencia de zinc hay una reducción significativa de la ingestión de alimentos y del crecimiento. En efecto, en el trabajo de Smith y col.¹⁸, pudo observarse que la restricción severa del alimento en ratas hasta el punto de retrasar el crecimiento, puede conducir en algunos de los animales, a una disminución de la vitamina A en el

plasma de la misma magnitud que la observada en el caso de depleción de zinc. Duncan y Hurley²³, estudiaron la interacción zinc-vitamina A en ratas embarazadas y en fetos. Los resultados sugirieron que aunque la deficiencia de zinc no produjo una acumulación significativa de la vitamina en el hígado, sí hubo una interrelación significativa entre el zinc y la vitamina A, lo cual no se relacionó con el retraso en el crecimiento sino muy probablemente con un deterioro en la movilización de la vitamina A.

Resumiendo, los resultados existentes tan controversiales no permiten definir si la deficiencia de zinc tiene un efecto directo o indirecto en el transporte de la vitamina A. Estos resultados tan conflictivos probablemente están relacionados al hecho de que ambas deficiencias tanto de zinc como de vitamina A, se afectan en forma similar por otros factores generados por una disminución en la ingestión del alimento. Por ejemplo, se ha demostrado que la cantidad y la calidad de la proteína en la dieta puede afectar significativamente la síntesis de RBP²¹. Aunque el zinc no es un constituyente de la RBP, se sabe que el zinc es un elemento esencial para la síntesis de RNA, y como consecuencia de la deficiencia de zinc, se podría afectar la síntesis de proteínas en general. Lo que sí es confirmado en muchos estudios, es que la deficiencia de zinc conduce a una disminución de las concentraciones de RBP, esto podría significar que

la síntesis de RBP podría ser particularmente sensible a la carencia del mineral.

Sin embargo, es a partir de la década de los 70's cuando se han obtenido más datos que apoyan o soportan el concepto de la interacción entre el zinc y la vitamina A mediante el diseño de estudios de suplementación con humanos.

En niños con desnutrición energético proteica severa (PEM) y suplementados con proteínas, se ha observado un aumento significativo de las concentraciones de vitamina A y RBP^{61, 82, 83}. Los niños con PEM a menudo también son deficientes en zinc, y aunque en este caso el déficit de proteínas es la principal causa de las bajas concentraciones de RBP, la deficiencia de zinc podría ser también un factor contribuyente. Los datos de Shingwekar y col.²⁵ apoyan esta hipótesis. En su estudio, niños deficientes en vitamina A, con estado relativamente adecuado de proteínas y energía y niños con edematosis severa tipo PEM, se suplementaron con zinc por un período corto de tiempo. Los resultados mostraron una elevación significativa de la vitamina A y RBP en el plasma sólo de los niños con PEM y no en los niños con estado adecuado de proteínas. Con base en estas consideraciones, un mecanismo lógico por

el cual la deficiencia de zinc afecta el transporte de la vitamina A es a través de una acción indirecta en la síntesis de proteínas. En términos prácticos, la información existente sugiere que cuando se trata la deficiencia de vitamina A, particularmente en los niños desnutridos, no sólo debe considerarse su estado de proteínas sino también de zinc.

Otro aspecto de la interrelación entre el zinc y la vitamina A, está relacionado con el proceso de óxido-reducción de la vitamina A en forma de alcohol (retinol) a nivel de tejido. Durante el metabolismo de la vitamina A, el retinol se interconvierte a retinal, para lo cual se requiere de la enzima específica alcohol deshidrogenasa, conocida como retinol deshidrogenasa. En los tejidos de los mamíferos, varias alcohol deshidrogenasas son zinc-metaloenzimas, ésto es, requieren zinc para una actividad enzimática apropiada. Esta función es muy importante en ciertos tejidos tales como la retina, donde, como parte del ciclo visual, el retinol se convierte a retinal. Morrison y col.²⁷ observaron que pacientes con cirrosis alcohólica y adaptación anormal a la obscuridad, respondieron a la suplementación con zinc con una adaptación normal a la obscuridad. En su estudio, la suplementación con zinc no produjo elevación de la RBP plasmática. Considerando que el retinol debe ser constantemente suplido a los bastones para una visión normal, los autores concluyeron que el efecto de la

suplementación con zinc fue mejorar la actividad de la alcohol deshidrogenasa en la retina.

Los resultados, principalmente con animales, indican que la deficiencia de zinc puede alterar el metabolismo de la vitamina A, no sólo por la acción directa o indirecta en la movilización de la vitamina A del hígado hacia los tejidos, sino también alterando la óxido-reducción de la vitamina A en la retina, testículos, y probablemente también en otros tejidos.

AI.7 Interacción hierro- vitamina A.

La asociación entre la vitamina A y el hierro se ha explicado por medio de varios estudios de interrelación entre deficiencia de vitamina A y la presencia de anemia en ratas³³⁻³⁵ y seres humanos^{31,32}, en los que se sugiere que la vitamina A regula la liberación del hierro del hígado hacia el plasma y tejidos, por lo que en caso de deficiencia de vitamina A se afecta esta liberación y las concentraciones de hierro en suero disminuyen, provocándose anemia, aún con ingestión y reservas adecuadas de hierro. Existen varias explicaciones para lo anterior, una posible es la existencia

de una malformación de la membrana de los eritrocitos como consecuencia de la deficiencia de vitamina A (la cual es necesaria para la síntesis normal de la membrana), lo cual podría dar como resultado una fragilidad anormal y una disminución de la vida media de la membrana, provocándose anemia hemolítica. Esta teoría es la más popular, aunque existen otros estudios⁸⁴ que ponen en duda que el mecanismo anterior explique la asociación entre la vitamina A y el hierro. Hasta el momento el mecanismo preciso de esta asociación no se conoce.

Wolde-Gebriel y col.⁵⁵, por medio de asociaciones del estado nutricional, encontraron una asociación significativa entre la hemoglobina en sangre con el retinol en suero, y entre la hemoglobina y la ferritina en el suero de niños con anemia y deficiencia clínica de vitamina A. En un estudio con madres embarazadas de West Java, Indonesia⁵⁷ y otros estudios^{38, 39, 42}, se encontró una relación similar entre el retinol y la hemoglobina.

En estudios epidemiológicos con niños^{32, 40-42, 55, 56} y adultos⁵⁷ se ha encontrado una clara asociación entre la ferritina en suero y las concentraciones de retinol. Sin embargo, en un estudio con niños anémicos, la ferritina no correlacionó con el retinol³⁷. Martín Bloem y col.⁴² encontraron una asociación significativa entre la hemoglobina y la

RBP y entre la hemoglobina y la PA en niños tailandeses con deficiencia crónica de vitamina A. En estos estudios se prueba que el estado nutricional de los sujetos, influye en la asociación entre los índices bioquímicos.

Casi no existen estudios con hierro y su efecto en la vitamina A. Sólo Mejía y col.³⁸, han reportado el efecto de la suplementación con hierro sobre las concentraciones de vitamina A circulante en seres humanos. Ellos no encontraron efecto significativo de la suplementación sobre las concentraciones de retinol en el suero de niños anémicos, pero con estado adecuado de vitamina A y sólo marginalmente deficientes en hierro. Staab y col.³⁴, encontraron concentraciones de vitamina A en suero, significativamente más bajas, en grupos de ratas alimentadas con dietas bajas, en comparación con las alimentadas con dietas altas en hierro. Asimismo, Rosales y Beard⁶⁰, encontraron una reducción significativa de las concentraciones del retinol en suero de ratas deficientes en hierro, aún cuando las concentraciones de la vitamina en el hígado eran normales, y en algunos casos hasta incrementadas; lo cual sugiere que la deficiencia de hierro está interrelacionada con el transporte de la vitamina A a través de un mecanismo aún no conocido.

ANEXO 2

ANEXO 2

DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS INDICADORES BIOQUÍMICOS.

A2.1 ZINC EN PLASMA.

Principio

La muestra líquida, conteniendo zinc, se aspira en el espectrofotómetro y se evapora por medio de la flama de acetileno/O₂. Los átomos de zinc en estado libre, absorben cierta cantidad, proporcional a su concentración, de la energía luminosa de una longitud de onda específica, que se hace incidir sobre ellos. La concentración de zinc en las muestras se calcula al comparar su absorción con la de los estándares de la curva de referencia mediante el método de regresión lineal.

Reactivos

- Solución estándar de zinc [5.0 mg/L] (Sigma Chemical Co. St.Louis,Mo)
- Suero control para zinc (Centers for Disease Control. US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA).

- Glicerol al 5%
- Acido clorhídrico al 1%
- Agua desionizada
- Acido nítrico al 3%

Equipo

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Mod.2380 (Perkin-Elmer Corp. Norwalk, CT).

Condiciones espectrofotométricas.

Longitud de onda = 213.9 nm, slit = 0.7nm

i (lámpara) = 15 mA

flujo de la flama acetileno / O₂ (%) = 24/44

Procedimiento

Las muestras de plasma se diluyeron 1:5 con la solución de ácido clorhídrico. Del estándar de zinc se hicieron varias diluciones (0.25 a 1.0 mg/L) con la solución de glicerol en ácido clorhídrico. Se preparó un blanco con agua, ácido clorhídrico y glicerol, en la mismas proporciones que la de los estándares. Las muestras y los estándares se aspiraron y evaporaron en el espectrofotómetro y se registró su absorbancia. La cuantificación se

hizo por comparación con la curva estándar de referencia y el método de regresión lineal.

Observaciones.

Para evitar posibles contaminaciones por zinc externo a las muestras, todo el material utilizado se purgó previamente en solución de ácido nítrico al 3% y se enjuagó con agua desionizada. Sólo se utilizó agua desionizada tanto para la preparación del blanco como para las soluciones y diluciones. Se evitó utilizar material de goma o caucho que contaminan con zinc. En esta determinación es importante que al separar el plasma, no se hemolice los glóbulos rojos porque se puede alterar el resultado de zinc en la muestra y dar valores excesivamente altos.

A2.2 FERRITINA.

Principio.

La prueba se basa en un ensayo inmunoradiométrico en fase sólida, con anticuerpos antiferritina monoclonales inmovilizados en las paredes de un tubo de poliestireno, y anticuerpos antiferritina policlonales marcados con ^{125}I en fase líquida. La ferritina contenida en el plasma, en una reacción inmunoquímica, queda atrapada en el tubo de ensayo, entre las partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos monoclonales y el anticuerpo policlonal marcado radioactivamente. El anticuerpo marcado radioactivamente que no se unió, se elimina por decantación y lavados sucesivos, lo cual reduce al máximo uniones no-específicas, y asegura excelente precisión. La concentración de ferritina es directamente proporcional a la radioactividad final presente en el tubo, la cual se mide en un contador de partículas gamma. La ferritina se cuantifica al comparar las cuentas por minuto, con las obtenidas en los estándares de la curva de calibración.

Equipo

Se utilizó un Contador gamma automático Mod. Cobra Quantum (Packard Instrument Company. Meriden, CT).

Reactivos

- Kit "Coat-A-Count Ferritin IRMA" (Diagnostic Products Corp. Los Angeles, CA) conteniendo:
- tubos de poliestireno recubiertos con anticuerpos antiferritina monoclonales
- reactivo liofilizado de anticuerpos policlonales marcados con ^{125}I
- estándares líquidos de ferritina [0-2000 $\mu\text{g/L}$]
- sol. buffer para ferritina
- sol. de lavado para ferritina (sol. salina con surfactantes y azida de sodio)
- suero control humano de ferritina, nivel 1, 2 y 3 [342.7, 112.3 y 37.3 $\mu\text{g/L}$, respectivamente] (Lyphochec, Bio-Rad Lab. Anaheim, CA)

Procedimiento.

Dentro de los tubos de ensayo se pipetearon por duplicado $10\mu\text{L}$ de cada uno de los estándares de ferritina, o del suero control, o de las muestras de plasma. Se adicionaron $200\mu\text{L}$ del buffer. Se agitó por 30 min en agitador mecánico. Se decantó y lavó con 2 mL de la solución de lavado. Se adicionaron $100\mu\text{L}$ de la solución del anticuerpo policlonal marcado con ^{125}I . Se agitó por 30 min. Se decantó y lavó con 2 mL de

la solución de lavado. Se midieron las cuentas por 1 minuto en el contador gamma.

Observaciones

Esta prueba debe manejarse con las precauciones requeridas para todo ensayo en el que se maneje radioactividad.

A2.3 VITAMINA A (RETINOL).

Principio

La vitamina A en forma de retinol y otros compuestos presentes en el plasma, tales como otras vitaminas liposolubles, se extraen con hexano. Por cromatografía de líquidos de alta resolución se separa la vitamina A de los otros compuestos por diferencias de polaridad al pasar la muestra por la columna y ser arrastrada por la fase móvil. La vitamina se detecta por su absorbancia y su concentración se determina por el área bajo el pico correspondiente en comparación con la de los estándares de la curva de referencia.

Equipo

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Water's a base de módulos equipado con el sistema Millenium 2010, una bomba isocrática M-45 y un detector de arreglo de diodos 996 (Millipore Corp. Milford, MA).

Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC*
- Cloruro de dietileno grado HPLC*
- Metanol grado HPLC*
- n-Butanol grado HPLC*
- Isopropanol grado HPLC*
- Hexano grado HPLC*
- Sol. estándar de retinil miristato (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) en metanol [2 - 5 ng/μL]*
- Sol. estándar de retinol (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) en metanol [2-5 ng/μL]*
- Suero control de vitamina A (retinol), nivel bajo, medio y alto [34.5, 45.5 y 62.5 μg/dL, respectivamente] (Standard Reference Materials, NIST, Gaithersburg, MD)*

Condiciones cromatográficas.

Se utilizó una columna Water's Resolve C-18, 3.9 x150 mm. 5 µm (Millipore Corp. Milford, MA) y una fase móvil isocrática de acetonitrilo: cloruro de dietileno: metanol: n-butanol (90: 15 : 10 : 0.1) a un flujo de 1 mL/ min. La detección de la vitamina se hizo por su absorbancia a 300 nm.

Procedimiento.

Extracción y cuantificación de la vitamina A

En un tubo de ensayo se colocaron 100 µL de plasma y 50 µL de la solución del estándar interno de retinil miristato. Se añadieron 200 µL de metanol para desproteinizar y se hicieron tres extracciones subsecuentes de la vitamina, cada una, con aproximadamente 500µL de hexano y agitación en un vortex durante 1 minuto a la máxima velocidad. Se centrifugó a 3000 rpm por 1 minuto y las 2 fases formadas se separaron mediante la ayuda de una pipeta Pasteur. Los extractos orgánicos se juntaron en otro tubo y se evaporaron con corriente de nitrógeno hasta sequedad. Se reconstituyó inmediatamente con 50µL de isopropanol. Se inyectaron 20 µL por duplicado en el cromatógrafo de líquidos. La detección de la vitamina se hizo por su absorbancia a 300 nm. La cuantificación se hizo por comparación con la curva estándar de referencia

de retinol corrida bajo las mismas condiciones en el intervalo de 5 a 50 ng aproximadamente, y el metodo de regresión lineal . La concentración de la vitamina en las muestras se ajustó mediante el porcentaje de recuperación del estándar interno añadido.

Observaciones

La extracción y cuantificación de la vitamina en las muestras se hizo el mismo día para evitar pérdida de actividad . Durante la extracción las muestras se protegieron de la luz directa y de temperaturas altas. La concentración de la solución estándar de retinol en metanol se leyó 2 veces por semana mediante su espectro de absorción y su coeficiente de extinción molar a 325 nm, y de ser necesario se ajustó su concentración. Todos los reactivos utilizados para el cromatógrafo, redisolución de las muestras y preparación de los estándares fueron grado HPLC.

A2.4 PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE RETINOL (RBP) Y PREALBÚMINA (PA).

Principio.

Las proteínas (antígeno) contenidas en el suero humano, en una reacción inmunoquímica con anticuerpos específicos, forman inmunocomplejos en forma de precipitados. Las concentraciones existentes pueden ser determinadas cuantitativamente mediante la medición de la luz difundida en el nefelómetro en comparación con la curva estándar de referencia.

Equipo

Se utilizó el Nefelómetro láser de Behring (Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ).

*Reactivos **

- Suero N estándar de proteína humano [30 mg /dL PA, 44 mg/L RBP]*
- Suero N/T control de proteína humano [32 mg/dL PA, 44 mg/L RBP]*
- Antisuero N contra RBP humana*

- Antisuero N contra PA humana
- Diluyente N (solución de cloruro de sodio tamponada con fosfato)

* todos los reactivos utilizados fueron proporcionados por Behring (Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ).

Procedimiento

Las muestras de plasma y el suero control se diluyeron 1:10 con la solución isotónica de cloruro de sodio . Del suero estándar de proteína humano se prepararon una serie de diluciones geométricas con la solución isotónica del cloruro de sodio (1:2.5 a 1:80).

En cada una de las celdas del nefelómetro, se colocaron por separado 100 μL de las muestras de plasma y del suero control previamente diluidos, así como de cada una de las diluciones del suero estándar. Se agregaron 200 μL del antisuero correspondiente previamente diluido 1:5 con la solución isotónica de cloruro de sodio. Se agitó suavemente. Se dejó en reposo un tiempo de reacción de 60 min. La detección de las proteínas se hizo mediante la medición de la luz dispersa en el nefelómetro. La cuantificación de las proteínas se hizo por comparación con la curva estándar de referencia correspondiente.

Observaciones

El tiempo de reacción es recomendable aumentarlo a 60 min en lugar de 30 min como recomiendan en el método, ya que de esta manera la lectura se efectúa cuando la luz difundida es máxima, la reacción termina y se alcanza el estado de equilibrio.

Las muestras de plasma, así como los antisueros almacenados muchas veces muestran enturbiamiento que puede alterar los resultados, especialmente en la zona de valores bajos. Los sueros turbios deben ser centrifugados y los sueros lipémicos deben ser clarificados, o bien meter un blanco de cada uno sin el antisuero y restar la lectura. Los antisueros turbios se recomienda pasarlos a través de un filtro desechable con un diámetro de poro de 0.45 μm .

A2.5 PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP).

Principio

Las partículas de poliestireno recubiertas de anticuerpos contra la CRP, se aglutinan al mezclarse con las muestras de sueros que contienen CRP. Las concentraciones existentes pueden ser determinadas cuantitativamente mediante la medición de la luz difundida en el nefelómetro en comparación con la producida por los estándares de concentración conocida de la curva de referencia.

Equipo

Se utilizó el Nefelómetro láser de Behring (Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ)

Reactivos.*

- Kit Latex NA-CRP (OUSV 04/ 05)(Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ)*
- Reactivo N-CRP(liofilizado de partículas de poliestireno recubiertas de anticuerpos contra la CRP)*
- Suero estándar de proteína N-CRP humano [16 mg/L]*
- Suero control de proteína N/T-CRP humano [25 mg/L]*

-Acelerador N-ASL/CRP(solución de cloruro de sodio tamponada con fosfato)

-DiluyenteN

-Tampón N

** tanto el kit como demás reactivos fueron proporcionados por Behring (Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ)*

Procedimiento

Las muestras de plasma y el suero control se diluyeron 1:400 con el diluyente N. Del suero estándar de proteína se prepararon una serie de diluciones geométricas con el diluyenteN (1:40 a 1:2560).

En cada una de las celdas del nefelómetro, se colocaron 40 μ L del reactivo N-CRP, 50 μ L de cada una de las muestras diluidas, o del estándar, o del control. Se agregaron 60 μ L del reactivo tampón, 10 μ L del acelerador y nuevamente 60 μ L del tampón. Se agitó suavemente y se dejó en reposo un tiempo de reacción de 6 min. La detección de la proteína se hizo mediante la medición de la luz dispersa en el nefelómetro. La cuantificación de la proteína se hizo por comparación con la curva estándar de referencia.

Observaciones

Las muestras turbias o que contienen partículas pueden alterar la prueba, por ello las muestras de plasma se centrifugaron previamente 10 min a 15000 G aproximadamente, y se conservaron en hielo. Las muestras intensamente lipémicas que no se clarificaron mediante centrifugación, se excluyeron de la prueba.

LX. BIBLIOGRAFÍA

1. Rosado JL, Bourges H, Saint-Martin B. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: I. Deficiencia de minerales. *Salud Pública Mex* 1995;37:130-9.
2. Rosado JL, Bourges H, Saint-Martin B. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: II. Deficiencia de vitaminas. *Salud Pública Mex* 1995;37:452-61.
3. Madrigal HF, Chávez A, Moreno-Terrazas O, y col. Consumo de alimentos y estado nutricional de la población en el medio rural Mexicano. *Rev Inv Clin Supl.* 1986;38:9-19.
4. Murphy SP, Beaton GH, Calloway DH. Estimated mineral intakes of toddlers: predicted prevalence of inadequacy in village populations in Egypt, Kenya, and Mexico. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:562-72.
5. Allen LH, Rosado JL, Casterline JE, López P, Muñoz EC, Martínez H. Lack of hemoglobin response to iron supplementation in anemic Mexican preschoolers with multiple micronutrient deficiencies. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1485-94
6. Calloway DH, Murphy SP, Beaton GH, Lein D. Estimated vitamin intakes of toddlers: predicted prevalence of inadequacy in village populations in Egypt, Kenya, and Mexico. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:376-84

7. Rosado JI, López P, Morales M, Muñoz EC, Allen LH. Bioavailability of energy, nitrogen, fat, zinc, iron and calcium from rural and urban Mexican diets. *Br J Nutr* 1992; 68:45-58.
8. Bourges H, Morales J Ed. Ingestión diaria recomendada de energía, proteína, vitaminas y minerales para la población mexicana. Disco compacto multimedia interactivo de las tablas de composición de alimentos mexicanos. Instituto Nacional de la Nutrición SZ, 1999.
9. Allen LH. Nutritional influences on linear growth: a general review. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48 suppl 1:75-89.
10. Ronaghy H, Spivey Fox MR, Garn SM, Israel H, Harp A, Moe PG, Halsted JA. Controlled zinc supplementation for malnourished school boys: A pilot experiment. *Am J Clin Nutr* 1969;22:1279-89.
11. Rosado JL. Separate and joint effect of micronutrient deficiencies on linear growth. *J Nutr* 1999;129:531S-3S.
12. Tomkins A, Behrens R, Roy S. The role of vitamin A and zinc deficiency in diarrhoeal syndromes in developing countries. A review. *Proc Nutr Soc* 1993; 52(1):131-42.
13. Rosado JI, López P, Muñoz EC, Martínez H, Allen LH . Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:13-9.
14. Arroyave G, Calcano C. Descenso de los niveles séricos de retinol y de

- su proteína de enlace (RBP) durante las infecciones. *Arch Lat Nutr* 1979; 29:233-60.
15. Sandstead HH, Penland JG, Alcock NW, Dayal HH, Chen XC, Li JS, Zhao F, Yang JJ. *Am J Clin Nutr* 1998;68 (suppl) 470S-5S.
 16. Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Engl J Med* 1991;325:687-94.
 17. Smith JC Jr, McDaniel EG, Fan FF, Halsted JA. Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism. *Science* 1973; 181:954-5.
 18. Smith JC Jr, Brown ED, McDaniel EG, Chan W. Alterations in vitamin A metabolism during zinc deficiency and food and growth restriction. *J Nutr* 1976; 106:569-74.
 19. Brown ED, Chan W, Smith JC Jr. Vitamin A metabolism during the repletion of zinc deficient rats. *J Nutr* 1976; 106:563-8.
 20. Mobarhan S, Greenberg B, Mehta R, Friedman H, Barch D. Zinc deficiency reduces hepatic cellular retinol-binding protein in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1992; 62(2):148-54.
 21. Glover J, Muhilal H. Nutritional factors affecting the biosynthesis of retinol-binding protein in the liver and its release into plasma. *Int J Vitam Nutr Res* 1976; 46:239-43.
 22. Ette SI, Basu TK, Dickerson JWT. Short-term effects of zinc sulfate on plasma and hepatic concentrations of vitamin A and E in normal weanling rats. *Nutr Metab* 1979; 23:11-6.

23. Duncan JR, Hurley LS. An interaction between zinc and vitamin A in pregnant and fetal rats. *J Nutr* 1978;108:1432-8.
24. Baly DL, Golub MS, Gershwin ME, Hurley LS. Studies of marginal zinc derivation in Rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr* 1984;40:199-207.
25. Shingwekar AG, Mohanram M, Reddy V. Effect of zinc supplementation on plasma levels of vitamin A and retinol-binding protein in malnourished children. *Clin Chim Acta* 1979; 93:97-100.
26. Hustead VA, Greger JL, Gutcher GR. Zinc supplementation and plasma concentration of vitamin A in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 1017-21.
27. Morrison SA, Russell RM, Carney EA, Oaks EV. Zinc deficiency: a cause of abnormal dark adaptation in cirrhotics. *Am J Clin Nutr* 1978; 31: 276-81.
28. Palin D, Underwood BA, Denning CR. The effect of oral zinc supplementation on plasma levels of vitamin A and retinol-binding protein in cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1979; 32:1253-9.
29. Undomkesmalee E, Dhanamitta S, Sirisinha S, Charoenkiatkul S, Tuntipopipat S, Banjong O, Rojroongwasinkul N, Kramer TR, Smith JC Jr. Effect of vitamin A and zinc supplementation on the nutriture of children in Northeast Thailand. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 50-7.

30. Chávez A, Mata A, Sandoval J. Evaluación del enriquecimiento del azúcar con hierro y vitaminas. *Rev Inv Clin* 1985; 38:175-86.
31. Blackfan KD, Wolbach SB. Vitamin A deficiency in infants. A clinical and pathological study. *J Pediat* 1933; 3:679-706.
32. Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JE, Wallace DL, Rucker RB, Mejía LA, Mohanram M. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 1978; 31:876-85.
33. Mejía LA, Hodges RE, Rucker RB. Role of vitamin A in the absorption, retention and distribution of iron in the rat. *J Nutr* 1979; 109:129-37.
34. Staab DV, Hodges RE, Metcalf WK, Smith JL. Relationship between vitamin A and iron in the liver. *J Nutr* 1984 ;114:840-4.
35. Sijtsma KW, Van den Berg GJ, Lemmens AG, West CE, Beynen AC. Iron status in rats fed diets containing marginal amounts of vitamin A. *Br J Nutr* 1993;70: 777-85.
36. Muhilal, Permaesih D, Idjradinata YR, Muherdiyantiningsih, Karyadi D. Vitamin A-fortified monosodium glutamate and health, growth, and survival of children: a controlled field trial. *Am J Clin Nutr* 1988; 48:1271-6.
37. Mejía LA, Arroyave G. Lack of direct association between serum transferrin and serum biochemical indicators of vitamin A nutriture. *Acta Vitaminol Enzymol* 1983; 5:179-84.

38. Mejía LA, Chew F, Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. *Am J Clin Nutr* 1988;48:595-600.
39. Bloem MW, Wedel M, Egger RJ, Speek AJ, Schrijver J, Saowakontha S, Schreurs WHP. Iron metabolism and vitamin A deficiency in children in Northeast Thailand. *Am J Clin Nutr* 1989;50:332-8.
40. Mohanran M, Kulkarni KA, Reddy V. Hematological studies in vitamin A deficient children. *Int J Vitam Nutr Res* 1977;47:389-93.
41. Mejía LA, Arroyave G. The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *Am J Clin Nutr* 1982;36:87-93.
2. Bloem M W, Wedel M, van Agtmaal EJ, Speek AJ, Saowakontha S, Schreus WHP. Vitamin A intervention: short term effects of a single, oral massive dose on iron metabolism. *Am J Clin Nutr* 1990; 51:76-9.
43. Allen LH, Rosado JL, Casterline JE, Martínez H, López P, Muñoz EC. Vitamin B 12 deficiency and malabsorption are highly prevalent in rural Mexican communities. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1013-9.
44. Rosado JL, Muñoz EC, López P, Allen LH. Absorption of zinc sulfate, methionine, and polyascorbate in the presence and absence of a plant-based rural Mexican diet. *Nutr Res* 1993; 13:1141-51.
45. Smith JC, Butrimovitz GP, Purdy WC. Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem* 1979; 25:

1487-91.

46. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry*. Perkin-Elmer, 1982.
47. Coat A- Count. Ferritin IRMA. Método in vitro para la determinación cuantitativa de ferritina en suero ó plasma mediante un radioinmunoensayo en fase sólida. Diagnostic Products Corp los Angeles, CA .
48. Catignani GL. An HPLC Method for the simultaneous determination of retinol and alpha tocopherol in plasma or serum. *Methods Enzymol* 1986; 123:215-19.
49. Catignani GL, Bieri JG. Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem* 1983; 29:708-12
- 50 Barua AB, Furr HC, Janick-Buckner D, Olson JA. Simultaneous analysis of individual carotenoids, retinol, retinyl esters and tocopherols in serum by isocraticnon-aqueous reversed-phase HPLC. *Food Chem* 1993;46:419-24.
51. Behring Diagnostics Inc Somerville,NJ. Método in vitro para la determinación cuantitativa de seroproteínas humanas en la nefelometría láser. Edición septiembre 1989.
- 52 Behring Diagnostics Inc Somerville,NJ. Método in vitro para la determinación cuantitativa de CRP en el suero o en el plasma humanos

mediante la nefelometría reforzada con partículas látex. Edición enero 1991.

53. SAS Institute Inc. *SAS User's Guide: statistics*, 5th edition. Cary, NC: SAS Institute Inc 1985.
54. Gibson RS. *Principles of nutritional assessment*. New York: Oxford University Press, 1990.
55. Wolde -Gebriel Z, West CE, Gebru H, Tadesse A-S, Fisseha T, Gabre P, Aboye Ch, Ayana, Hautvast J. Interrelationships between vitamin A, iodine and iron status in schoolchildren in Shoa Region, Central Ethiopia. *Br J Nutr* 1993; 70:593-607.
56. Mejía LA, Hodges RE, Arroyave G, Viteri F, Torun B. Vitamin A deficiency and anemia in Central American children. *Am J Clin Nutr* 1977; 30:1175-84.
57. Suharno D, West CE, Muhilal, Karyadi D, Hautvast JGAJ. Cross sectional study of the iron and vitamin A status of pregnant women in West Java, Indonesia. *Am J Clin Nutr* 1992;56:988-93.
58. Semba RD, Muhilal, West KP Jr. Impact of vitamin A supplementation on hematological indicators of iron metabolism and protein status in children. *Nutr Res* 1992; 12:469-78.
- 59 Roodenburg AJC, West CE, Hovenier R, Beynen AC. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br J Nutr* 1996;75:623-36.

60. Beard JL. *Comunicación personal. Pennsylvania State U.*
61. Arroyave G. *Interrelationships between protein and vitamin A metabolism. Am J Clin Nutr 1969;22:1119-28.*
62. Olson J. *Vitamin A, retinoids and carotenoids. In : Modern Nutrition in Health and Disease. Ed by Shils M, Olson J, Shike M. 8a ed. Lea and Febiger, USA 1994; 1:287-307.*
63. *Vitamin A deficiency and its control. Edited by J Christopher Bauernfeind. Academic Press. Inc., 1986.*
64. Heller J. *Transport of retinol to ocular tissue : an overview. World Rev Nutr Dietet 1978; 31: 42-6.*
65. Peterson PA, Rask L, Osterdberg L, Andersson L, Kamwendo F, Pertof H. *Studies on the transport of cellular distribution of vitamin A in normal and vitamin-A deficient rats with special reference to the vitamin A-binding plasma protein. J Biol Chem 1973; 248:409.*
66. Wald G. *The synthesis from vitamin A of "retinene" and of a new 545 mu chromagen yielding light-sensitive products. J Gen Physiol 1947; 31:489.*
67. Wald G. *The interconversion of the retinenes and vitamin A in vitro. Biochem Biophys Acta 1950; 4: 215-19*
68. Mejía LA. *Vitamin A-Nutrient Interrelationships. In: Vitamin A deficiency and its control. Ed by J Christofer Bauernfeind. Academic press.Inc,1986.*

69. Smith JE, Milch PO. *The plasma transport and metabolism of retinoic acid in the rat.* J Biochem 1973; 132:821-27.
70. Anonymus. *The intracellular vitamin A-binding proteins. An overview of their functions.* Nutr Rev 1991; 49:1-12
71. Peterson PA, Bergard O. *Isolation and properties of human retinol transporting proteins.* J Biol Chem 1971; 246: 25-33.
72. Solomons NW and Russel RM. *The interaction of vitamin A and zinc: Implications for human nutrition.* Am J Clin Nutr, 1980; 33:2031-40
73. Smith JC Jr. *The vitamin A - zinc connection: a review.* Ann NY Acad Sci. 1980; 355:62-75.
74. Smith JC Jr. *Interrelationship of zinc and vitamin A metabolism in animal and human nutrition. A review.* In: Prasad AS ed. *Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements.* New York: Alan R. Liss, 1982:239-58.
75. Muñoz EC, Rosado JL. *Interacción metabólica zinc - vitamina A. Sus implicaciones clínicas, nutricionales y funcionales.* Rev Inv Clin. En prensa.
76. Patek AJ Jr, Haig C. *The occurrence of abnormal dark adaptation and its relation to vitamin A metabolism in patients with cirrhosis of the liver.* J Clin Invest 1939; 18:609-16
77. Vallee BL, Wacker WEC, Bartholomay AF, Hoch FL. *Zinc metabolism in hepatic dysfunction. II. correlation of metabolic patterns*

- with biochemical findings. *N Engl J Med* 1957; 257:1055-65
78. Stevenson JW, Earle IP. Studies on parakeratosis in swine. *J Anim Sci* 1956; 15:1036-45.
79. Saraswat RC, Arora SP. Effects of dietary zinc on vitamin A level and alkaline phosphatase activity in blood sera of lambs. *Indian J. Animal Sci* 1972; 42:358
80. Smith JE, Brown ED, Smith JC Jr. The effect of zinc deficiency on the metabolism of retinol-binding protein in the rat. *J Lab Clin Med* 1974; 84:692-7
81. Carney SM, Underwood BA, Loerch JD. Effects of zinc and vitamin A deficient diets on the hepatic mobilization and urinary excretion of vitamin A in rats. *J Nutr* 1976; 106:1773-81
82. Smith FR, Suskind R, Thanangkul O, Leitzmann C, Goodman DS, Olsen RE. Plasma vitamin A, retinol-binding protein and prealbumin concentration in protein-calorie malnutrition. III. Response to varying dietary treatment. *Am J Clin Nutr* 1975; 28:732
83. Ingenbleek Y, Van Den Schriek HG, De Naeyer P, De Visscher M. The role of retinol-binding protein in protein-calorie malnutrition. *Metabolism* 1975; 24:633.
84. Gardner RH. The effect of vitamin A deficiency on hematopoiesis and iron metabolism. Master's thesis, 1979. University of California. Davis, Calif.

ANEXO 3

Iron and zinc supplementation improves indicators of vitamin A status of Mexican preschoolers^{1,2}

Elsa C Muñoz, Jorge L Rosado, Patricia López, Harold C Furr, and Lindsay H Allen

ABSTRACT

Background: The coexistence of multiple micronutrient deficiencies is a widespread public health problem in many regions of the world. Interactions between zinc deficiency and vitamin A metabolism have been reported but no longitudinal studies have evaluated the effect of iron deficiency on vitamin A

Objective: The objective of this study was to investigate the effect of supplementation with iron, zinc, or both on vitamin A and its metabolically related proteins retinol binding protein (RBP) and transthyretin.

Design: The study was a longitudinal, double-blind, placebo-controlled trial in which 219 rural Mexican children aged 18–36 mo were randomly assigned to receive 20 mg Zn/d, 20 mg Fe/d, 20 mg Zn/d plus 20 mg Fe/d, or placebo

Results: Six months after supplementation, plasma retinol increased in all supplemented groups. Compared with placebo, zinc supplementation was associated with significantly higher plasma retinol and transthyretin but the increase in RBP was not significant. Iron supplementation significantly increased plasma retinol, RBP, and transthyretin. Supplementation with zinc plus iron significantly increased plasma retinol but not RBP or transthyretin. Children deficient in zinc, iron, or vitamin A (as indicated by nutrient plasma concentration) at the beginning of the study had a significantly greater increase in retinol than did children with adequate nutrient status

Conclusions: Supplementation with zinc, iron, or both improved indicators of vitamin A status. The results of this study agree with previous observations of a metabolic interaction between zinc and vitamin A and suggest an interaction between iron and vitamin A metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000;71:789–94

KEY WORDS Zinc deficiency, iron deficiency, vitamin A deficiency, retinol binding protein, RBP, transthyretin, nutrient interactions, preschoolers

INTRODUCTION

The coexistence of multiple micronutrient deficiencies is increasingly recognized as a widespread public health problem in developing countries (1–4). In Mexico, iron deficiency is highly prevalent (1, 5) because of the low bioavailability of iron in the plant-based, high-phytate diets consumed habitually in rural areas. We showed previously that the rural Mexican diet significantly impairs absorption of both iron and zinc (6) and has

a low vitamin A content (7). A deficiency in one or more of these nutrients may result in growth stunting (8–10), increased morbidity (11, 12), or delayed cognitive function (13, 14)

Interactions between zinc and vitamin A were reported in animals (15–22) and humans (23–27). Zinc deficiency is commonly associated with low plasma concentrations of vitamin A, even when hepatic vitamin A stores are normal, suggesting that there is a defect in mobilization of vitamin A rather than in its absorption or transport to the liver. With zinc deficiency there is impaired synthesis of proteins that turnover rapidly, such as retinol binding protein (RBP). This impairment affects retinol transport from the liver to the circulation and other tissues because retinol is transported as a retinol-RBP complex in association with transthyretin. Previous reports indicated beneficial effects of zinc supplementation on vitamin A metabolism in malnourished children (23), preterm infants (24), and adults with alcoholic cirrhosis (25). Other studies showed no such effect of zinc on serum indicators of vitamin A metabolism (26–27). However, a functional interaction between zinc and vitamin A was suggested in that there was significantly less abnormal conjunctival impression cytology in subjects receiving both zinc and vitamin A than in subjects receiving a placebo or zinc alone. These conflicting results may be explained by differences in the subjects' nutritional status for zinc, vitamin A, and perhaps other nutrients (23).

Studies in humans (28, 29) and animals (30–32) showed that vitamin A deficiency causes abnormalities in iron metabolism and that supplementation with vitamin A improves iron status as measured by hematologic indexes (33–40). No longitudinal studies have evaluated the effect of iron supplementation on vitamin A status. In the present study we investigated the effect of supplementation with iron, zinc, or both on plasma concentrations of retinol, RBP, and transthyretin.

¹From the Department of Nutritional Physiology, National Institute of Nutrition, Mexico City, the Program in International Nutrition, University of California, Davis, and the Department of Nutritional Sciences, University of Connecticut, Storrs

²Address reprint requests to JL Rosado, National Institute of Nutrition, Department of Nutritional Physiology, Vasco de Quiroga No 15 Tlalpan, Mexico DF 14000. E-mail: rosado@servidor.unam.mx
Received January 7, 1999

Accepted for publication August 23, 1999

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

A longitudinal, double-blind, placebo controlled supplementation trial was conducted in 5 rural communities in the Solis Valley, located in the central highland plateau of Mexico, ≈ 150 km northwest of Mexico City. The communities ranged in size from 700 to 1500 persons (≈ 100 -214 households). All children aged 18-36 mo were considered as potential participants. According to a baseline census there were 290 children in this age group in the study area. After they learned about the design and potential risks and benefits of the study, the mothers of all of these children were invited to allow their children to participate. The mothers of 219 children agreed to their children's participation and signed consent forms. The protocol was approved by the Committee on Biomedical Research in Human Subjects of the National Institute of Nutrition. The children were assigned to 1 of 4 groups depending on their age, sex, and height-for-age deficit. Birth dates were obtained from birth certificates.

Zinc and iron supplementation

Children in each of the 4 groups received 20 mL/d of a beverage containing 20 mg Fe as ferrous sulfate, 20 mg Zn as zinc methionine, 20 mg Zn plus 20 mg Fe, or placebo. Zinc methionine was chosen after we showed that postconsumption plasma zinc concentrations were higher with this form of zinc than with zinc sulfate or zinc polyascorbate (41). Ferrous sulfate is the most commonly used form of supplemental iron. To improve the taste of the mineral solutions and to ensure that they were similar in appearance, texture, and taste to each other and to the placebo, all beverages contained sugar, citric acid, water and artificial orange or lemon flavor. The acceptability of the beverage was ensured by testing it before the trial in a sample of children of the same age as the study subjects.

Children in each group were visited at home from Monday through Saturday each week by a fieldworker who gave the beverage to each child and ensured that it was consumed completely. The flavor of the supplement was changed weekly to improve compliance. The supplements were consumed on 97% of the days on average and only 15 children dropped out of the study before the end of the 6 mo.

Indicators of iron, zinc, and vitamin A status

A 2-ml sample of fasting venous blood was collected from each preschooler at baseline and after 6 mo of supplementation. Blood was collected in a mineral-free evacuated tube and transferred to an acid-washed tube containing 0.05 mL sodium citrate as an anticoagulant. Hemoglobin was measured within 3 h (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Plasma was separated by centrifugation at $1000 \times g$ for 10 min at 20°C. Portions of plasma were frozen immediately and maintained at -70°C until analyzed. For plasma zinc measurements, samples were diluted 1:10 with deionized water and measured by atomic absorption spectrophotometry against a zinc reference (Sigma Chemical Co., St. Louis) in 5% glycerol (42). Plasma ferritin was measured with a solid-phase immunoradioassay kit (Coat-A-Count Ferritin IRMA, Diagnostic Products Corp., Los Angeles). Vitamin A was extracted from plasma after the addition of retinyl myristate as an internal standard and was analyzed by isocratic reversed-phase HPLC using the method of Barua et al. (43), with slight adaptations; the column was a Waters Resolve C₁₈

(3.9 \times 150 mm, 5 μ m particle size, Millipore Corp., Milford, MA), the mobile phase consisted of acetonitrile, dichloroethane, methanol, and *N* butanol (90:15:10:0.1), and the flow rate was 1 mL/min. The samples were analyzed at 300 nm. Plasma RBP and transthyretin were measured by immunoassay and laser nephelometry (Behring Diagnostics Inc., Somerville, NJ). C-reactive protein (CRP) was measured with the NA-Latex-CRP kit (Behring Diagnostics Inc.). Analyses of all samples were performed in duplicate and were accompanied by standards and certified control sera. Control serum for vitamin A analysis was obtained from the National Institute of Standards and Technology (Standard Reference Materials, Gaithersburg, MD), control serum for zinc analysis was obtained from the Centers for Disease Control and Prevention (US Department of Health and Human Services, Atlanta), and control serum for ferritin, RBP, and transthyretin analyses were obtained from Bio-Rad (Anaheim, CA).

Statistical analysis

Biochemical data were analyzed as changes between basal and 6-mo values by using SAS (44). Group differences were analyzed by two-way analysis of variance using a Latin square repeated-measures design that considers unequal numbers of subjects among treatment groups (Proc-GLM). Means were compared by using Tukey's range test. Group, sex, and initial vitamin A, iron, and zinc status (deficient or adequate) were used as independent variables. Cutoff values for deficiency were 0.70 μ mol/L for retinol, 12 μ g/l for ferritin, and 10.7 μ mol/L for zinc. Children with plasma CRP concentrations > 5.0 mg/L were excluded from the statistical analyses because plasma retinol, RBP, transthyretin, and ferritin concentrations are altered by acute infection or inflammatory processes. Each dependent variable was tested for homogeneity of its variance by one-way analysis of variance and Bartlett's test. Values of $P \leq 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Subject characteristics and baseline nutritional status

The characteristics and nutritional status of the children at the beginning of the study are shown in Table 1. There were no significant intergroup differences in the number of subjects, mean age, sex distribution or weight and height deficits. The mean height-for-age deficit of the children was 1.6 (z score). Mean hemoglobin concentrations were below normal, whereas mean ferritin, zinc, and retinol concentrations were within the normal range. At baseline, the mean prevalence of anemia in all groups was 73%, that of low plasma ferritin was 51%, that of low plasma zinc was 25%, and that of low plasma retinol was 29%.

Effect of iron and zinc supplementation on iron and zinc status

Hemoglobin, plasma ferritin, and plasma zinc concentrations at baseline and after 6 mo of supplementation are shown in Table 2. As expected, supplementation with iron alone or in combination with zinc resulted in significantly higher hemoglobin and ferritin concentrations after 6 mo than those in the placebo group, whereas supplementation with zinc alone or in combination with iron resulted in significantly higher plasma zinc concentrations.

TABLE 1
Characteristics of subjects in each group at the beginning of the study¹

	Placebo (n = 30 F, 26 M)	Zinc (n = 27 F, 27 M)	Iron (n = 30 F, 24 M)	Zinc plus iron (n = 30 F, 25 M)	All groups (n = 117 F, 102 M)
Age (mo)	28.9 ± 7.9	28.4 ± 7.5	27.5 ± 6.9	28.8 ± 8.9	28.4 ± 7.8
Anthropometric measurements (z score)					
Weight-for-age	1.4 ± 0.6	-1.4 ± 0.8	-1.6 ± 0.9	-1.2 ± 0.9	1.4 ± 0.8
Height-for-age	1.8 ± 0.9	1.6 ± 1.0	1.6 ± 1.2	1.5 ± 1.0	1.6 ± 1.0
Weight-for-height	0.4 ± 0.08	0.4 ± 0.08	0.7 ± 0.08	0.3 ± 0.12	0.5 ± 0.09
Biochemical indicators of deficiency ²					
Hemoglobin	71	70	67	82	73
Plasma ferritin	57	43	49	55	51
Plasma zinc	27	26	28	18	25
Plasma retinol	28	23	34	33	29

¹There were no significant differences among groups.

² $\bar{x} \pm$ SD.

³Deficiency defined as < 11.0 g/L for hemoglobin, < 12 µg/L for ferritin, < 10.7 µmol/L (< 70 µg/dL) for zinc, and < 0.70 µmol/L (< 20 µg/dL) for retinol.

Effect of iron and zinc supplementation on vitamin A status

The changes in plasma retinol, RBP, and transthyretin after 6 mo of supplementation with zinc, iron, or both are shown in Table 3. The increase in plasma retinol and TTR, but not in RBP, was significantly higher in the zinc group than in the placebo group. Supplementation with iron alone significantly increased retinol, RBP, and transthyretin. Supplementation with zinc plus iron significantly increased retinol but had no significant effect on RBP or transthyretin. Iron supplementation was associated with a higher increase in retinol and RBP than supplementation with zinc or zinc plus iron.

Effect of baseline iron, zinc, and vitamin A status on changes in retinol

The effect of baseline zinc, iron, and vitamin A status on changes in plasma retinol after supplementation with zinc, iron, or both is shown in Table 4. Supplementation with zinc or zinc plus iron in children with zinc deficiency at baseline resulted in a higher mean change in plasma retinol than that in children with

adequate plasma zinc at baseline, in whom there was a very small decrease. Similarly, the effect of supplementation with iron or iron plus zinc on plasma retinol was significantly greater in the iron-deficient children than in the children with adequate iron status. Vitamin A-deficient children had a higher increase in plasma retinol than did children with adequate vitamin A status in groups supplemented with zinc, iron, or both.

DISCUSSION

In this longitudinal, placebo-controlled community trial, supplementation with iron, zinc, or both was associated with a significant increase in the plasma retinol concentrations of Mexican preschoolers. This effect was much more evident in children who were initially deficient in zinc, iron, or vitamin A. Iron supplementation also produced a significant increase in the vitamin A-associated proteins RBP and transthyretin, and zinc supplementation increased transthyretin concentrations.

Previous studies showed a positive effect of zinc supplementation on vitamin A nutritional status (23, 25), suggesting a

TABLE 2
Biochemical indicators of zinc and iron status in preschool children at baseline and after 6 mo of supplementation with zinc, iron, or both

	Placebo	Zinc	Iron	Zinc plus iron
Hemoglobin (g/L) ¹				
Baseline	108 ± 14	109 ± 11	108 ± 13	107 ± 10
Posttreatment	116 ± 10	118 ± 9	122 ± 9	119 ± 10
Change	8.0 ± 16.3	8.0 ± 12.9	14.0 ± 14.0 ²	13.0 ± 13.0 ²
Plasma ferritin (µg/L) ¹				
Baseline	20.0 ± 44.6	18.9 ± 15.8	21.2 ± 38.2	14.7 ± 15.6
Posttreatment	16.2 ± 13.8	16.6 ± 15.4	37.3 ± 17.2	33.6 ± 18.7
Change	-4.6 ± 41.6	-2.3 ± 15.6	16.0 ± 38.7 ³	18.6 ± 20.5 ³
Plasma zinc (µmol/L) ¹				
Baseline	14.2 ± 4.8	13.2 ± 4.2	15.2 ± 4.4	16.5 ± 4.7
Posttreatment	14.3 ± 4.7	16.8 ± 5.6	14.9 ± 4.5	18.1 ± 5.0
Change	0.18 ± 3.2	3.63 ± 4.7 ³	0.28 ± 3.4	1.62 ± 4.9 ³

¹ $\bar{x} \pm$ SD.

²n = 50 in the placebo group, 49 in the zinc group, 52 in the iron group, and 51 in the zinc plus iron group.

³Significantly different from placebo group (two-way ANOVA). ⁴P < 0.05, ⁵P < 0.0001.

⁶n = 48 in the placebo group, 48 in the zinc group, 49 in the iron group, and 49 in the zinc plus iron group.

⁷n = 54 in the placebo group, 47 in the zinc group, 45 in the iron group, and 48 in the zinc plus iron group.

TABLE 3
Biochemical indicators of vitamin A status in preschool children at baseline and after 6 mo of supplementation with zinc, iron or both¹

	Placebo	Zinc	Iron	Zinc plus iron
Retinol ($\mu\text{mol/L}$) ²				
Baseline	1.19 \pm 0.4	1.02 \pm 0.4	0.98 \pm 0.5	1.02 \pm 0.5
Posttreatment	1.14 \pm 0.3	1.10 \pm 0.2	1.26 \pm 0.3	1.10 \pm 0.3
Change	0.05 \pm 0.3	0.08 \pm 0.4*	0.27 \pm 0.5**	0.08 \pm 0.5*
Retinol binding protein (mg/L) ¹				
Baseline	21.5 \pm 8.1	24.2 \pm 7.7	22.9 \pm 8.7	22.8 \pm 10.0
Posttreatment	22.4 \pm 7.2	26.2 \pm 8.7	28.4 \pm 10.7	24.3 \pm 10.0
Change	0.9 \pm 8.6	1.9 \pm 10.2	5.4 \pm 7.8**	2.0 \pm 10.0
Transferrin (mg/L) ¹				
Baseline	192.0 \pm 41.0	199.0 \pm 50.0	205.0 \pm 53.0	208.0 \pm 63.0
Posttreatment	207.0 \pm 50.0	241.0 \pm 56.0	239.0 \pm 49.0	230.0 \pm 59.0
Change	14.0 \pm 45.0	42.0 \pm 66.0*	33.0 \pm 56.0*	23.0 \pm 59.0

* \pm SD. Values in the same row with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$.

¹ $n = 38$ in the placebo group, 37 in the zinc group, 43 in the iron group, and 42 in the zinc plus iron group.

² Significantly different from placebo group, $P < 0.05$ (two-way ANOVA).

* $n = 45$ in the placebo group, 42 in the zinc group, 46 in the iron group, and 45 in the zinc plus iron group.

** $n = 43$ in the placebo group, 41 in the zinc group, 45 in the iron group, and 44 in the zinc plus iron group.

metabolic interaction between the 2 nutrients. Shingwekar et al (23) found a highly significant increase in plasma retinol and RBP after 40 mg Zn/d was given for 5 d to zinc-deficient, vitamin A-deficient Indian children with protein energy malnutrition (PEM). The effect was not found in children without PEM who were less zinc deficient. Mean plasma concentrations of zinc, retinol, and RBP before supplementation were 8.7 $\mu\text{mol/L}$, 0.44 $\mu\text{mol/L}$, and 20 mg/L, respectively, in children with PEM and 11.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.53 $\mu\text{mol/L}$, and 21.9 mg/L, respectively, in children without PEM.

Studies that showed no effect of zinc supplementation on vitamin A status were carried out in populations with no clear evidence of zinc deficiency (26, 27). Udomkesmalee et al (27) studied the effect of 6 mo of supplementation with 25 mg Zn/d on the vitamin A status of preschoolers in Thailand. They found no effect of zinc supplementation on plasma retinol or RBP. At baseline, children in that study had mean (\pm SD) plasma zinc and retinol concentrations of 13.2 \pm 1.4 and 1.0 \pm 0.2 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Palin et al (26) found no effect of zinc supplementation on biochemical indicators of vitamin A status in patients with cystic fibrosis whose plasma zinc concentrations were within the normal range. The results of these studies are consistent with our observation that zinc supplementation benefits the metabolism of vitamin A when zinc status is poor.

In this study, baseline plasma concentrations of zinc and vitamin A predicted the response of vitamin A to zinc supplementation. The children were from a poor rural community at risk of marginal deficiency of several nutrients. On average, plasma zinc and retinol concentrations were within the normal range at baseline (14.7 and 1.05 $\mu\text{mol/L}$, respectively). Nevertheless, 29% of children had low plasma retinol ($< 0.70 \mu\text{mol/L}$) and 25% had low plasma zinc ($< 10.7 \mu\text{mol/L}$). Mean plasma concentrations of RBP and transferrin were lower (22.8 \pm 8.6 and 201.0 \pm 51.0 mg/L, respectively) than those normally found in children with adequate vitamin A status (26–76 and 250–450 mg/L, respectively) (45). The effect of supplementation on plasma retinol concentrations was greater in the children deficient in zinc or vitamin A, strengthening the theory that zinc interactions with vitamin A metabolism are dependent on both zinc and vitamin A status. The

effect of zinc supplementation on plasma retinol concentrations was greater in children who were vitamin A deficient at baseline than in children with adequate vitamin A status.

Studies in humans (28, 29, 35–39, 46–49) and animals (31, 50) showed associations between vitamin A deficiency and deficiency anemia. Vitamin A supplementation improves indicators of iron nutritional status, such as serum iron, transferrin, transferrin saturation, hematocrit, and hemoglobin, suggesting that vitamin A affects iron metabolism (35, 36, 39). In children (29, 37, 39, 46–47) and in pregnant women (48), plasma hemoglobin and ferritin concentrations were correlated with plasma retinol and in some instances with RBP and transferrin (36).

To our knowledge, only Mejia and Chew (35) studied the effect of iron supplementation on vitamin A status. These authors supplemented anemic children aged 1–8 y for 2 mo with either 3 mg elemental Fe/kg d⁻¹ or iron plus vitamin A and evaluated the effect on

TABLE 4
Change in plasma retinol concentrations in preschool children after 6 mo of supplementation with zinc, iron, or both according to nutritional status of children at baseline¹

	Zinc	Iron	Zinc plus iron
	$\mu\text{mol/L}$		
Zinc status			
Deficient ²	0.26 \pm 0.1	0.05 \pm 0.8	0.38 \pm 0.2
Adequate	0.05 \pm 0.6	0.31 \pm 0.5	0.007 \pm 0.3
Iron status			
Deficient ³	0.15 \pm 0.5	0.41 \pm 0.4*	0.29 \pm 0.1
Adequate	0.24 \pm 0.5	0.18 \pm 0.6	0.26 \pm 0.6
Vitamin A status			
Deficient ⁴	0.65 \pm 0.3*	0.60 \pm 0.3	0.53 \pm 0.2
Adequate	0.09 \pm 0.4	0.15 \pm 0.5	0.19 \pm 0.5

* \pm SD.

¹ Defined as a plasma zinc concentration $< 10.7 \mu\text{mol/L}$ ($< 70 \mu\text{g/dL}$).

² Significantly different from children with adequate status, $P < 0.05$ (two-way ANOVA).

³ Defined as a plasma ferritin concentration $< 12 \mu\text{g/L}$.

⁴ Defined as a plasma retinol concentration $< 0.70 \mu\text{mol/L}$ ($< 20 \mu\text{g/dL}$).

plasma retinol and hematologic indicators. They did not find a beneficial effect of iron supplementation on serum retinol concentrations, but children in that study were not vitamin A deficient and were only marginally iron deficient. There are no reports of the effect of iron supplementation on plasma transport proteins of vitamin A. However, preliminary research with experimental iron-deficient animals showed a reduction in plasma concentrations of retinol even though the concentration of vitamin A in the liver was normal or higher than normal (E. Rosales, J. Beard, unpublished observations, 1999), suggesting that vitamin A use during iron deficiency is abnormal.

In this prospective mineral-supplementation study of free living children with a high incidence of iron deficiency (51% with low ferritin) and anemia (72% with low hemoglobin), we found that supplementation with iron alone or in combination with zinc improved vitamin A status. The effect was much stronger in children deficient in either iron or vitamin A than in children with adequate iron and vitamin A status. Moreover, the subjects who were zinc or iron deficient at baseline had lower retinol concentrations than did subjects with adequate zinc or iron status, although the difference was not significant for iron deficiency.

The fact that the children in our study had a higher incidence of low hemoglobin than of low plasma ferritin could be at least partially explained by the high incidence of other nutrient deficiencies. About 33% of our subjects had low vitamin B-12 concentrations, 29% were vitamin A deficient, and 32% had low riboflavin concentrations.

This study showed that supplementation for 6 mo with 2 times the recommended daily allowance (51) of iron and zinc improved vitamin A status as assessed by plasma concentrations of retinol, RBP, and transthyretin in children with a high risk of marginal deficiency of zinc, iron, and vitamin A. In developing populations, the coexistence of marginal vitamin A deficiency with zinc and iron deficiency is common. Attention to nutritional status for a single nutrient might not be appropriate (9, 10). We showed that vitamin A status is affected by zinc and iron deficiency, which could explain the failure of vitamin A status to improve in some vitamin A supplementation trials and programs (52). The precise mechanism by which these interactions occur requires further investigation.

REFERENCES

- Rosado JL, Bourges H, Saint-Martin B. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información. I. Deficiencia de minerales. (Deficiency of vitamins and minerals in Mexico. A critical review of the information state. I. Mineral deficiency.) *Salud Publica Mex* 1995; 37: 130-9 (in Spanish).
- Rosado JL, Bourges H, Saint-Martin B. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información. II. Deficiencia de vitaminas. (Deficiency of vitamins and minerals in Mexico. A critical review of the information state. II. Vitamin deficiency.) *Salud Publica Mex* 1995; 37: 452-61 (in Spanish).
- Madrigal HF, Chávez A, Moreno-Terrazas O, et al. Consumo de alimentos y estado nutricional de la población en el medio rural Mexicano. (Food intake and nutritional status of rural Mexican population.) *Rev Invest Clin Suppl* 1986; 38: 9-19 (in Spanish).
- Murphy SP, Beaton GH, Calloway DH. Estimated mineral intakes of toddlers: predicted prevalence of inadequacy in village populations in Egypt, Kenya, and Mexico. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 565-72.
- Allen LH, Rosado JL, Casterline JE, López P, Muñoz EC, Martínez H. Lack of hemoglobin response to iron supplementation in anemic Mexican preschoolers with multiple micronutrient deficiencies. *Am J Clin Nutr* (in press).
- Rosado JL, López P, Morales M, Muñoz EC, Allen LH. Bioavailability of energy, nitrogen, fat, zinc, iron and calcium from rural and urban Mexican diets. *Br J Nutr* 1992; 68: 45-58.
- Calloway DH, Murphy SP, Beaton GH, Lenn D. Estimated vitamin intakes of toddlers: predicted prevalence of inadequacy in village populations in Egypt, Kenya, and Mexico. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 376-84.
- Allen LH. Nutritional influences on linear growth: a general review. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48(suppl): 75-89.
- Ronaghy H, Spivey Fox MR, Garn SM, et al. Controlled zinc supplementation for malnourished school boys: a pilot experiment. *Am J Clin Nutr* 1969; 22: 1279-89.
- Rosado JL. Separate and joint effect of micronutrient deficiencies on linear growth. *J Nutr* 1999; 129: 531S-35S.
- Tomkins A, Behrens R, Roy S. The role of vitamin A and zinc deficiency in diarrhoeal syndromes in developing countries: A review. *Proc Nutr Soc* 1993; 52: 131-42.
- Rosado JL, López P, Muñoz E, Martínez H, Allen LH. Zinc supplementation reduced morbidity but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 13-9.
- Sandstead HH, Penland JG, Alcock NW, et al. Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(suppl): 470S-5S.
- Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. Long term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Engl J Med* 1991; 325: 687-94.
- Smith JC Jr, McDaniel EG, Fan FF, Halsted JA. Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism. *Science* 1973; 181: 954-5.
- Smith JC Jr, Brown ED, McDaniel EG, Chan W. Alterations in vitamin A metabolism during zinc deficiency and food and growth restriction. *J Nutr* 1976; 106: 569-74.
- Brown ED, Chan W, Smith JC Jr. Vitamin A metabolism during the repletion of zinc deficient rats. *J Nutr* 1976; 106: 563-8.
- Mobarhan S, Greenberg B, Mehta R, Friedman H, Barch D. Zinc deficiency reduces hepatic cellular retinol binding protein in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1992; 62: 148-54.
- Glover J, Muhald H. Nutritional factors affecting the biosynthesis of retinol binding protein in the liver and its release into plasma. *Int J Vitam Nutr Res* 1976; 46: 239-43.
- Eite SI, Basu TK, Dickerson JW. Short-term effects of zinc sulfate on plasma and hepatic concentrations of vitamin A and I in normal weaning rats. *Nutr Metab* 1979; 23: 11-6.
- Duncan JR, Hurley BS. An interaction between zinc and vitamin A in pregnant and fetal rats. *J Nutr* 1978; 108: 1432-8.
- Baly DL, Golub MS, Gershwin ME, Hurley BS. Studies of marginal zinc deprivation in Rhesus monkeys. III. Effects on vitamin A metabolism. *Am J Clin Nutr* 1984; 40: 199-207.
- Shingwekar AG, Mohanram M, Reddy V. Effect of zinc supplementation on plasma levels of vitamin A and retinol-binding protein in malnourished children. *Clin Chim Acta* 1979; 93: 97-100.
- Hustead VA, Greger JL, Gutcher GR. Zinc supplementation and plasma concentration of vitamin A in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 1017-21.
- Morrison SA, Russell RM, Carney EA, Oaks EV. Zinc deficiency: a cause of abnormal dark adaptation in cirrhotics. *Am J Clin Nutr* 1978; 31: 276-81.
- Palin D, Underwood BA, Denning CR. The effect of oral zinc supplementation on plasma levels of vitamin A and retinol binding protein in cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1979; 32: 1253-9.
- Udomkesmalee E, Dhanamitta S, Srisintha S, et al. Effect of vitamin A and zinc supplementation on the nutrition of children in northeast Thailand. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 50-7.
- Blackfan KD, Wolbach SB. Vitamin A deficiency in infants: A clinical and pathological study. *J Pediatr* 1933; 3: 679-706.
- Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JF, et al. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 1978; 31: 876-85.

- 30 Mejía LA, Hodges RE, Rucker RB. Role of vitamin A in the absorption, retention and distribution of iron in the rat. *J Nutr* 1979; 109:129-37
- 31 Staab DV, Hodges RE, Metcalf WK, Smith JL. Relationship between vitamin A and iron in the liver. *J Nutr* 1984; 114:840-4
- 32 Sijtsma KW, Van den Berg GJ, Lemmens AG, West CE, Beynen AC. Iron status in rats fed diets containing marginal amounts of vitamin A. *Br J Nutr* 1993; 70:777-85
- 33 Muhilal H, Permiersh D, Idjradinata YR, Muherdiyantiningsih, Karyadi D. Vitamin A-fortified monosodium glutamate and health, growth and survival of children: a controlled field trial. *Am J Clin Nutr* 1988; 48:1271-6
- 34 Mejía LA, Arroyave G. Lack of direct association between serum transferrin and serum biochemical indicators of vitamin A nutriture. *Acta Vitaminol Enzymol* 1983; 5:179-84
- 35 Mejía LA, Chew F. Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. *Am J Clin Nutr* 1988; 48:595-600
- 36 Bloem MW, Wedel M, Egger RJ, et al. Iron metabolism and vitamin A deficiency in children in northeast Thailand. *Am J Clin Nutr* 1989; 50:332-8
- 37 Mohanran M, Kulkarni KA, Reddy V. Hematological studies in vitamin A deficient children. *Int J Vitam Nutr Res* 1977; 47:389-93
- 38 Mejía LA, Arroyave G. The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *Am J Clin Nutr* 1982; 36:87-93
- 39 Bloem MW, Wedel M, van Agtmaal EJ, Speek AJ, Saowakontha S, Schreurs WH. Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral massive dose on iron metabolism. *Am J Clin Nutr* 1990; 51:76-9
- 40 Allen LH, Rosado JL, Casterline JE, Martínez H, López P, Muñoz EC. Vitamin B-12 deficiency and malabsorption are highly prevalent in rural Mexican communities. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1013-9
- 41 Rosado JL, Muñoz EC, López P, Allen LH. Absorption of zinc sulfate, methionine, and polysorbate in the presence and absence of a plant-based rural Mexican diet. *Nutr Res* 1993; 13:1141-51
- 42 Smith JC, Butrimovitz GP, Purdy WC. Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem* 1979; 25:1487-91
- 43 Barua AB, Furr HC, Janck Buckner D, Olson JA. Simultaneous analysis of individual carotenoids, retinol, retinyl esters and tocopherols in serum by isocratic non aqueous reversed phase HPLC. *Food Chem* 1993; 46:419-24
- 44 SAS Institute Inc. SAS user's guide: statistics. 5th ed. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1985
- 45 Gibson RS. Principles of nutritional assessment. New York: Oxford University Press, 1990
- 46 Wolde-Gebriel Z, West CE, Gebru H, et al. Interrelationships between vitamin A, iodine and iron status in schoolchildren in Shoa Region, Central Ethiopia. *Br J Nutr* 1993; 70:593-607
- 47 Mejía LA, Hodges RE, Arroyave G, Viteri F, Torun B. Vitamin A deficiency and anemia in Central American children. *Am J Clin Nutr* 1977; 30:1175-84
- 48 Suharno D, West CE, Muhilal, et al. Cross-sectional study on the iron and vitamin A status of pregnant women in West Java, Indonesia. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:988-93
- 49 Semba RD, Muhilal H, West KP Jr. Impact of vitamin A supplementation on hematological indicators of iron metabolism and protein status in children. *Nutr Rev* 1992; 12:469-78
- 50 Roodenburg AJC, West CE, Hovenier R, Beynen AC. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *Br J Nutr* 1996; 75:623-36
- 51 National Research Council. Recommended dietary allowances. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989
- 52 Arroyave G. Interrelationships between protein and vitamin A metabolism. *Am J Clin Nutr* 1969; 22:1119-28