

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



**INFLUENCIA DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE
EL ESTATUS CLÍNICO, NUTRICIONAL Y OXIDATIVO EN
DEPORTISTAS DE ÉLITE: ESTUDIO DE SUPLEMENTACIÓN
CON DIVERSOS MICRONUTRIENTES**

JORGE MOLINA LÓPEZ

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jorge Molina López
D.L.: GR 521-2014
ISBN: 978-84-9028-830-6

**INFLUENCIA DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE EL
ESTATUS CLÍNICO, NUTRICIONAL Y OXIDATIVO EN DEPORTISTAS DE
ÉLITE: ESTUDIO DE SUPLEMENTACIÓN CON DIVERSOS
MICRONUTRIENTES**

**Memoria que presenta para aspirar al Grado de Doctor con mención
Internacional por la Universidad de Granada el Licenciado**

D. Jorge Molina López.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

**Directora: Dr^a D^a Elena María
Planells del Pozo**

**Director: Dr D Luis Javier
Chirosa Ríos**

Ldo. D. Jorge Molina López

Aspirante al Grado de Doctor con Mención Internacional

Granada, 2013

Dr^a D^a Elena María Planells del Pozo, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Granada,

y Dr D Luis Javier Chiroso Ríos, Profesor Titular de Educación Física y Deporte de la Universidad de Granada,

Directores de la Memoria de Tesis Doctoral Internacional de título: “*INFLUENCIA DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE EL ESTATUS CLÍNICO, NUTRICIONAL Y OXIDATIVO EN DEPORTISTAS DE ÉLITE: ESTUDIO DE SUPLEMENTACIÓN CON DIVERSOS MICRONUTRIENTES*”, realizada por el Licenciado D. Jorge Molina López, autorizan su presentación ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente Tesis Doctoral a 4 de Septiembre de 2013.

Fdo. Elena M^a Planells del Pozo

Fdo. Luis Javier Chiroso Ríos



El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral con mención Internacional titulada ***“INFLUENCIA DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE EL ESTATUS CLÍNICO, NUTRICIONAL Y OXIDATIVO EN DEPORTISTAS DE ÉLITE: ESTUDIO DE SUPLEMENTACIÓN CON DIVERSOS MICRONUTRIENTES”***, ha sido realizado gracias a la concesión de diferentes ayudas, como la beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU, MEC, Jorge Molina López ref. AP-2009-3701), el Plan Propio de la Universidad de Granada, y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a partir del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (refs. PI07/1228 y PI10/01993). Este proyecto se ha realizado en el en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos *“José Mataix”*, del Centro de Investigación Biomédica, y el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, en colaboración con la Unidad de Nutrición y Dietética del Hospital Virgen de las Nieves de Granada y el *King’s College* de Londres, UK.

Agradecimientos

Quiero agradecer...

*“Ya sabes,
no mires a los lados, sigue tu propio camino.
No olvides mirar atrás,
para no olvidar los momentos vividos que han formado tu recorrido”...*

*No me tienta la gloria. Sólo una vida en paz,
rica de los tesoros del amor y la lira,
en una estancia dulce, solitaria, serena,
llena de libros bellos, con flores, encendida!*

*Estancia adonde, a veces, la amistad se llegara,
a llamar a la puerta con mano noble y limpia,
retiro adonde, a veces, se asomara el amor
con la mirada extraviada y conmovida...*

*Que el lujo y el rumor se queden para otros...
a mí me basta con mi fe en las armonías,
en una estancia plácida, alejada, callada,
llena de libros bellos, con flores, encendida!*

(Melancolía, 1912) Juan Ramón Jiménez

Abreviaturas

Abreviaturas

ACSM	American Collegue of Sport Medicine
ADA	American Dietetic Association
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
Ca	Calcio
CHO	Hidratos de carbono
CI	Control inicial
CO ₂	Dióxido de carbono
CPR	Proteína C Reactiva
CPK	Creatinfosfoquinasa
Cr	Cromo
CS	Control suplementado
Cu	Cobre
CVD	Riesgo cardiovascular
Fe	Hierro
GET	Gasto energético total
HDL	High Density Lipoprotein Cholesterol
HCY	Homocisteína
LDL	Low Density Lipoprotein Cholesterol
IL ₆	Interleucina 6
IL ₁₀	Interleucina-10
IMC	Índice de masa corporal
IOM	Instituto de Medicina
ISAK	Intenational Society for Advancement in Kinanthropometry
IZiNCG	Internacional Zinc Group
Mg	Magnesio
MT	Metalotioneína
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Fósforo
PC	Pliegue cutáneo
RDA	Recommended Dietary Allowances
ROS	Especies Reactivas de Oxigeno
SCL30A	Solute Carrier Family 30 – ZnT
SCL39A	Solute Carrier Family 39 – Zip
SOD	Superóxido Dismutasa
TG	Triglicéridos
TMR	Tasa Metabólica Basal
VEN	Valoración del Estado Nutricional
Zn	Zinc

Índice

Índice

Descripción Resumida del Proyecto de Tesis	3
1. Justificación, Hipótesis y Objetivos	29
2. Antecedentes Bibliográficos del Estudio	33
2.1. Requerimientos y recomendaciones nutricionales en deporte	33
2.1.1. Requerimientos de energía y macronutrientes en deporte	33
2.1.1.1. Requerimientos de CHO en deporte	33
2.1.1.2. Requerimientos de proteínas en deporte	34
2.1.1.3. Requerimientos de lípidos en deporte	36
2.1.2. Requerimientos de vitaminas y minerales en deporte	38
2.1.3. Balonmano como deporte de equipo	40
2.2. Evaluación del estado nutricional en el deportista	41
2.2.1. Valoración de adecuación de ingesta de nutrientes	41
2.2.2. Valoración antropométrica	43
2.2.3. Valoración bioquímica	45
2.3. El Zn como biomarcador del estatus nutricional	46
2.3.1. El Zn como nutriente en deporte	47
2.3.1.1. Ingesta dietética recomendada de Zn	47
2.3.1.2. Fuentes dietéticas de Zn	48
2.3.2. Situación de déficit de Zn	49
2.3.3. Toxicidad de Zn	51
2.3.4. Utilización metabólica del Zn	51

2.3.4.1. Absorción del Zn	52
2.3.4.2. Distribución corporal del Zn en el organismo	52
2.3.4.3. Homeostasis del Zn	53
2.3.4.4. Excreción del Zn	54
2.3.4.5. Funciones del Zn	55
2.3.5. El Zn como nutriente protector frente a los radicales libres	56
2.3.5.1. Propiedades antioxidantes del Zn	56
2.3.5.2. El Zn y la Superóxido Dismutasa (SOD)	57
2.3.6. El Zn y el sistema inmune	58
2.3.7. Biomarcadores del estatus de Zn	61
2.3.8. Relación del Zn con otros metales	62
2.3.9. Suplementación con Zn en deporte	62
2.4. Transportadores de Zn en el deporte	64
2.5. Las familias de los transportadores de Zn	64
2.5.1. SCL30A (Solute Carrier Family 30)/ CDF / ZnT	65
2.5.2. SCL39A (Solute Carrier Family 39) / ZIP	69
2.6. Localización intracelular de los transportadores de Zn SLC30A y SLC39A	72
3. Sujetos y metodología	75
3.1. Diseño del Estudio	75
3.2. Población de estudio	76
3.2.1. Puntos de Registro del Estudio	77
3.2.2. Recogida de datos en cada punto de medición	77
3.3. Metodología de registro y control del entrenamiento	77
3.4. Metodología de evaluación del estado nutricional	83

3.4.1. Valoración antropométrica	83
3.4.2. Recordatorio de consumo de alimentos de 72 horas	83
3.4.3. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos	83
3.4.4. Programa de educación nutricional	84
3.4.5. Software informático de conversión de alimentos a nutrientes: Nutriber®	84
3.5. Estudio de suplementación con Zn	85
3.5.1. Valoración de ingesta de Zn	85
3.5.2. Intervención mediante suplementación con Zn en la población de estudio	85
3.5.3. Valoración bioquímica y de Zn en la población de estudio	86
3.5.3.1. Recogida de muestras	86
3.5.3.2. Tratamiento de las muestras	87
3.5.3.2.1. Determinación de Zn	87
3.5.3.2.2. Determinación de la enzima superóxido dismutasa (SOD)	88
3.5.3.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total	88
3.5.3.2.4. Otros parámetros bioquímicos relacionados con Zn	89
3.5.4. Estudio Genético: Transportadores de Zn	89
3.5.4.1. Método de extracción de RNA	89
3.5.4.1.1. Método de almacenamiento de RNA	90
3.5.4.1.2. Técnica de extracción de RNA	90
3.5.4.2. Cuantificación la pureza y la integridad de RNA	93
3.5.4.3. Técnica de síntesis del c-DNA	95
3.5.4.4. Síntesis de Primers	95
3.5.4.5. Metodología q-PCR	96
3.5.4.5.1. Prevención de contaminación	96
3.5.4.5.2. Procedimiento Q-PCR	97
3.5.4.5.3. Análisis de los datos	98

3.5.4.5.4. Búsquedas de BLAST	99
3.5.4.5.5. Técnica de gel de agarosa	100
3.6. Análisis estadístico de los datos	100
3.7. Limitaciones del estudio	101

Implementación de un programa de educación nutricional en un equipo de balonmano: consecuencias sobre el estado nutricional.

4. Abstract	105
4.1. Abstract Español	106
Artículo 1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889623	107

Asociación entre la concentración de eritrocitos de magnesio y zinc en jugadores de balonmano de alto rendimiento después de una suplementación dietética con magnesio.

5. Abstract	125
5.1. Abstract Español	126
Artículo 2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695485	127

Efecto de la suplementación con ácido fólico sobre la concentración de homocisteína y su asociación con el entrenamiento en jugadores de balonmano.

6. Abstract	141
6.1. Abstract Español	142
Artículo 3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432819	143

7. Estudio de suplementación con zinc	153
7.1. Valoración Antropométrica	153
7.2. Valoración de ingesta de macronutrientes y Zn	154

7.3. Valoración bioquímica	154
7.3.1. Parámetros clínico nutricionales	154
7.3.2. Resultados de Zn en plasma y células sanguíneas	155
7.3.3. Evaluación Hematológica	156
7.3.4. Evaluación de la Expresión Génica	157
7.3.4.1. Pureza e integridad del ARN	157
7.3.4.2. Expresión de los transportadores de Zn	158
7.3.5. Estudio de correlación del Zn con otros parámetros	161
8. Discusión de los resultados	165
8.1. Valoración antropométrica	165
8.2. Valoración de ingesta de macronutrientes y Zn	167
8.3. Valoración bioquímica	170
8.3.1. Zn en plasma y células sanguíneas	170
8.3.2. Parámetros clínico nutricionales	171
8.3.3. Evaluación Hematológica	174
8.3.4. Evaluación génica de los transportadores de Zn	174
8.3.5. Estudio de correlación entre la expresión transportadores de Zn	182
9. Conclusiones	189
10. Referencias bibliográficas	201

Descripción Resumida del Proyecto de Tesis

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DEL PROYECTO DE TESIS

Estructura en el desarrollo de la tesis:

La presente tesis se estructura en capítulos, cada de uno de los cuales se encarga de explicar las fases de desarrollo del proyecto de tesis, entre los que se incluyen el **Capítulo 1**, que presenta la Justificación, la Hipótesis y los Objetivos del trabajo; el **Capítulo 2**, los Antecedentes Bibliográficos que aportan una información detallada del tema justificando del proyecto de tesis realizado; el **Capítulo 3** describe el apartado que informa sobre la población y la metodología empleados; el **Capítulo 4** presenta una publicación derivada de resultados del trabajo realizado durante la tesos, titulada “*Implementación de un programa de educación nutricional en un equipo de balonmano: consecuencias sobre el estado nutricional*”, *Nutr. Hosp.* 2013, 28(4):1065-1076, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889623> ; el **Capítulo 5** es el correspondiente a la publicación titulada “*Asociación entre la concentración de eritrocitos de magnesio y cinc en jugadores de balonmano de alto rendimiento después de una suplementación dietética con magnesio*”, *Magnes. Res.* 2012 Jul;25(2):79-88, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695485>; el **Capítulo 6** es el correspondiente a la publicación “*Efecto de la suplementación con ácido fólico sobre la concentración de homocisteína y su asociación con el entrenamiento en jugadores de balonmano*”, *J. Int. Soc. Sports. Nutr.* 2013,10(1):10, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432819>. Por otro lado, el **Capítulo 7** describe el estudio de suplementación con cinc, que incluye la valoración del estatus de cinc y su asociación con parámetros clínicos y biomarcadores de estrés oxidativo, así como un estudio de los cambios en la expresión génica de transportadores de cinc como consecuencia de la suplementación con cinc durante la etapa de competición, y cuyos resultados serán publicados próximamente. El **Capítulo 8** es la discusión de los resultados obtenidos en el estudio de suplementación de cinc, y el **Capítulo 9** las conclusiones del trabajo global realizado en los jugadores de balonmano estudiados. En el **Capítulo 10** se muestran las referencias bibliográficas consultadas para la elaboración del trabajo.

Capítulo 1

Hipótesis

Los jugadores de élite presentan ingestas inadecuadas en micronutrientes que derivan en situación de deficiencia y a bajos niveles de antioxidantes, alterando el estatus del resto de micronutrientes y su distribución compartimental, lo que empeora el rendimiento y la calidad de vida del deportista de alta competición.

Objetivo general

Evaluar el estatus inicial en vitaminas y minerales en un equipo de élite de balonmano, determinando su posible deficiencia, e interviniendo mediante suplementación, valorando los efectos sobre la situación antioxidante y nutricional después de la actividad deportiva intensa, con la finalidad de saber las necesidades reales y optimizar los requerimientos en estos micronutrientes que presenta esta población.

Objetivos específicos

- Evaluar la ingesta y los niveles bioquímicos clínicos, en vitaminas y en minerales de una población de jugadores de balonmano.
- Evaluar el estatus antioxidante en la población de deportistas.
- Ver los efectos de una suplementación con micronutrientes como el ácido fólico, el magnesio (Mg) y el cinc (Zn), sobre el estatus nutricional y antioxidante de la población estudiada.
- Estudiar la respuesta en la expresión génica de sus transportadores, después de la suplementación con Zn en los deportistas estudiados.

Capítulo 2

En la actualidad, la nutrición aplicada al ejercicio tiende a especializarse, de manera que, dependiendo de los objetivos finales del deporte realizado, hace hincapié

en unos u otros alimentos. A pesar de los avances en el conocimiento de la importancia que una adecuada alimentación tiene para mejorar el rendimiento físico-deportivo, los deportistas olvidan con frecuencia incluir la planificación de una dieta óptima dentro de la estrategia global de preparación para la práctica deportiva.

En el deportista de élite, una ingesta desequilibrada a corto y largo plazo puede derivar en deficiencias vitamínicas y minerales que alteran el rendimiento y la optimización de los resultados en entrenamiento de alta intensidad. Los malos hábitos alimenticios en este colectivo, podrían causar efectos adversos, por lo que la nutrición es importante para el control de este colectivo debido a que, su mayor gasto de energía, requiere un incremento adecuado de la ingesta de alimentos.

Por esta razón, es necesaria la formalización de unas recomendaciones adecuadas a cada colectivo de deportistas, promoviendo la importancia de instaurar un control ideal. Debemos acabar con la falta de información contrastada y fiable, ya que ello ayudaría a que los atletas consigan mejorar su rendimiento y calidad de vida.

En el presente estudio se trata de establecer una evaluación del estatus en vitaminas y minerales en un equipo de élite balonmano, valorando su posible deficiencia, e interviniendo mediante suplementación, estudiando los efectos sobre la situación antioxidante y nutricional después de la actividad deportiva intensa, con la finalidad de saber las necesidades reales y optimizar los requerimientos en vitaminas y minerales que presenta esta población.

Para ello se han evaluado la ingesta y los niveles bioquímicos clínicos, en vitaminas y en minerales de una población de jugadores de élite de balonmano, estudiando los efectos de una suplementación con micronutrientes como ácido fólico, magnesio y cinc, en el estatus nutricional y antioxidante de la población estudiada. Asimismo, se ha analizado la respuesta en la expresión génica de los transportadores de cinc, después de su suplementación en los deportistas.

Capítulo 3

El diseño del estudio de suplementación general (Fig. 1) es prospectivo, de seguimiento, en el que la cohorte está constituida por jugadores de balonmano varones (n=14), intervenidos a lo largo de los 12 meses iniciales (el estudio está abierto), mediante suplementación con Ácido Fólico, Magnesio y Cinc en los primeros 2 meses de cada uno de los 3 periodos de 4 meses que constituyen este trabajo.

Según nuestros resultados, el 43%, 29 %, y el 33 % de los jugadores presentaba ingesta insuficiente de fólico, Mg y Zn inicial, respectivamente, lo que puede justificar la intervención realizada en nuestro estudio.

Éste es un estudio abierto a futuras intervenciones con micronutrientes en este colectivo, con el fin de obtener resultados globales que nos den respuestas definitivas referentes a las necesidades reales en micronutrientes del deportista de actividad intensa y permita adoptar decisiones concretas respecto a las recomendaciones de ingesta para evitar desequilibrios en el estatus y sus consecuentes daños y secuelas que pueden derivar en lesiones irreversibles.

La metodología aplicada para la evaluación del estado nutricional de los deportistas incluidos en el estudio, se ha realizado mediante la valoración antropométrica, la valoración de adecuación de ingesta de nutrientes, y la valoración bioquímica, en la que se han determinado biomarcadores clínicos, nutricionales y de situación antioxidante. Esta metodología se ha aplicado tanto al inicio, como a los 2 meses con suplementación, y a los 4 meses (2 meses finales sin suplementación) de cada una de las experiencias de intervención. Así, la valoración de ingesta de nutrientes de los jugadores de balonmano se ha realizado al inicio y después de las diferentes intervenciones con suplementación.

Respecto a la suplementación con Zn, hemos realizado un estudio de expresión génica en transportadores de Zn. La monitorización de la expresión génica tanto al inicio (CI) como después de la intervención mediante suplementación (CS), se realizó mediante una técnica específicamente puesta a punto en los laboratorios del Professor Christer Hogstrand, en el King's College, UK, que, previa extracción y medida de integridad del RNA, se realizaba la síntesis de c-DNA y de primers, aplicándose la metodología q-PCR.

Capítulo 4

Debemos indicar que se ha aplicado un programa de educación nutricional a los jugadores después de observar graves desequilibrios en la ingesta debidos a malos hábitos, que, a corto o largo plazo, pudieran derivar en excesos o deficiencias que alteren el rendimiento y la calidad de vida del deportista de élite. La metodología y los resultados obtenidos durante la **Implementación del programa de educación nutricional**, se describen a continuación:

Se evaluaron el estado nutricional y los hábitos dietéticos en respuesta a la aplicación de un programa de educación nutricional en jugadores profesionales de balonmano. Es un estudio longitudinal realizado a una muestra de 14 jugadores pertenecientes a un equipo de balonmano de alto rendimiento, a los que se les evaluó mediante recordatorio de 72 horas, un cuestionario de frecuencia de consumo, medidas antropométricas a lo largo de 4 meses, y a los que se les aplicó un programa de educación nutricional al inicio del estudio. Los valores de ingesta y de frecuencia de consumo fueron comparados con las recomendaciones de macronutrientes existentes para deportistas y micronutrientes para población sana, respectivamente, y con la pirámide de alimentos para población sana española. Resultados: La ingesta de energía de los deportistas se situó por debajo de las recomendaciones a lo largo de todo el estudio. La ingesta de macronutrientes respecto a la energía ingerida, se situó por debajo de las recomendaciones para la ingesta de carbohidratos y por encima de las recomendaciones para la ingesta de grasa, mostrada en los resultados obtenidos de frecuencia de consumo de alimentos. La educación nutricional produjo un incremento significativo ($p < 0,01$) en la ingesta de energía y macronutrientes tras su aplicación. A pesar de ello, no se produjeron cambios significativos en la ingesta de macronutrientes y micronutrientes al ajustar por energía ingerida. Los niveles bioquímicos se encontraron dentro de los rangos de normalidad durante todo el estudio.

El desequilibrio en la ingesta de nutrientes presente en los jugadores de balonmano hace necesario realizar un ajuste nutricional completo para poder establecer recomendaciones específicas para este tipo de población. La aplicación de un programa de educación nutricional monitorizada de manera continuada mediante seguimiento en los deportistas, puede tener como consecuencia la instauración de hábitos nutricionales adecuados que lleve a una optimización en la ingesta. La

ausencia de recomendaciones específicas de micronutrientes en el deporte, provoca una cierta confusión a la hora de establecer una ingesta adecuada de micronutrientes, ya que en muchos casos demuestran normalidad en los niveles bioquímicos, aunque muy cercanos a la deficiencia, pudiendo comprometer el estatus de algún nutriente en situaciones de ejercicio extremo.

De acuerdo con nuestros resultados, existe una tendencia a desequilibrios y malos hábitos en la ingesta de nutrientes en los jugadores profesionales de balonmano estudiados. El programa de educación nutricional aplicado de manera continuada durante la competición para mejorar los hábitos de ingesta de alimentos, fue insuficiente para lograr un equilibrio, en cantidad y calidad, en el aporte de nutrientes a pesar de la conducta disciplinaria de esta población.

Sería aconsejable realizar estudios exhaustivos de valoración del estatus nutricional que planteen la instauración de programas de educación nutricional a largo plazo, con el fin de evitar carencias que deriven en daños irreversibles en el deportista de competición.

Capítulo 5

Respecto al estudio de **suplementación con magnesio** durante el periodo de dos meses iniciales de los 4 meses de experiencia, tanto la metodología como los resultados obtenidos, se describen a continuación:

Se analizó la carga de entrenamiento mediante el registro del volumen de entrenamiento, la intensidad y el valor de esfuerzo percibido (RPE) durante un período de cuatro meses en 14 jugadores de balonmano de alto rendimiento. La intensidad fue estudiada en diferentes niveles de tasa residual (RHR). Se analizó la ingesta de nutrientes y las concentraciones plasmáticas y eritrocitos de Mg y Zn por FAAS. Todos los biomarcadores se midieron al inicio del estudio, después de dos meses de la suplementación dietética con Mg, y después de dos meses sin suplementación. RPE se asoció con el volumen de entrenamiento en diferentes intensidades de RHR. La suplementación con Mg aumentó significativamente Mg plasma niveles durante el período suplementado y preservó de cambios posteriores en el período de no suplementado. Las concentraciones en células sanguíneas de Mg y Zn se asociaron

entre al inicio y en el periodo suplementado con Mg. Los niveles de Mg se asociaron con el volumen de entrenamiento en diferentes intensidades después de la suplementación. En conclusión, nuestros hallazgos en jugadores de balonmano de alto rendimiento muestran que durante la competición, existió una relación entre eritrocitos Zn y los niveles de Mg, independientemente de la suplementación con Mg o la ingesta de Zn. La suplementación con Mg tendió a preservar los cambios en los niveles de minerales durante el entrenamiento y la competición.

Capítulo 6

Respecto al estudio de **suplementación con ácido Fólico**, tanto la metodología como los resultados obtenidos, se describen a continuación:

Teniendo en cuenta que una actividad física extenuante puede alterar el estado de ácido fólico, vitamina directamente asociada con la homocisteína (Hcy), la alteración en este nutriente podría considerarse un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular. Los jugadores de balonmano son una población en riesgo de deficiencia de nutrientes debido a los malos hábitos alimentarios. En éste estudio los jugadores fueron controlados mediante el registro de tiempo de entrenamiento, la intensidad del entrenamiento (de acuerdo con tres niveles de tasa cardíaca residual (RHR): <60%, 60% -80% y > 80%), y la percepción subjetiva del esfuerzo (RPE), durante un período de entrenamiento de 4 meses.

Las variables nutricionales, de laboratorio y de actividad física se registraron antes y después de suplementar la dieta habitual con 200 mg de ácido fólico (50% de la cantidad recomendada diaria), y después de 2 meses sin suplementación. Se controló la carga de entrenamiento y se analizaron los cambios en las concentraciones plasmáticas de Hcy antes y después de la intervención. El análisis bivariante mostró una correlación negativa significativa ($P < 0,01$) entre las concentraciones de ácido fólico y homocisteína ($r = -0,84$) después de la suplementación, lo que refleja un cambio significativo en la concentración de Hcy ($P < 0,05$) como resultado de la hiperhomocisteinemia después de la acumulación de altas cargas de entrenamiento.

A los 4 meses, se observó una correlación negativa significativa ($P < 0.01$) entre la concentración de Hcy y el tiempo de entrenamiento con un RHR <60%, lo que indica

que el ejercicio aeróbico puede evitar cambios bruscos de Hcy y por lo tanto puede reducir el riesgo de accidentes cardiovasculares en deportistas de alto rendimiento. Por tanto, la monitorización y la educación nutricional en jugadores de balonmano son necesarias para registrar el estatus de ácido fólico, factor que afecta directamente el metabolismo de Hcy.

Por tanto, suplementar con ácido fólico podría proteger a los atletas contra las alteraciones que pueden conducir a eventos cardiovasculares relacionados con el esfuerzo durante la competición.

Capítulos 7 y 8

En el estudio de **Suplementación con Cinc**, la muestra se monitorizó en el punto inicial y tras dos meses de intervención, mediante valoraciones antropométrica, de ingesta, bioquímica, y, finalmente, de expresión génica. El presente apartado muestra los resultados correspondientes al análisis comparativo realizado en la intervención mediante suplementación con Zn.

Valoración del estatus de Zn en los deportistas

Como se mencionó en el apartado de resultados, el 33.3% de los sujetos presentaron valores deficientes de Zn en el CI, alcanzando valores normales en los niveles de Zn el 100% de los sujetos tras la suplementación. Esto podría indicarnos cómo la suplementación ha ayudado a corregir estos valores deficientes en plasma.

Se ha descrito que el ejercicio intenso puede aumentar las pérdidas de Zn como consecuencia de un aumento en la sudoración, un aumento de la degradación de proteínas musculares en atletas que entrenan de forma continua, y mediante pérdidas urinarias. En estos casos, es aconsejable, previa evaluación del estatus, una suplementación con Zn que normalice los niveles de este mineral.

Expresión Génica de los transportadores de Zn.

El análisis de la expresión génica realizado, forma parte de un estudio novedoso realizado en población deportista. En la actualidad, no existen estudios que analicen la expresión de los transportadores de Zn en esta clase de colectivo. Como se ha comentado en el apartado de antecedentes, los transportadores analizados han sido los relacionados con el Zn (SLC30 y SLC39). En nuestro estudio, el análisis de estos transportadores de Zn nos sirvió para determinar cuál de los 24 transportadores existentes, se encuentra en tejido sanguíneo humano. Hasta el momento, no hay evidencia exacta sobre la distribución de estos transportadores en sangre en población general o en deportistas.

Inicialmente, nuestra hipótesis plantea que los jugadores de élite presentan ingestas de micronutrientes inadecuadas, que derivan en situaciones de deficiencia y de bajos niveles de antioxidantes, alterando el estatus del resto de micronutrientes y su distribución compartimental, además de empeorar el rendimiento y la calidad de vida del deportista de élite. Nuestra intervención viene justificada por el hecho de que los transportadores puedan influir sobre la redistribución en tejidos desequilibrando el estatus de este mineral. Además, debido a que los valores de Zn plasmático y celular pueden verse afectados en procesos de inflamación e infección aguda, u otros factores, se podría desencadenar una fluctuación tal de los niveles, que no reflejara los depósitos tisulares reales. El estudio de transportadores de Zn, por tanto, podría reflejar el estatus de este mineral en sangre en situaciones concretas.

Los resultados obtenidos del estudio comparativo en la evolución de expresión de transportadores antes y después de la suplementación con Zn, se muestran en el *heat map*. En rojo se muestran las mayores expresiones de transportadores, observándose que la intensidad de color va disminuyendo hasta llegar al negro, donde se considera que el gen probablemente no se expresa.

En nuestro estudio los transportadores que presentan una expresión más elevada y constante en general, fueron ZNT7, el ZIP9, y el ZIP1, lo que puede confirmar la activación de procesos de regulación del Zn corporal durante el ejercicio intenso, independientemente de la suplementación realizada.

Los transportadores ZIP3, ZIP5, ZIP13 y ZIP14 aumentaron significativamente su expresión tras la intervención con Zn, posiblemente debido a la tendencia a sobre-

expresión en situación deficiente, por lo que el hecho de que estos transportadores no disminuyan su expresión tras el periodo de intervención, nos podría indicar que no se han alcanzado aún los niveles óptimos para la demanda de este mineral en los deportistas estudiados.

Dado que los niveles de ZIP14 aumentan con la inflamación aguda, los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden sugerir, que debido a los procesos inflamatorios producidos por la actividad intensa continuada y a largo plazo, podrían desencadenar un aumento en la expresión de este transportador.

La ingesta de Zn y los valores en células sanguíneas, se encontraron correlacionados positivamente con los transportadores ZIP11, ZIP13, ZIP14 al inicio del estudio, sugiriendo que una ingesta deficiente o unos valores bajos de Zn en células sanguíneas se asocian a unos valores de expresión más elevados, mientras que a mayores niveles de ingesta y de Zn en células sanguíneas, menores niveles de expresión, lo que confirma el posible papel de este transportador como biomarcador del estatus de Zn en humanos.

Como resumen, podemos afirmar que la intervención mediante suplementación con Zn en los deportistas que forman parte del estudio, ha producido efectos significativos en la expresión génica de la mayoría de los transportadores de Zn presentes en las membranas celulares, promoviendo la movilización de este mineral hacia los compartimentos y favoreciendo su redistribución tisular para cubrir las demandas derivadas tanto del estatus deficiente del que parten los deportistas como del ejercicio de alta intensidad que realizan.

Capítulo 9

Conclusión final

Nuestra hipótesis plantea que los jugadores de élite presentan ingestas de micronutrientes inadecuadas, que derivan en situaciones de deficiencia y de bajos niveles de antioxidantes, alterando el estatus del resto de micronutrientes y su distribución compartimental, lo que empeoraría el rendimiento y la calidad de vida del deportista de élite.

El estudio de transportadores en el que se intervino con Zn viene justificado por su posible influencia sobre la redistribución en tejidos, desequilibrando el estatus de este mineral. Además, debido a que los valores de Zn plasmático y celular pueden verse afectados en procesos de inflamación e infección aguda, u otros factores, se podría desencadenar una fluctuación tal de los niveles, que no reflejara los depósitos tisulares reales. El estudio de transportadores de Zn, por tanto, podría reflejar el estatus de este mineral en sangre en situaciones concretas.

Es importante un ajuste de las recomendaciones de micronutrientes existentes en deportistas, estableciendo las cantidades precisas de minerales y vitaminas, dada su implicación en mecanismos básicos del equilibrio orgánico, aproximando dichos niveles a los requerimientos reales para la situación tan especial que representa el atleta élite, y monitorizando los niveles plasmáticos como posibles variables predictoras de alteraciones causadas por una deficiencia de las mismas.

SUMMARY OF THE THESIS

SUMMARY OF THE THESIS

Structure in the development of the thesis:

This thesis is divided into chapters, each one of which is responsible for explaining the stages of development of the thesis project, among which include **Chapter 1**, which presents the Rationale, Hypothesis and Objectives of the work; the **Chapter 2**, the Background Bibliographic that provide detailed information on the topic of the thesis project justifying performed; **Chapter 3** describes the section that reports on population and methodology; **Chapter 4** presents a publication derived from results of work performed during the thesis, entitled "Implementation of a nutrition education program in a handball team: impact on nutritional status", *Nutr. Hosp.* 2013, 28(4):1065-1076, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889623>; **Chapter 5** is the one corresponding to the publication entitled "Association between erythrocyte concentration of magnesium and zinc in handball players performance after dietary supplementation with magnesium" *Magnes. Res.* 2012 Jul;25(2):79-88, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695485>; **Chapter 6** is the corresponding to the publication "Effect of folic acid supplementation on homocysteine and its association with the handball players in training", *J. Int. Soc. Sports. Nutr.* 2013,10(1):10, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432819>. **Chapter 7** describes the study of zinc supplementation, including zinc status assessment and their association with clinical parameters and biomarkers of oxidative stress as well as a study of changes in gene expression zinc transporter as a result of zinc intervention during the stage of competition, and the results will be published shortly. **Chapter 8** is a discussion of the results obtained in the study of zinc supplementation, **Chapter 9** overall conclusions of the work carried out in the studied handball players, and **Chapter 10** lists the references consulted in the preparation of the work.

Chapter 1

Hypothesis

Elite players have inadequate micronutrient intakes that result in deficiency status and low antioxidant levels, altering the status of other micronutrients and

compartmental distribution, which worsens the performance and quality of life of elite athletes.

Objective

Evaluate initial status in vitamins and minerals in an elite team handball, determining their possible impairment, and intervening through supplementation, assessing the effects on antioxidant and nutritional status after intense sports activity, in order to know the real needs and optimize these micronutrient requirements presented by this population.

Specific Objectives

- To assess intake and clinical biochemical levels, vitamins and minerals in a population of handball players.
- To evaluate the antioxidant status in athletes' population.
- To view the effects of supplementation with micronutrients like folic acid, magnesium (Mg) and zinc (Zn) on the nutritional and antioxidant status of the study population.
- To study the gene expression response of Zn-carriers, after zinc supplementation in athletes studied.

Chapter 2

Currently, nutrition applied to exercise tends to specialize so that, depending on the ultimate goals of sport performed, emphasizes one or other foods. Despite advances in the understanding of the importance of proper nutrition is to improve sport performance, athletes often forget to include planning an optimal diet within the overall strategy of preparation for sports. In the elite athlete, short and long term unbalanced intake can lead to vitamin and mineral deficiencies that impair the performance and optimization results in high intensity training. Poor eating habits in this group could cause adverse effects, so that nutrition is important for the control of this group due to its higher energy, requires an appropriate increase in food intake. For this reason, it is necessary to formalize suitable recommendations to each group of athletes, promoting the importance of establishing ideal control. We must overcome the lack of proven and reliable information, as this would help athletes improve their performance and achieve quality of life.

In the present study attempts to establish an assessment of the status of vitamins and minerals in an elite team handball, assessing their potential deficiency, and intervening through supplementation, studying the effects on antioxidant and nutritional status after intense sports activity with order to know the real needs and optimize vitamin and mineral requirements presented by this population. It has been assessed intake and clinical biochemical levels, vitamins and minerals in a population of elite handball players, studying the effects of supplementation with micronutrients like folic acid, magnesium and zinc in nutrition and antioxidant status of the study population. We also analyzed the gene expression response of zinc transporters, after supplementation in athletes.

Chapter 3

The overall study design (Fig. 1) is a prospective follow-up, in which the cohort is composed of male handball players (n = 14), operated over the initial 12 months (open study), by supplementation with folic acid, magnesium and zinc in the first two months of each of the three periods of four months to make this work.

Nutritional assessment of the athlete methodology was carried out in laboratories of the Institute of Nutrition of University of Granada.

According to our results, 43%, 29%, and 33% of the players had inadequate initial intake of folic Mg and Zn, respectively, which may justify the intervention in our study.

This is a study open to future interventions through micronutrient supplementation in this type of group, in order to obtain global results give us definitive answers regarding the real needs of micronutrient in the intense activity athlete, and allow concrete decisions regarding intake recommendations for avoid imbalance in the status, and consequent damage and effects that can lead to irreversible damage. The methodology used for assessing the nutritional status of athletes included in the study, was performed using anthropometric evaluation, assessment of adequacy of nutrient intake and biochemical assessment, which have been identified clinical biomarkers, nutritional and antioxidant status. This methodology has been applied to both the beginning as at 2 months with supplementation, and 4 months (2 months late without

supplementation) of each intervention experiences. Thus, the assessment of nutrient intake of handball players was performed at baseline and after supplementation of different interventions. Regarding Zn supplementation, we studied gene expression of Zn transporters. Monitoring of gene expression both at baseline (CI) and after the intervention by supplementation (CS), was performed using a technique specifically engineered in the laboratory of Professor Christer Hogstrand at King's College, UK, which follows a protocol: after extraction and measurement of RNA integrity, c-DNA and primers synthesis was performed, and applied q-PCR methodology.

Chapter 4

We must indicate that it has been implemented a nutrition education program to players after observing severe imbalances in intake due to bad habits, that in the short or long term, could lead to excesses or deficiencies that impair the performance and quality of life in elite athlete. The methodology and results obtained during the implementation of the nutrition education program are described below:

We assessed the nutritional status and dietary habits in response to the implementation of a nutrition education program in professional handball players. It is a longitudinal study of a sample of 14 players from a team of high performance handball, which were evaluated by 72-hour recall food frequency questionnaire, anthropometric measurements over 4 months, at baseline. The values of intake and frequency of consumption were compared with existing recommendations of macronutrients for athletes and micronutrients for non-athletes population, and the food pyramid for healthy Spanish population. The energy intake of athletes was below the recommendations throughout the study. Macronutrient intake on energy intake was below the recommendations for carbohydrate intake, and above recommendations for fat intake. Nutrition education was a significant increase ($p < 0.01$) on energy and macronutrient intake after application. However, there were no significant changes in macronutrient and micronutrient intake after adjustment for energy intake. Biochemical levels were within normal ranges throughout the study.

The imbalance in the intake of nutrients present in handball players necessary to make a complete nutritional adjustment to provide specific recommendations for this population. The implementation of a nutrition education program continuously

monitored by tracking athletes can result in the establishment of proper nutritional habits that lead to an optimization of the intake. The absence of specific recommendations of micronutrients in sport, causes some confusion when establishing adequate intake of micronutrients, since in many cases show normal biochemical levels, although very close to the deficiency, can compromise the status of some nutrient in situations of extreme exercise.

According to our results, there is a tendency to bad habits imbalances and nutrient intake in professional handball players studied. The nutrition education program continuously applied during the competition to improve food intake habits, was insufficient to balance quantity and quality, in the nutrient despite the disciplinary behaviour of this population. It would be advisable to undertake comprehensive assessment of nutritional status to raise the introduction of nutrition education programs in the long term, in order to avoid deficiencies that result in irreversible damage to the competitive athlete.

Chapter 5

Regarding the study of magnesium supplementation during the initial two months 4 months of experience, both the methodology and the results obtained are described below:

We analyzed the training load by recording the training volume, intensity and value of perceived exertion (RPE) during a period of four months in 14 performance handball players. The intensity was studied at different levels of residual rate (RHR). We analyzed nutrient intake and plasma and erythrocyte Mg and Zn by FAAS. All biomarkers were measured at baseline, after two months of dietary supplementation with Mg, and after two months without supplementation. RPE was associated with the volume of training at different intensities of RHR. Mg supplementation significantly increased plasma Mg levels and supplemented during the subsequent changes preserved the unsupplemented period.

Blood cell concentrations of Mg and Zn were associated in the beginning and in the period supplemented with Mg. Mg levels were associated with the volume of training at different intensities after supplementation. In conclusion, there is a

relationship between erythrocytes Zn and Mg levels, regardless of dietary intake Mg or Zn. Mg supplementation tended to preserve the changes in mineral levels during training and competition.

Chapter 6

Regarding the study of folic acid supplementation, both the methodology and the results obtained are described below:

Given that strenuous physical activity can alter the state of folic acid, vitamin directly associated with homocysteine (Hcy), alteration in the nutrient may be considered a risk factor for cardiovascular disease. The handball players are a population at risk of nutrient deficiency due to bad dietary habits. In this study the players were monitored by recording training time, training intensity (according to three levels of residual heart rate (RHR): <60%, 60% -80% and > 80%), and perceived exertion (RPE) during a training period of four months. Nutritional, laboratory and physical activity variables were recorded before and after the usual diet supplemented with 200 mg of folic acid (50% of the recommended daily amount), and after 2 months without supplementation. Training load was controlled and analyzed changes in plasma Hcy concentrations before and after the intervention. Univariate analysis showed a significant negative correlation ($P < 0.01$) between the concentrations of folate and homocysteine ($r = -0.84$) after supplementation, reflecting a significant change in the concentration of Hcy ($p < 0.05$) as a result of hyperhomocysteinemia after accumulation of high training loads.

At 4 months, there was a significant negative correlation ($P < 0.01$) between the concentration of Hcy and the training time with RHR <60%, indicating that aerobic exercise can prevent sudden changes in Hcy and therefore may reduce the risk of cardiovascular events in high-performance athletes. Therefore, the monitoring and nutrition education in handball players are required to record the status of folic acid, a factor that directly affects the metabolism of Hcy. Therefore, folic acid supplementation could protect athletes against disturbances that can lead to cardiovascular events related to the effort during the competition.

Chapters 7 and 8

In the study of zinc supplementation, the sample was monitored at the start and after two months of intervention, using anthropometric, intake, biochemistry assessments, and finally, gene expression. This section shows the results for the comparative analysis performed in the intervention by Zn supplementation.

Assessment of the Zn status in athletes

As mentioned in the results section, 33.3% of subjects had initial deficient values of Zn, reaching normal values in Zn levels to 100% of subjects after supplementation. This could indicate how supplementation has helped to correct these deficient plasma values.

It has been described that intense exercise can increase Zn losses as a result of increased sweating, increased muscle protein degradation in continuously training athletes, and by urinary leakage. In these cases, after evaluation of status, it is advisable Zn supplementation to normalize the levels of this mineral.

Gene Expression Zn transporters.

The gene expression analysis performed is part of a new study conducted in population athlete. Currently, there are no studies analyzing the expression of Zn transporters in this population. As discussed in the background section, the transporters analyzed were related to the Zn (SLC30 and SLC39).

In our study, the analysis of these Zn transporters helped us to determine which of the 24 existing transporters is in human blood tissue. So far, there is no exact evidence on the distribution of these transporters in blood in general population and in athletes. Initially, our hypothesis is that the elite players have inadequate intake of micronutrients, which result in failure situations, low levels of antioxidants, altering the status of the rest of micronutrient compartmental distribution, besides degrading performance and quality of elite athlete's life.

Our intervention is justified by the fact that transporters may influence tissue redistribution unbalancing the status of this mineral. Furthermore, because the values of plasma Zn and cellular processes may be affected in acute inflammation and infection, or other factors, it could trigger a fluctuation such levels that did not reflect actual tissue deposits. Study of Zn transporters thus may reflect the status of this mineral in blood in specific situations.

The results of a comparative study in the evolution of transporter expression before and after supplementation with Zn, are shown on the *heat map*. In red are shown the greatest expressions of transporters, noting that the color intensity decreases until the black, which is considered unlikely that the gene is expressed.

In our general study, the transporters that have a constant high expression were ZNT7, ZIP9 and ZIP1, which can confirm the activation of processes regulating body Zn during intense exercise, regardless of supplementation performed.

Transporters ZIP3, ZIP5, ZIP14 ZIP13 significantly increased their expression after intervention with Zn, possibly due to the tendency to over-expression in poor state, so if these transporters do not decrease its expression after the intervention period we could indicate that not yet reached optimal levels of demand for this mineral in athletes studied. Since ZIP14 levels increase with acute inflammation, the results obtained in our study may suggest that due to these processes produced by long-term continuous intense activity, may trigger an increase in expression of this transporter.

Zn intake and blood cell values were found positively correlated with transporters ZIP11, ZIP13, ZIP14 at baseline, suggesting that a deficient intake or low values of Zn blood cells are associated with higher expression values high, while higher levels of Zn intake and blood cells, lower expression levels. This confirms the potential role of this transporter status as a biomarker of human Zn.

To summarize, we may say that the intervention by Zn supplementation in athletes studied, produced significant effects on gene expression of most Zn transporters present in the cell membranes to promote the mobilization of the mineral to compartments and promoting tissue redistribution to meet the demands arising from both deficient status and high-intensity exercise.

Chapter 9

Final Conclusion

Our hypothesis is that elite players have inadequate intakes of micronutrients, which are derived in situations of deficiency and low levels of antioxidants, altering the status of other micronutrients and compartmental distribution and worsening the performance and quality of life in elite athlete.

The study of transporters which intervened Zn is justified by its potential influence on the redistribution in tissues, throwing the status of this mineral. Furthermore, because the values of plasma Zn and cellular processes may be affected in acute inflammation and infection, or other factors, it could trigger a fluctuation such levels that did not reflect actual tissue deposits. Study Zn transporters thus may reflect the status of this mineral in blood in specific situations.

It is important adjusting of micronutrient recommendations in athletes, establishing the precise intake of amounts of minerals and vitamins, given their involvement in basic mechanisms of organic balance, approaching these levels to the actual requirements for the special situation that represents the elite athlete, and monitoring plasma levels as possible predictors of disorders caused by a deficient status.

Capítulo 1

Justificación, Hipótesis y Objetivos

1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

La nutrición deportiva es una rama especializada de la nutrición humana aplicada a las personas que practican deporte de manera regular. En la actualidad, la nutrición aplicada al ejercicio tiende a especializarse, de manera que, dependiendo de los objetivos finales del deporte realizado, hace hincapié en unos u otros alimentos y en diferentes cantidades. A pesar de los avances registrados en el campo de la nutrición deportiva y la importancia que una adecuada alimentación tiene para mejorar el rendimiento físico-deportivo, los deportistas olvidan con frecuencia incluir la planificación de una dieta óptima dentro de la estrategia global de preparación para la práctica deportiva.

En el deportista de élite, una ingesta desequilibrada a corto y largo plazo puede llevar a deficiencias vitamínicas y minerales que alteran el rendimiento y la optimización de los resultados en entrenamiento y competición. Los malos hábitos alimentarios en este colectivo, podrían causar efectos adversos, por lo que la alimentación equilibrada es imprescindible para un control adecuado del estado nutricional en este colectivo.

Por esta razón, es necesaria la formalización de unas recomendaciones adecuadas a cada colectivo de deportistas, destacando la importancia de una monitorización estandarizada. Debemos acabar con la falta de información contrastada y fiable, ya que ello ayudaría a que los atletas consigan mejorar su rendimiento y calidad de vida.

Hipótesis

Los jugadores de élite presentan ingestas inadecuadas en micronutrientes que derivan en situación de deficiencia y a bajos niveles de antioxidantes, alterando el estatus del resto de micronutrientes y su distribución compartimental, lo que empeora el rendimiento y la calidad de vida del deportista de alta competición.

Objetivo general

Evaluar el estatus inicial en vitaminas y minerales en un equipo de élite de balonmano, determinando su posible deficiencia, e interviniendo mediante suplementación, valorando los efectos sobre la situación antioxidante y nutricional después de la actividad deportiva intensa, con la finalidad de saber las necesidades reales y optimizar los requerimientos en estos micronutrientes que presenta esta población.

Objetivos específicos

- Evaluar la ingesta y los niveles bioquímicos clínicos, en vitaminas y en minerales de una población de jugadores de balonmano.
- Evaluar el estatus antioxidante en la población de deportistas.
- Ver los efectos de una suplementación con micronutrientes como el ácido fólico, el magnesio (Mg) y el cinc (Zn), sobre el estatus nutricional y antioxidante de la población estudiada.
- Estudiar la respuesta en la expresión génica de sus transportadores, después de la suplementación con Zn en los deportistas estudiados.

Capítulo 2

Antecedentes Bibliográficos del Estudio

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DEL ESTUDIO.

2.1. Requerimientos y recomendaciones nutricionales en deporte.

La nutrición desempeña un papel fundamental a lo largo la vida del deportista, siendo importante para el normal crecimiento y desarrollo, y para el mantenimiento de una buena salud ayudando a optimizar tanto la producción de energía, como el control y la eficiencia en el deporte.¹

El rendimiento y la nutrición, están íntimamente relacionados ya que una óptima adaptación a las demandas de sesiones continuas de entrenamiento, requieren de una dieta para mantener las reservas de energía muscular.² Una alimentación inadecuada podría, por tanto, contribuir a lesiones deportivas^{1,3,4} Existen dos métodos empleados con frecuencia para determinar la interacción entre actividad física y dieta. El primero, se basa en administrar diferentes nutrientes en los individuos que realizan actividad física, para monitorizar su respuesta fisiológica y de rendimiento. La otra trata de determinar los efectos que la actividad física sobre dieta.^{5,6}

2.1.1. Requerimientos de energía y macronutrientes en deporte.

Los atletas necesitan consumir suficiente energía para mantener un peso adecuado y preservar una composición corporal equilibrada.^{7,8} Una ingesta inadecuada de energía en relación al gasto compromete el rendimiento y la obtención de beneficios derivados del entrenamiento. El gasto energético total (GET) de un deportista va a depender del tipo de ejercicio, la duración, la frecuencia e intensidad del ejercicio, el sexo del deportista, y el estado nutricional previo.⁷⁻⁹

2.1.1.1. Requerimientos de CHO en deporte.

Los hidratos de carbono (CHO) son la principal fuente de energía para el organismo durante el ejercicio intenso. Durante el ejercicio, los CHO almacenados como glucógeno muscular se utilizan como fuente de energía para el músculo.¹⁰ En el hígado, el glucógeno se reconvierte mediante la glucogenolisis en glucosa, que pasa

del torrente sanguíneo al músculo. Cuando el glucógeno se encuentra agotado durante el ejercicio, tiende a aumentar la formación hepática de glucosa a partir de otros sustratos, como el glicerol procedente del tejido adiposo o los aminoácidos del músculo. Existe una estrecha asociación entre la ingesta dietética de CHO con la concentración de glucógeno muscular, y con la capacidad de resistencia en el ejercicio.^{11,12}

Los valores de ingesta recomendados para CHO oscilan entre 6-10 g/kg/día^{3,7,8,13,14} En general las recomendaciones son del 50% al 60% de la ingesta total de energía.^{7,8,15} En deportes en los que este macronutriente es el combustible principal, que entrenan de forma continua, o compiten en eventos de resistencia prolongada, se recomienda consumir una dieta en la que el 60-70% de las calorías consumidas provengan de los CHO.¹⁵

La cantidad de glucógeno almacenada en el organismo es muy inferior a que se puede obtener a partir de la reserva de lípidos. Sin embargo, la reserva de CHO es indispensable, ya que la glucosa es un sustrato energético, que a diferencia de los lípidos, puede utilizarse en ausencia de oxígeno, y por otro lado, los tejidos como cerebro o células sanguíneas no son capaces de utilizar los lípidos como fuente de energía.

En general, la utilización de CHO aumenta con la intensidad del ejercicio y disminuye con la duración del mismo. Incluso en ejercicio de larga duración es necesaria su aporte, especialmente al comienzo de la prueba, disminuyendo a lo largo del ejercicio su disponibilidad, dando paso a la utilización de lípidos. Cuando el ejercicio es demasiado prolongado, pueden aparecer situaciones de hipoglucemia debido a la falta de glucosa en cerebro, pudiendo llevar al agotamiento de reservas que posiblemente deriven en colapso.

2.1.1.2. Requerimientos de proteínas en deporte.

La disponibilidad de proteínas es fundamental para la optimización de muchas de las adaptaciones que tienen lugar en el músculo en respuesta a la intensidad y a la resistencia del entrenamiento.² Una ingesta proteica adecuada se define como aquella que (l) permite el funcionamiento máximo de todos los procesos en el cuerpo,

sobre todo la síntesis proteica; (II) no promueve aumentos significativos en la síntesis de urea y la oxidación de aminoácidos, lo que crearía una situación de exceso de oxidación de aminoácidos y pérdida de nitrógeno, o la excesiva dependencia de la oxidación de proteínas durante el ejercicio, y (III) permitir una adaptación física beneficiosa bajo ciertas condiciones tales como la restricción calórica.¹⁶

En el caso del aporte proteico, los requerimientos suelen ser mayores, no solo por la mayor cantidad de masa muscular, sino por un mayor grado de proteolisis muscular debido a la situación hormonal presente durante el ejercicio físico.¹⁰ Entre estas hormonas aumenta las de acción proteolítica como el cortisol, glucagón, y disminuye la hormona anabolizante insulina. Incluso en la recuperación y reposo después del ejercicio físico todavía perduran fenómenos de degradación proteica.

Las demandas proteicas varían en función de la modalidad deportiva, pudiendo establecerse que para individuos adultos deportistas, la recomendación se sitúa entre 1.2-1.7 g/kg/día, dependiendo del estrés y de la cantidad de masa muscular.^{7,8} Esta cantidad es un 20% mayor que la recomendación normal para una persona adulta no deportista (0.8 g/kg/día).¹⁷

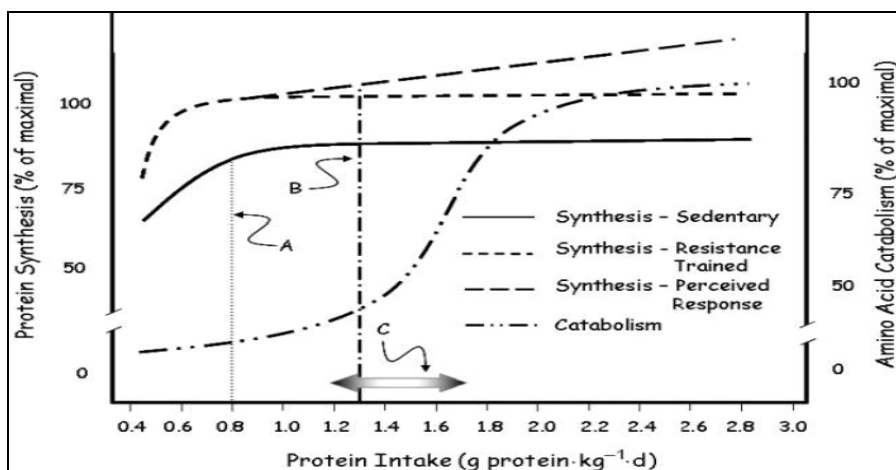


Figura 1: Relación entre la ingesta de proteínas y el funcionamiento máximo de procesos de síntesis de proteína. Sedentarios (línea continua); atletas entrenados en fuerza (corta línea discontinua); relación percibida entre proteínas de la dieta y funcionamiento máximo de la síntesis de las proteínas del cuerpo en atletas de resistencia entrenados (línea larga discontinua); relación entre la ingesta proteica de la dieta y el catabolismo de aminoácidos; síntesis de urea (línea discontinua con puntos dobles). (A) RDA (Ingesta Dietética Recomendada) de proteína dietética; (B) ingesta estimada de proteína en atletas de entrenamiento de resistencia; (C) rango de ingesta de proteínas donde se obtiene mejoras en la adaptación metabólica.¹⁶

En atletas con entrenamiento de fuerza las recomendaciones son similares, pudiendo llegar hasta valores de 2 g/kg/día. En deportes de resistencia, además se requerirá un aporte adicional de proteína debido a la oxidación de aminoácidos por parte del músculo. Si el ejercicio es muy prolongado, la baja disponibilidad de glucógeno llevará a una mayor oxidación de aminoácidos musculares.^{7,8,14}

Las necesidades proteicas tienen una relación directa con el aporte energético. La cantidad de proteínas en una dieta equilibrada deben representar entre un 10-15% de la energía total consumida,¹⁶ incluso, llegando a sugerirse hasta un 19% con la finalidad de obtener un buen rendimiento deportivo.¹⁰

2.1.1.3. Requerimientos de lípidos en deporte.

La grasa es un macronutriente esencial que proporciona energía a partir de una de β -oxidación,¹⁰ constituyendo la segunda de las principales fuentes de energía empleadas durante el ejercicio. La importancia de las grasas como fuente de energía es relativa, ya que depende del grado de esfuerzo, así como de la disponibilidad de CHO. La cantidad de glucógeno muscular utilizada para la producción de energía destinada a la contracción del músculo, depende del grado de entrenamiento y de la duración e intensidad del ejercicio.¹⁸

El aporte de grasa deben representar de modo general entre un 20-30% de la energía total, debiendo predominar dentro del perfil del perfil de ácidos grasos (AG) los monoinsaturados (AGM) frente a los saturados (AGS) y poliinsaturados (AGP). Se sugiere que por razones de salud las grasas no deben superar el 30% del total de la energía ingerida, recomendándose que menos del 10% proceda de AGS.^{7,8} Debe prestarse especial atención a los AGP, ya que favorecen la oxidación de las membranas celulares, dado que el ejercicio físico implica, por sus elevados requerimientos de oxígeno, un incremento del estrés oxidativo, lo cual deriva un riesgo evidente de padecer alguna enfermedad relacionada con dicho estrés a largo plazo.^{18,19}

Además de la poca reserva de energía procedente de los fosfatos, que es capaz de suministrar energía durante un periodo máximo de 15 segundos, la mayoría

de la energía liberada durante el trabajo muscular se deriva de las dos fuentes de combustibles anteriormente mencionadas (grasas y CHO).

Según la intensidad del ejercicio, uno de estos combustibles puede pasar a ser el principal proveedor de energía:^{18,20}

- En reposo, prácticamente la totalidad de la energía que se necesita para el metabolismo basal (TMR) se deriva de las grasas, con excepción de la requerida por el sistema nervioso central y glóbulos rojos, que dependen de la glucosa sanguínea.²¹ La relación de suministro de energía en esta situación puede ser del 90% grasa y 10% CHO.
- Durante una actividad intensa, el organismo movilizará glucosa desde la reserva de glucógeno del músculo para conseguir energía. La movilización de AG dependerá del tiempo y duración del ejercicio. A mayores intensidades, el organismo comenzará a utilizar cada vez más CHO.²¹ Esto significa que durante las actividades deportivas de alta intensidad, los CHO, pasan a ser el combustible más importante. La relación entre grasa y CHO puede alcanzar el 30 y 70% respectivamente.
- Durante ejercicios de baja intensidad, la energía utilizada proviene principalmente del metabolismo de las grasas, a partir de la oxidación en mayor proporción de ácidos grasos libres (AGL). Las fibras de contracción lenta poseen mayor concentración de triglicéridos (TG), debido a su naturaleza aeróbica.

El nivel óptimo de oxidación de las grasas, se obtiene a partir del equilibrio entre la máxima oxidación de grasas y el máximo consumo, encontrándose el nivel aconsejado en el 60% del VO_2 máximo a una frecuencia cardiaca entre el 70-75% de la máxima.

Un aumento en la utilización de las grasas como fuente de energía durante ejercicios de resistencia permitirá al atleta reducir el empleo de los CHO para una intensidad constante de ejercicio. Esto ahorrará CHO endógenos y retrasará la aparición de fatiga.²²

En el deportista, el incremento de la oxidación de los lípidos inducida por el entrenamiento, supone un ahorro energético de glucógeno de gran importancia para la mejora del rendimiento deportivo, ya un mejor nivel de entrenamiento empleará

durante más tiempo las grasas como sustrato oxidativo, y dispondrá más glucógeno disponible para la última fase de la competición.

2.1.2. Requerimientos de vitaminas y minerales en deporte.

Los micronutrientes también juegan un papel importante en la obtención de energía durante el ejercicio. Igualmente, son importantes en procesos de síntesis de hemoglobina, de mantenimiento de la salud de los huesos, de la función inmunológica y protección del cuerpo contra el daño oxidativo. Favorecen la síntesis y reparación del tejido muscular durante el ejercicio y potencian la recuperación de la lesión.^{7,8} Debido a que la tasa metabólica incrementa durante la actividad física, el suministro adecuado de micronutrientes es necesario para promover un rendimiento físico óptimo.²³

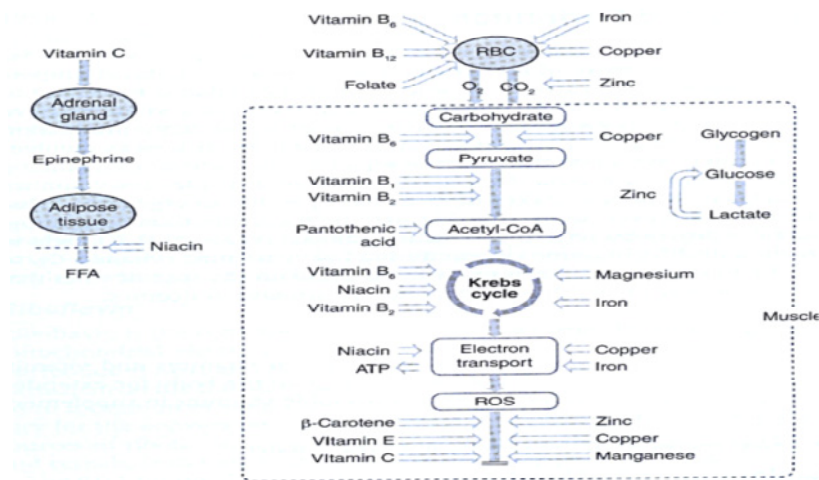


Figura 2: Funciones micronutrientes para individuos en relación con el ejercicio.

Existen pocos estudios que establezcan conclusiones razonables sobre la asociación entre los vitaminas y el rendimiento durante la actividad física. Se hace necesaria la realización de la evaluación del estado nutricional en este tipo de poblaciones mediante valoraciones de ingesta, antropométricas y bioquímicas.²³ En contraste a lo que ocurre con las vitaminas, hay datos crecientes sobre la interacción entre el estado nutricional mineral y la actividad física. El papel de algunos minerales

como el hierro (Fe), Mg, Zn, y cromo (Cr) en el rendimiento, han sido previamente descritos.²⁴

A pesar de ello, en la actualidad no existen recomendaciones específicas de micronutrientes para atletas, y debido a la gran multitud de deportes que existen, se hace difícil establecer unas recomendaciones específicas para cada deporte. La Tabla I muestra las funciones y recomendaciones dietéticas de micronutrientes para individuos en relación con el ejercicio.

Nutriente	Función	H	M	AF	ER
Vitaminas					
Tiamina (B1)	Reacción en vías de producción de energía	1.2	1.1	Si	Evidencia limitada
Riboflavina (B2)	Transferencia de electrones en la producción oxidativa	1.3	1.1	No	Pequeños efectos ^b
Niacina	Transferencia de electrones en la producción oxidativa de energía	16	14	No	-
Piridoxina (B6)	Degradación de aminoácidos y glucógeno	1.3	1.3	Si	Pequeños efectos ^c
Cianocobalamina (B12)	Reciclaje de folato y la síntesis de hemoglobina	2.4	2.4	No	-
Folato	Regeneración celular y síntesis de hemoglobina	400	400	No	-
Ácido Ascórbico (Vit. C)	Antioxidante	90	75	Si	Efecto no demostrados ^d
Retinol (Vit. A)	Antioxidante	900	700	No	-
Tocoferol (Vit. E)	Antioxidante	15	15	Si	-
Minerales					
Hierro	Producción de energía aerobia	8	18	Si	Incremento de las necesidades ^e
Magnesio	Producción de energía aerobia	400	310	Si	Efectos limitados ^f
Zn	Metabolismo energético e intercambio de gases	11	8	No	Efectos limitados ^g
Cobre	Metabolismo del Fe, producción de energía aerobia y antioxidante	900	900	No	-
Fósforo	Metabolismo energético	700	700	No	-
Selenio	Antioxidante	55	55	No	-

H = Hombre; M = Mujer; AF = Considerada en actividad física; ER = Efecto en los requerimientos; a = evidencias limitadas sobre el incremento de las necesidades con el ejercicio prolongado; b = incremento del rendimiento en sujetos suplementados con B2 con un estatus previo bajo; c = basado en la disminución en el estatus de B6 en atletas y no en el requerimiento; d = basado en la actividad física y el estatus de vitamina C; e = incremento de la ingesta regular a alta en ejercicio (30-70%), efectos beneficiosos en personas deficientes; f = limitada evidencia sobre los efectos de la depleción del Mg y algunas mediciones del rendimiento; g = limitada evidencia sobre los efectos del estatus de Zn y algunas mediciones del rendimiento.

Tabla I: Funciones y recomendaciones dietéticas de micronutrientes para individuos en relación con el ejercicio.

De igual manera, se muestra a continuación en la Tabla II, ciertos micronutrientes en los que describen la función de cada uno en el ejercicio y la adecuación de ingesta.²⁵

Nutriente	Función	H	M	AF	ER
Vitaminas					
Vitamina D	Absorción de Ca y utilización	5	5	No	-
Vitamina K	Coagulación y formación del hueso	120	90	No	-
Biotina	Gluconeogénesis	30	30	No	-
A. Pantoténico	Síntesis de glucógeno	5	5	No	-
Minerales					
Calcio	Formación del hueso	1000	1000	Si	Evidencia insuficiente
Flúor	Desconocida	4	3	No	-
Cromo	Facilitador de insulina	35	25	No	-
Manganeso	Antioxidante	2.3	1.8	No	-
Sodio	Regulación de fluidos, conducción nerviosa, y contracción muscular	1.5	1.5	Si	-
Potasio	Regulación de fluidos, transporte de glucosa, almacenamiento de glucógeno y producción de ATP	4.7	4.7	No	-
Cloro	Regulación de fluidos, conducción nerviosa, y contracción muscular	2.3	2.3	Si	-

Tabla II: Funciones y adecuaciones dietéticas de micronutrientes para individuos (19-50 años) en relación con el ejercicio.

Las personas físicamente activas deben consumir una dieta variada en alimentos, para favorecer el aporte óptimo y equilibrado de vitaminas y minerales eliminando la necesidad de ingerir suplementos nutricionales. Sólo las personas con una deficiencia o deficiencias de nutrientes definidos se beneficiarán de la administración de suplementos de este nutriente limitante.²³

2.1.3. Balonmano como deporte de equipo.

Los requerimientos nutricionales en el jugador de balonmano, al igual que otros deportes de equipo, están determinados por el entrenamiento y la competición. Las reglas de cada deporte van a condicionar los requerimientos específicos del jugador.²⁶ Así, el terreno de juego, la duración, la frecuencia de partidos, duración de la

temporada, la fase de entrenamiento, número de jugadores, y sustituciones permitidas, influirán en dichos requerimientos.

La característica primordial de este tipo de deportes es la combinación de patrones de actividad intermitente, en el que existen fases de juego a alta intensidad combinados con pausas de descanso o períodos de baja actividad (*deportes de stop-and-go*),²⁷⁻²⁹ sugiriendo que tanto el sistema aeróbico, como el anaeróbico, utilicen los hidratos de carbono (CHO) de la dieta como fuente principal de combustible.³⁰ Además, la fuerza, y principalmente la potencia, van a ser factores determinantes debido a las continuas ráfagas de carreras cortas que terminan en contacto, conllevando un gasto adicional de energía.³¹

En balonmano, el calendario competitivo con continuas sesiones de entrenamiento y competición, unido a los continuos viajes que deben realizarse, hacen que el aporte de nutrientes se vea en riesgo de desequilibrio.²⁶ En otros deportes de equipo, además del balonmano, existe una tendencia a incrementar en tamaño los jugadores, conforme aumenta el nivel de competitividad,^{32,33} por lo que los requerimientos nutricionales también se verán comprometidos.

2.2. Evaluación del estado nutricional en el deportista.

2.2.1. Valoración de la adecuación de ingesta de nutrientes.

Un estudio de valoración de adecuación de ingesta de nutrientes de un individuo, se basa en el conocimiento del consumo de alimentos y bebidas, y de la ingesta de energía, abarcando tanto el aporte de macronutrientes como de micronutrientes, comparando con las recomendaciones específicas para la edad y el sexo. Esto nos dará la información necesaria para saber la adecuación de ingesta real de esa persona.¹⁸

Aunque todos los métodos de valoración del estado nutricional (VEN) sean útiles, la valoración de adecuación de ingesta es el primero en realizarse puesto que una ingesta inadecuada podría ocasionar a medio o largo plazo alteraciones a nivel antropométrico y bioquímico.³⁴

Los objetivos de este tipo de valoración, son los siguientes:

- Conocer los hábitos alimentarios de la población y los factores que los determinan.
- Conocer la distribución del consumo de alimentos y las razones que la motivan.
- Determinar la ingesta energética y nutricional, estableciendo el grado de adecuación a las ingestas recomendadas y requerimientos medios.
- Identificar aquellos componentes en la dieta que se asocian a riesgo de enfermedad.

Entre los métodos más empleados para determinar la ingesta de nutrientes, podemos destacar:¹⁸

El recuerdo de 24 horas consiste en preguntar al individuo entrevistado sobre los alimentos consumidos, tanto cualitativa como cuantitativamente, durante el periodo de 24 horas del día anterior a la realización de la entrevista. Este recordatorio, podría variar desde periodos más cortos como pueden ser unas horas, a más largos como pueden ser siete días.^{18,34} Por ejemplo, un recordatorio de 72 horas, se realiza durante los tres días anteriores, uno de ellos festivo, por los cambios de ingesta en un día especial.

Se requiere de personal entrevistador cualificado y con experiencia en empleo de técnicas que favorezcan la óptima recogida de información, así como de material que facilite el recuerdo de ingesta de alimentos del entrevistado. Como la capacidad de las personas para recordar y describir los alimentos es variable, los entrevistadores deben hacer preguntas de prueba que estimulen y ayuden al entrevistado a organizar sus recuerdos. Para poder obtener el máximo de información, se puede interrogar sobre el peso o volumen de las porciones ingeridas, calcular el peso haciendo referencia a las medidas caseras utilizadas, así como emplear fotografías de alimentos, con porciones de distintos tamaños, para las que ha sido calculado su peso previamente.¹⁸

El cuestionario de frecuencia de consumo, es el segundo método para la valoración de la ingesta de alimentos. Se trata de un sistema directo de estimación de la ingesta alimentaria de un individuo, a partir de un formato o cuestionario determinado.¹⁸ El objeto de este método consiste en obtener, a partir de un conjunto o

listado de alimentos preestablecidos, la frecuencia habitual de ingesta de un alimento o grupo de alimentos durante un periodo de tiempo concreto.³⁴

El encuestado responderá el número de veces que, como promedio, un alimento ha sido ingerido durante un periodo de tiempo en el pasado. Los tiempos de estudio pueden variar desde unos pocos días, una semana, un mes e incluso de varios meses al año. Lo que hay que indicar es cuántas veces al día (o a la semana, o al mes, etc.), durante el periodo total indicado, se ingiere una determinada ración de alimento. Para diseñar estos cuestionarios conviene hacer un estudio previo de la población diana, para establecer los alimentos de consumo habitual así como y los tamaños por ración.

La historia dietética, es el último método en la valoración de la ingesta. Es útil registrar información adicional que pueda ayudar a comprender la realidad del individuo. La historia dietética se utiliza para la dieta habitual del pasado reciente. En su estructura se hace un recordatorio de 24 horas, que se detalla y estudia concienzudamente a lo largo de la entrevista que puede durar dos horas, siguiendo las pautas establecidas, así como la frecuencia de consumo de cada alimento. Deben aclararse las diferencias entre el consumo de días entre semana y los del fin de semana, así como las variaciones estacionales. La historia dietética suele comprender un periodo de tiempo variable que puede ir desde una semana o varios meses e incluso un año.

A veces, la combinación de 2 o más métodos proporciona mayor exactitud, ya que los inconvenientes de unos se contrarrestan con las ventajas de los otros y es posible la validación y el control cruzados.

2.2.2. Valoración Antropométrica.

La composición corporal se ha convertido desde hace años, en un importante campo de interés para muchos científicos y médicos especializados en deporte.³⁵ La evaluación del estado nutricional mediante la metodología de valoración antropométrica, tiene como objetivo determinar la constitución y la composición corporal a través de medidas de longitud y peso, entre otras. El conocimiento de la

composición corporal es imprescindible para comprender el efecto que tiene la dieta, el crecimiento, la actividad física, la enfermedad y el entorno sobre el mismo.¹⁸

La importancia de estas medidas radica en que la composición corporal de un individuo está muy relacionada con las condiciones ambientales, como la alimentación y el tipo de deporte practicado.^{7,8} Todo ello unido a la importancia de las características antropométricas y el somatotipo para el éxito en la competición, hacen que la valoración antropométrica, sea un factor clave para el rendimiento.^{36,37} En este contexto, el somatotipo de un atleta proporciona información completa y significativa sobre su perfil antropométrico, así como la masa grasa, la masa muscular, etc.³⁸

El cuerpo humano contiene una enorme cantidad de componentes que, lógicamente, coinciden con los nutrientes que demanda, es decir, en sus estructuras existe principalmente CHO, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, además de agua, aunque hay una parte que son reservas que pueden mobilizarse en caso de necesidad. El tamaño de estos almacenes y los factores que determinan los depósitos y movilizaciones son de especial importancia en nutrición. Por ello, hay que intentar conocer todos o la mayor parte de esos componentes para ver su posible variabilidad, lo que obliga a considerar los compartimentos corporales desde el área de nutrición.¹⁸

El protocolo ISAK (International Society for Advancement in Kinanthropometry) presenta las normas de la Sociedad Internacional para el avance de la Cineantropometría, técnicas necesarias para obtener un perfil antropométrico total de una persona. Los datos obtenidos, podrían ser utilizados para calcular el somatotipo; el fraccionamiento de la masa corporal en componentes óseo, muscular, adiposo, piel y residual; estimaciones de proporcionalidad; predicción de la densidad corporal (y consecuentemente el porcentaje de grasa corporal); obesidad total y las clasificaciones de masa proporcional; así como otros índices tales como el cociente cintura-cadera, pliegues cutáneos (PC), y perímetros.³⁹

Otros métodos de valoración de la composición corporal pueden ser la medida del agua corporal, medida del potasio corporal, impedancia bioeléctrica, gases solubles en grasa o densitometría.^{18,40}

2.2.3. Valoración Bioquímica.

La valoración bioquímica aportan información sobre el estatus clínico-nutricional del deportista pudiendo detectar alguna deficiencia o exceso con respecto a los valores considerados como deseables para la población en estudio.³⁴ Para poder aplicar los datos bioquímicos en la VEN es necesario conocer todos los procesos metabólicos en los que intervienen los nutrientes y, así, elegir los parámetros más útiles y fiables.¹⁸

Los métodos de determinación son: determinación de niveles de reservas; determinación de niveles circulantes de nutrientes; determinación de niveles de excreción urinaria. En casos mas graves de disminución de nutrientes, se utiliza los siguientes métodos como la determinación de niveles de reservas, la determinación de niveles de metabolitos, la determinación de actividades enzimáticas,... Cualquier muestra orgánica resulta útil: tejidos, órganos, pelo, saliva, uñas, sangre, etc., ya que la ingesta de nutrientes modifica parámetros a todos los niveles. Dado que algunas muestras son difíciles de obtener, la mayor parte de los estudios se han centrado en el análisis de muestras sanguíneas y urinarias, ya que son muestras fáciles de obtener y disponen de valores de referencia.

Existen diversos parámetros indicadores del estado nutricional tanto a nivel sanguíneo como urinario. Muchas determinaciones sanguíneas son útiles para proporcionar información sobre el estado nutricional del individuo. Entre ellas destacan:

- Parámetros hematológicos.
- Parámetros indicadores de situación en proteínas.
- Parámetros indicadores de ingesta de CHO.
- Parámetros indicadores de consumo de lípidos.
- Parámetros indicadores de situación en vitaminas.
- Parámetros indicadores de situación en minerales.

Generalmente, las determinaciones bioquímicas en sangre se realizan en suero, pero para una evaluación completa las determinaciones se pueden realizar por separado en plasma y eritrocitos.³⁴ A nivel urinario, no puede encontrarse ningún indicador de la ingesta de CHO o grasas, pues estos nutrientes se metabolizan en CO₂ y agua. Por otra parte las vitaminas liposolubles no se eliminan por la orina al no ser

solubles al agua. Los únicos parámetros útiles son los catabolitos nitrogenados (indicadores de la ingesta proteica), las vitaminas hidrosolubles, sus catabolitos y los minerales, cuya excreción aumenta al aumentar la ingesta y disminuye en situaciones de déficit.¹⁸

La valoración bioquímica, sin embargo, tiene una serie de limitaciones a la hora de tenerse en cuenta al realizar una VEN de un individuo.

- Algunos métodos de determinación de vitaminas y minerales son imprecisos.
- No existen niveles de referencias o estándar para algunos analitos.
- Una elevación o disminución en los niveles plasmáticos o celulares de muchos nutrientes e incluso de sus funciones específicas, puede deberse a situaciones de etiología no nutricional.
- Muchos parámetros se pueden enmascarar en caso de deficiencia o exceso.

La VEN puede abordarse desde distintos puntos de vista. Aporta información valiosa y se pueden aplicar de manera aislada, aunque la consideración de distintos tipos de parámetros permite establecer con mayor fiabilidad la situación de cada individuo.

Mediante métodos bioquímicos se puede detectar también los excesos de nutrientes ingeridos y alteraciones metabólicas como consecuencia de éste exceso. Existen casos de exceso en la ingesta de nutrientes en los que no se llega a producir daño, ya que la regulación homeostática elimina el exceso sin riesgos, como en el caso de la ingesta de vitaminas hidrosolubles y de minerales como el calcio (Ca), Fe, Zn...

2.3. El Zn como biomarcador del estatus nutricional.

El Zn se reconoció por primera vez como esencial en un sistema biológico en 1869. En humanos las primeras referencias datan de 1956 cuando se estudió el metabolismo del Zn en individuos cirróticos.⁴¹

En la década de los sesenta, se comprobó por primera vez la importancia del Zn en la nutrición humana, encontrando, diversas patologías asociadas el déficit de

este mineral debida a un estado de malnutrición. Aún, en esta década se pensó que la deficiencia de Zn nunca podía ocurrir en humanos, sin embargo en 1961 se describe lo que hoy se conoce como síndrome de deficiencia de Zn.⁴²

El Zn es necesario para la estructura y la actividad de más de 300 enzimas de muchas especies. La importancia se refleja por las numerosas funciones y actividades través de las cuales ejerce un rol regulador.⁴³

2.3.1. El Zn como nutriente en deporte.

Muchos investigadores se centran en la relación entre la dieta y el desarrollo y mantenimiento del rendimiento en los atletas.⁴⁴ Fisiológicamente la administración de Zn (3 mg/kg/día) puede tener un efecto protector contra los cambios inducidos por el ejercicio agudo de natación en los niveles de glucógeno hepático en ratas.⁴⁵

2.3.1.1. Ingesta dietética recomendada de Zn.

Estudios en atletas revelan que la ingesta de ciertos minerales pueden ser inferiores a las recomendaciones para una óptima función biológica.²⁴ Es importante tener recomendaciones dietéticas reconocidas en atletas ya que determinados procesos metabólicos pueden ponerse en peligro no sólo por deficiencias, sino también por la ingesta excesiva de ciertos nutrientes.⁴⁶

Las recomendación de un nutriente se definen como el nivel de ingesta media diaria de ese nutriente, que se considera suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de casi todos (97-98%) los individuos sanos de un grupo de población en una etapa de la vida y género particular.⁴⁷ En España, existen estudios que demuestran que en general el 84% de la población sana adulta presenta una ingesta suficiente de Zn.⁴⁸ El nivel más alto tolerable de ingesta de Zn es de 25 mg/día.⁴⁹

En deporte, actualmente no se disponen de recomendaciones específicas para este nutriente, por lo que se requiere de estudios que confirmen dichos requerimientos y evite deficiencias y excesos que puedan alterar el rendimiento del deportista.

2.3.1.2. Fuentes dietéticas de Zn.

El Zn, es un mineral que se encuentra distribuido en alimentos y bebidas, pero al igual que otros elementos, su contenido es muy variable según el alimento. Generalmente, el Zn se encuentra en los alimentos asociados a proteínas y ácidos nucleicos, lo que va a condicionar en cierta medida su biodisponibilidad.

El Zn procedente de los alimentos vegetales es de menor biodisponibilidad debido a la presencia de ácido fítico que forma complejos insolubles poco absorbibles.⁵⁰ Los productos de origen marino, principalmente los mariscos (ostras y crustáceos), son los alimentos más ricos en Zn, seguidos de carnes rojas, derivados lácteos y huevos, así como los cereales integrales. Los vegetales, con excepción de las leguminosas, no son alimentos que presenten contenidos en Zn altos. Por todo ello, las verduras, hortalizas, frutas, grasas, pescados y dulces son fuentes pobres de Zn.^{18,51}

Además, es importante resaltar, que el procesado de alimentos es una de las principales causas de la pérdida de Zn. Los cereales, pueden ver reducido su contenido desde un 20% a un 80% cuando son refinados. Debido a esto, se debe tener una especial consideración con las personas vegetarianas, ya que en estas personas los cereales serían la principal fuente de Zn en la dieta. Todo ello unido a que la biodisponibilidad de Zn en este tipo de dietas está disminuida si el contenido de fitatos es alto, hace que la absorción y por tanto el estatus de Zn en personas que siguen dietas vegetarianas sea menor que en las que no las siguen.^{52,53}

La tabla III muestra el contenido de Zn de distintos alimentos en mg/100 g de alimento.

ALIMENTO	CANTIDAD (mg/100g)
Hígado	13.00
Legumbres	5.50 - 8.20
Lentejas	8.20
Frutos secos	5.0 - 7.90
Pistacho	7.20
Garbanzos	6.80
Verduras y hortalizas	0.30 – 3.00
Acelga y espinaca	3.00
Pescado y mariscos	0.40 - 2.70
Mariscos	2.50
Jamón serrano	2.30
Huevos	2.20
Cereales	0.80 - 2.10
Pan	1.60
Carnes	1.30
Carne magra	1.30
Pescado azul	1.10
Pescado blanco	1.00
Patata	0.80
Frutas	0.10 - 0.70
Fresa y fresón	0.70
Queso	0.60
Plátano	0.60
Naranja	0.50
Yogur natural	0.10
Lácteos	0.04 - 0.90
Leche entera	0.04

Tabla III. Contenido de Zn (mg/ 100 g alimento).

2.3.2. Situación de déficit de Zn.

Los estados carenciales de Zn pueden estar causados por diferentes factores como la ingesta insuficiente, problemas en la absorción intestinal o pérdidas corporales excesivamente elevadas, así como el padecimiento de determinadas enfermedades. Esto hace que tanto su participación en la función inmunológica, como sus propiedades antioxidantes frente al estrés oxidativo, se vean mermadas.^{54,55}

En cuanto a la absorción, ésta se satura por el incremento del transporte celular intestinal cuando se detecta un déficit de Zn. Debido a ello, incrementa la expresión de los transportadores de Zn responsables de la absorción del Zn, reduciéndose las pérdidas intestinales. Este mecanismo sólo funciona a corto plazo y si la ingesta no es adecuada podría instaurarse una deficiencia.⁵⁶

Normalmente, las concentraciones de Zn en plasma inferiores a 50 µg/dl son indicativas de deficiencia, aunque es conveniente para confirmarlo, sería conveniente

la determinación del contenido de anhidrasa carbónica en hematíes, y la fosfatasa alcalina en suero y saliva.^{42,57,58} Hoy en día no hay ningún medio biológico (uso frecuente) que pueda analizar y predecir si existe deficiencia de Zn o no. A la hora de paliar esta deficiencia, la suplementación con Zn debería administrarse teniendo en cuenta el estatus previo de Zn y los requerimientos y estado de salud de ese individuo o población particular.⁵⁹

Existen estudios que demuestran que el ejercicio físico influye en los niveles plasmáticos de Zn.^{60,61} Según diversos estudios, la deficiencia de Zn en atletas de resistencia, provoca cambios funcionales en distintos sistemas y tejidos que están asociados con la aparición de la fatiga.⁶² Además, se ha descrito que la deficiencia de Zn afecta significativamente a los niveles de ciertos minerales como el Cu, Fe, Ca y fósforo (P) en suero, y que estos cambios incrementan con el ejercicio,⁴⁴ provocando un deterioro de la función inmune y el rendimiento.⁶³

Debido al aumento de las pérdidas minerales durante el ejercicio, que alteran el estatus mineral, actualmente existe un debate sobre las necesidades posiblemente aumentadas respecto a la población sedentaria.^{8,60} La IOM (Instituto de Medicina) ha insistido en la necesidad de evaluar los efectos de la actividad física sobre las pérdidas minerales sufridas durante el ejercicio para determinar la cantidad necesaria de cada mineral.⁶⁴

Sobre la función cardiorrespiratoria durante el ejercicio, se observó que el agotamiento de Zn afecta negativamente al consumo máximo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, aumentando con ello la ventilación y la frecuencia cardíaca.²³ Las concentraciones de Zn en suero, disminuyen de manera significativa con la fuerza muscular.⁶⁵ En futbolistas profesionales, las concentraciones bajas de Zn sérico disminuyeron significativamente la producción de potencia máxima y aumentaron de las concentraciones de lactato en sangre durante pruebas en cicloergómetro.⁶⁶

2.3.3. Toxicidad del Zn.

El Zn es el menos tóxico de todos los oligoelementos, y aunque su margen de seguridad (diferencia entre la dosis tóxica y la dosis recomendada) es muy amplio, es necesario evaluar su toxicidad.

Ello se puede establecer mediante el estudio del nivel superior de ingesta tolerable (Tolerable Upper Intake Level, UL), que se define como el nivel más alto de la ingesta diaria de un nutriente para que no suponga un riesgo o efectos adversos sobre la salud de casi todos los individuos. Este parámetro se calcula a partir de la ingesta total. Para el Zn proveniente tanto de los alimentos, como del agua y suplementos el UL es de 40 mg/día.⁶⁷

Se ha demostrado cómo, un elevado consumo de suplementos de Zn produce un riesgo significativamente mayor de cáncer avanzado de próstata, un incremento de los niveles de testosterona, un incremento de colesterol, una reducción de los niveles de HDL (High Density Lipoprotein Cholesterol), pudiendo fomentar una disfunción inmune. Una suplementación con altas dosis de Zn, especialmente en altas dosis, también puede producir otros efectos adversos como interferir y disminuir el estatus corporal de otros minerales como el Cu. Dosis de 0.3 mg/kg/día, puede desarrollar una reducción en la síntesis de hemoglobina y ferritina en plasma, reduciendo la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).^{42,68}

2.3.4. Utilización metabólica del Zn.

El Zn es necesario para la estructura y la actividad de más de 300 enzimas de muchas especies. La importancia se refleja por las numerosas funciones y actividades través de las cuales ejerce un rol regulador.⁴³

2.3.4.1. Absorción del Zn.

Existen diversas vías a través de las cuales el Zn se incorpora a nuestro organismo como a través la ingesta alimentos y agua, de la piel, o por medio de la respiración. Se ha demostrado en estudios metabólicos sobre el Zn, un balance positivo cuando la ingesta de Zn es de 12.5 mg/día, estableciéndose que una dieta de 15 mg/día en hombres y 12.5 mg/día en mujeres es suficiente para mantener la homeostasis del Zn en los seres humanos.¹⁸

La absorción de Zn es muy baja, por lo tanto la ingesta de Zn se debe evaluar continuamente para prevenir la deficiencia. Entre el 3 y el 38% del Zn de la dieta se absorbe en el tubo digestivo proximal. La absorción de Zn, va a depender de las cantidades de Zn en la dieta y de la presencia de sustancias que interfieren con él, tales como la fibra, los fitatos, los polifenoles,⁶⁹ el Ca, Cu y Cd.^{70,71} La glucosa, la lactosa y determinadas proteínas favorecen la absorción de Zn.⁷²

Parte del Zn ingerido se absorbe por difusión pasiva, y el resto a través de un mecanismo de transporte activo. Para que este mecanismo de transporte activo ocurra, se necesitan unas moléculas de bajo peso, intracelulares, que son el ácido picolínico y el ácido cítrico que captan el Zn. Una vez dentro de las células se une con metalotioneínas (MT) (proteína actúa como ligando que amortigua la absorción del Zn)⁷³⁻⁷⁵ y otras proteínas ricas en cisteína, y lo transportan intracelularmente hasta el borde seroso del enterocito, desde donde pasa a la circulación.⁷⁶

El ejercicio intenso puede aumentar la absorción de Zn por las células eritroides. Un aumento de la absorción de Zn celular asociada con la eritropoyesis puede tener como resultado una disminución en Zn plasma y un aumento de la eritrocitario de Zn.⁷⁷

2.3.4.2. Distribución corporal del Zn en el organismo.

El Zn, es uno de los elementos esenciales más abundantes distribuido por todas las células y tejidos tanto en seres humanos como en animales. Al ser un ión intracelular (con alta carga, hidrofílico), no puede atravesar membranas biológicas por

difusión pasiva, por lo que existen mecanismos especializados para su captación, transporte intracelular y liberación.

La mayor parte del Zn es intracelular, el 90% se distribuye principalmente en los tejidos óseo y muscular, y el resto se localiza en la piel, el hígado, el páncreas, la retina, las células hemáticas y en los tejidos gonadales, en el varón. La sangre total contiene aproximadamente diez veces más Zn que el plasma, debido a la presencia de este catión en el enzima eritrocitaria anhidrasa carbónica.⁴⁹

En la sangre, el Zn está presente en plasma, eritrocitos, leucocitos y plaquetas, aunque la mayor cantidad se encuentra en eritrocitos (el 87% se une a la anhidrasa carbónica). El Zn circulante representa el 0.1% del Zn total del organismo, es decir, la sangre actúa como vehículo para llegar a las células y almacenarse.⁷⁸ El Zn liberado por las células intestinales es transportado hasta el hígado, siendo la albúmina la proteína transportadora más importante, de forma que el 70% del Zn plasmático se encuentra unido a la albúmina y el resto a la α -2-macroglobulina, a la transferrina y a algunos aminoácidos como la cisteína e histidina.

2.3.4.3. Homeostasis del Zn.

Los estudios que se ocupan de la relación entre el Zn y el ejercicio general, deben centrarse en la distribución de este elemento en el organismo, cuya capacidad homeostática permite conservar el estado de Zn aun cuando la ingesta dietética varíe ampliamente. Este mecanismo de regulación, hace que ante consumos deficientes la adaptación intestinales produzca un incremento en la absorción y una disminución en la excreción fecal de Zn endógeno.²⁴ Por el contrario, cuando el consumo es excesivo, disminuye la absorción y aumenta la excreción.⁷⁹

Como el Zn es necesario para muchas actividades enzimáticas en el metabolismo energético, unos niveles bajos de Zn musculares pueden conducir a una disminución de la capacidad de resistencia. El Zn absorbido llega a la circulación sanguínea, donde puede encontrarse libre o unido a transportadores, llegando principalmente al hígado, cerebro, huesos, músculo, retina, etc.

Durante el ejercicio, los niveles de Zn pueden verse disminuidos^{43,80,81} o aumentados.^{82,83} Estos cambios pueden deberse a una redistribución interna que pudiera influir en el movimiento de Zn a través de los tejidos.^{84,85} La distribución de Zn en diferentes tejidos de ratas después de nadar hasta el agotamiento a altas temperaturas, fue un 25% mayor en hígado, bazo y médula, y un 12% menor en sangre, gastrocnemio y la piel,⁶¹ lo que demuestra la importancia de las reacciones de catabolismo y anabolismo durante el ejercicio sobre la distribución de Zn. Volpe y col.⁸⁶ informaron igualmente de aumentos en las concentraciones de Zn plasmático y Zn hepático como respuesta aguda al estrés producido por el ejercicio vigoroso.

Otra explicación para estos cambios en la homeostasis del Zn, hacen referencia a la salida de Zn desde músculo al fluido extracelular,⁸⁷ producido por un aumento de la tasa de proteínas y catabolismo de aminoácidos después el ejercicio intenso. Además, se ha observado que la lactato deshidrogenasa, una metaloenzima de Zn, se libera al torrente sanguíneo después del ejercicio.^{88,89} Los cambios en la presión oncótica con el ejercicio también podrían ser responsables de la caída de la concentración de Zn en plasma.⁹⁰

El 0.95% de Zn en el suero se une a la albúmina y alfa 2-macroglobulina.⁹¹ La tasa de albúmina que sale de los capilares aumenta durante el ejercicio, y podría ser acelerado por hormonas tales como el cortisol en suero, que incrementa la permeabilidad capilar. Se observó un aumento en las concentraciones de cortisol en suero de hasta aproximadamente 25 min después del ejercicio.⁹⁰

El recambio de Zn en el organismo es lento, con una vida media biológica de 250 días. Sin embargo, las reservas corporales de Zn son relativamente pequeñas, y tiene una rápida tasa de recambio. Por consiguiente, es necesario el aporte continuo de Zn dado que puede eliminarse a través de las secreciones pancreáticas e intestinales y excretado diariamente en la orina.⁹² Al no existir reservas corporales de Zn, sus niveles se regulan por un estricto control homeostático.⁹³

2.3.4.4. Excreción de Zn.

La excreción fecal responde de manera inmediata a los cambios en la ingesta de Zn. Las pérdidas fecales son de 6.8-14.4 mg/día, a nivel renal son de 7.5 g/kg/día,

(4-12 $\mu\text{mol/día}$), aunque mayor es la pérdida a nivel intestinal a partir de las secreciones pancreáticas (aproximadamente 34 g/kg/día), y también se pueden realizar también por las células epiteliales, la transpiración, el semen, el pelo y la menstruación.^{94,95}

Otras vías de excreción de Zn son el sudor, el crecimiento del pelo y la descamación de la piel. Las pérdidas de Zn a través del sudor parece estar directamente relacionada con la ingesta de Zn en la dieta. Se observa que la excreción diaria de Zn varía, aún cuando los individuos reciben una dosis constante del oligoelemento con la dieta.⁹⁶ En deportistas, cobra especial importancia la sudoración que tras dos horas de ejercicio físico puede representar entre un 4.5-6% de la ingesta dietética de Zn.⁹⁷

2.3.4.5. Funciones del Zn.

Las funciones del Zn, pueden ser clasificadas en 3 categorías: catalítica, estructural (forma parte de la estructura de las membranas plasmáticas,⁹⁸ DNA, y metaloproteínas)⁹⁹ y reguladora (regulando procesos biológicos diferentes).¹⁰⁰

Algunas de las funciones más importantes del Zn en el ejercicio son la respiración celular, la utilización de oxígeno por parte de la célula, la reproducción tanto de ADN como de ARN, el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y la eliminación de radicales libres.¹⁰¹

Se requiere en la síntesis de proteínas, en la diferenciación celular y la replicación, así como en la utilización de glucosa y la secreción de insulina. Ejerce acciones regulatorias en diversos aspectos del metabolismo de las hormonas incluyendo la producción, el almacenamiento, y la secreción de las hormonas, así como las interacciones con sus receptores y la capacidad de respuesta de los órganos diana. Unos niveles de Zn adecuados, se necesitan para la integración de muchos sistemas fisiológicos, tales como la inmunidad, la reproducción, el gusto, la cicatrización de heridas, el desarrollo del esqueleto, y la función gastrointestinal. Este conjunto de funciones sugiere que el nivel de Zn debe regular el rendimiento deportivo.^{23,102,103}

2.3.5. El Zn como nutriente protector frente a los radicales libres.

El mantenimiento del equilibrio redox en parte podría resultar del efecto integrador de aumento de antioxidante individual en la adaptación al ejercicio crónico. Tales procesos endógenos de adaptación en los atletas pueden estar asociados con su consumo habitual de alimentos antioxidantes.¹⁹

2.3.5.1. Propiedades antioxidantes del Zn.

El consumo de antioxidantes exógenos a partir de dietas habituales así como el tipo de ejercicio y su intensidad y duración aplicada durante el entrenamiento, son factores que podrían influir en el estado antioxidante de los atletas.¹⁰⁴

Las propiedades antioxidantes del Zn en su mayor parte generalmente son independientes de sus MT. El Zn no puede ser considerado un agente antioxidante como tal, ya que nunca se ha visto que interactúe directamente con radicales libres,¹⁰⁵ sino que ejerce sus efectos de una forma indirecta, siendo esta función antioxidante evidente, tanto en situación de deficiencia crónica, como en situación de sobrecarga aguda.

Es reconocido, que debido a sus características antioxidantes, previene la formación de radicales libres y tienen un efecto importante en el rendimiento físico.¹⁰⁶ El aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial conduce a estrés oxidativo, lo que provoca especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica. Un aumento en la formación de radicales libres provoca la inflamación y la destrucción del músculo, creando un efecto negativo en el rendimiento deportivo.¹⁰⁷

La administración crónica de Zn induce la expresión de las MT en hígado, riñón e intestino. Las MT son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína, muy potentes como antioxidantes y cuyo mecanismo de acción no está aclarado por completo.¹⁰⁸ Son las únicas proteínas que están implicadas en la distribución del Zn y se ha observado que en situaciones de estrés oxidativo el Zn es liberado desde las metalotioneínas.¹⁰⁰

La privación crónica de Zn hace al organismo más susceptible al daño mediado por el estrés oxidativo. Estudios en animales han mostrado un incremento en la producción de radicales libres o un incremento en el daño derivado de la exposición al estrés oxidativo en situaciones de deficiencia de Zn.¹⁰⁹

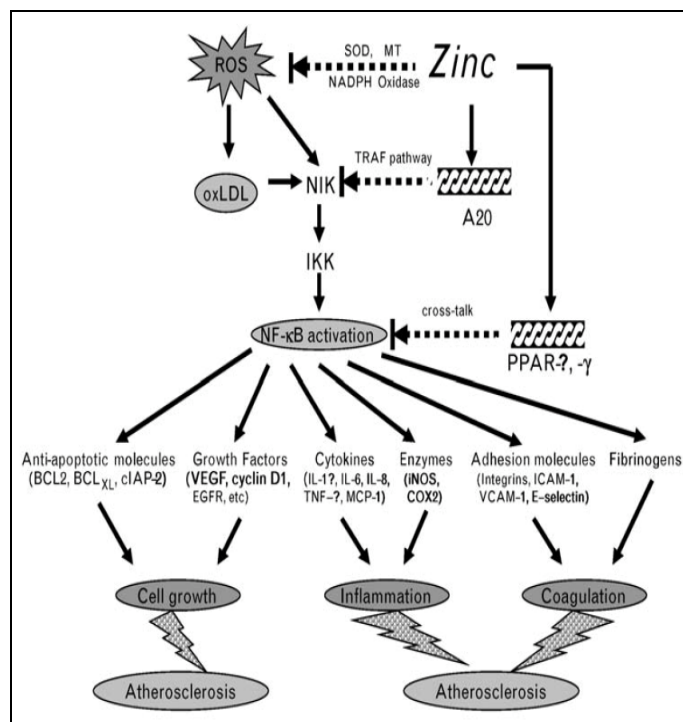


Figura 3: El Zn como un antioxidante y agente antiinflamatorio.⁵⁵

2.3.5.2. El Zn y la Superóxido Dismutasa (SOD).

El ejercicio, está estrechamente relacionado con las respuestas catabólicas mediadas por estrés oxidativo, que se desarrollan cuando la producción de ROS supera las defensas antioxidantes.¹¹⁰ La función de señalización de ROS juega un papel en la mediación de las adaptaciones fisiológicas como resultado del ejercicio,¹¹¹ incluyendo la producción de mioquinas, esenciales para la adaptación muscular en el ejercicio y la regulación positiva de mecanismos de defensa antioxidantes.^{112,113}

El ejercicio regular ha sido ampliamente descrito por producir una mejora endógena de las defensas antioxidantes.¹¹⁴ La continuidad en la realización de

episodios repetidos de ejercicio aeróbico, induce la expresión de ciertas enzimas antioxidantes.¹¹⁵ Varios estudios han demostrado una relación entre la cuantificación de la actividad física y las concentraciones de antioxidantes de SOD,¹¹⁶⁻¹¹⁸ mostrando reducciones significativas de la actividad de la SOD en respuesta al daño muscular asociada con el ejercicio.¹¹⁹

El Zn aumenta las defensas naturales del organismo y protege contra la formación de radicales libres gracias a la enzima Cu-Zn SOD presente en el citoplasma de la célula y el espacio intermembrana mitocondrial.¹²⁰ Por el contrario, se ha informado de que la deficiencia dietética de Zn pueden estar asociada a una disminución de los niveles de SOD, produciendo posible daño celular, y una mayor generación de ROS.¹²¹ Aunque probabilidad de deficiencia de Zn procedente de la dieta es poco probable en población sana, existen estudios realizados en atletas que han descrito una ingesta alimentaria insuficiente.¹²²

La SOD es una familia de metaloenzimas que está encargada de proteger el daño oxidativo, tóxico para la célula y su membrana.¹²³ Una forma de esta enzima es la encargada de proteger frente a la producción de radicales libres producidos por el ejercicio. Las especies tóxicas del oxígeno reaccionan con toda clase de macromoléculas celulares y las reacciones que experimentan, se han involucrado en diversos estados patológicos. Estas membranas sufren daños debido a la oxidación de los lípidos de la membrana, que tienen como consecuencia una lesión oxidativa y la inactivación de las enzimas produciendo un envejecimiento celular.

2.3.6. El Zn y el sistema inmune.

El sistema inmunitario se puede dividir en dos amplias funciones: inmunidad innata (natural y no específica) y adquirida (adaptativa y específica), que trabajan juntas de forma sinérgica. El intento de entrada de un agente infeccioso en el organismo, activa inmediatamente el sistema innato. Esta llamada “primera línea de defensa” comprende tres mecanismos generales con el objetivo común de limitar la entrada de microorganismos en el cuerpo: barreras físicas/estructurales (piel, revestimientos epiteliales, secreciones mucosas); barreras químicas (pH de los fluidos corporales y factores solubles, tales como lisozimas y proteínas del complemento); células fagocitarias (por ejemplo, neutrófilos y monocitos/macrófagos).⁶³

La magnitud del cambio en la inmunidad, que se produce después de cada sesión de ejercicio prolongado e intenso en deportistas, puede tener gran significación clínica. Durante esta "ventana abierta" de inmunidad alterada (puede durar entre tres y 72 horas después del ejercicio, en función de la medida inmune), los virus y bacterias pueden ganar un punto de apoyo, aumentando el riesgo de infección.¹²⁴ Algunos atletas pueden soportar periodos de entrenamiento intenso sin problemas de salud, mientras que otros son propensos a las infecciones. Hay muchos factores que pueden interferir con la inmunorregulación como el desequilibrio nutricional, la fatiga, el estrés, y la fragilidad del organismo como consecuencia del ejercicio.¹²⁵

Muchos de los componentes expuestos a cambios en el sistema inmune después de un esfuerzo pesado, incluyen:^{126,127}

- Neutrofilia y linfopenia inducida por las catecolaminas plasmáticas elevadas, hormona del crecimiento, y el cortisol.
- Aumento en sangre de fagocitosis y activación de marcadores de granulocitos y monocitos (que refleja una respuesta inflamatoria debido a las sustancias liberadas a partir de células musculares lesionados), pero una disminución de la fagocitosis de neutrófilos nasal y la actividad oxidativa de granulocitos de sangre.
- Disminución de la actividad citotóxica de las células NK y linfocitos inducida por proliferación de mitógenos.
- Disminución de la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).
- Aumento de las concentraciones plasmáticas de citoquinas pro y anti-inflamatorias (por ejemplo, interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), y receptor de interleucina-1 antagonista (IL-1ra)).
- Disminución de la concentración de IgA nasal y en saliva, y el aclaramiento mucociliar nasal.
- Pico de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC) y el presencia de antígenos en macrófagos.

El Zn afecta múltiples aspectos del sistema inmunológico. Se ha observado que el ejercicio físico intenso puede afectar el metabolismo de oligoelementos, lo cual inhibe el sistema inmunológico y las infecciones que causan, y la importancia no radica sólo en términos de rendimiento, sino en la salud atleta.^{63,120,128} Además, es un mineral esencial para el normal desarrollo y la función de mediación celular inmunidad en la inmunidad innata.

La deficiencia de Zn contribuye a la apoptosis de precursores y células B inmaduras en médula ósea y de precursoras de linfocitos T en el timo.¹²⁹ El desarrollo de linfocitos B y la producción de anticuerpos, particularmente de la inmunoglobulina G, está perjudicado por la deficiencia de Zn. El macrófago, una célula clave en varias funciones inmunológicas, está adversamente afectado por la deficiencia de Zn. Esto puede impedir la eliminación intracelular, la producción de citoquinas, y la fagocitosis.^{79,130} Las citoquinas inflamatorias como TNF α y IL₁₀ pueden generar volúmenes grandes de ROS.⁵⁵ Por lo tanto, la deficiencia de Zn puede inducir estrés oxidativo.

La respuesta inmunitaria requiere un estado nutricional normal. Esta reducción transitoria en el Zn plasmático después del ejercicio, si se repite con frecuencia, puede derivar en una disminución de Zn de manera crónica. Las infecciones de las vías respiratorias superiores se observan a menudo en atletas que entrenan de forma intensiva,¹³¹ que podría posiblemente ser el resultado de una reducción en la síntesis de proteínas inmunológicas (de los cuales el Zn es necesario)¹³⁰ y/o una disminución en los niveles de Cu-Zn superóxido dismutasa.

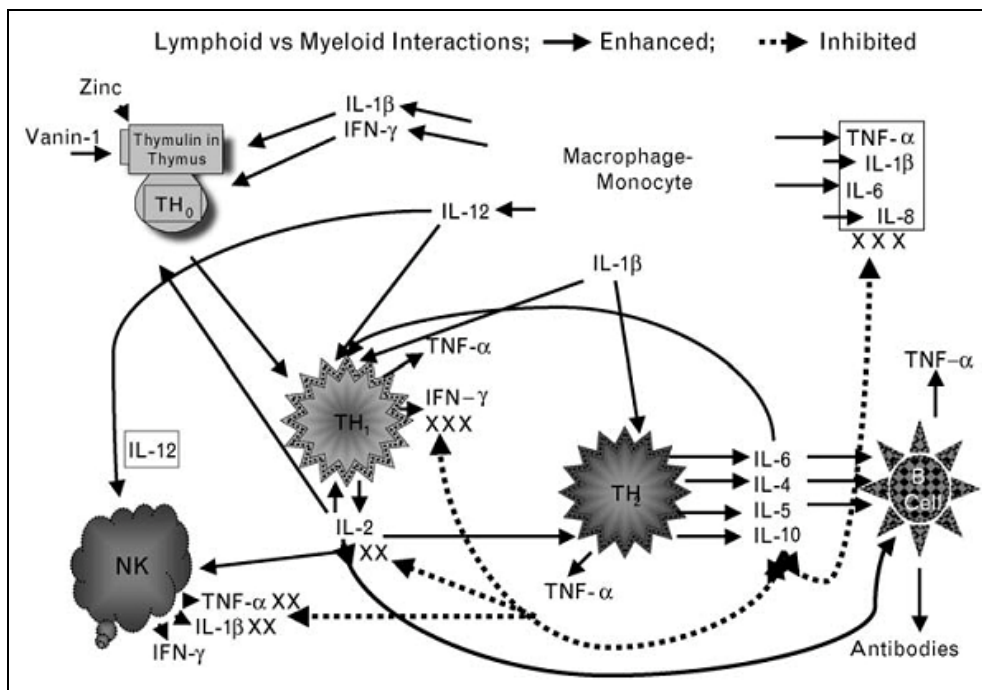


Figura 4: Vías de efecto de Zn en las células inmunitarias.¹³²

2.3.7. Biomarcadores del estatus de Zn.

Un biomarcador se puede definir como cualquier parámetro bioquímico, fisiológico o otra alteración del organismo, que se puede reconocer y establecer con un potencial efecto sobre la salud o la enfermedad. La tabla IV muestra información sobre algunos de los biomarcadores que se pueden utilizar para determinar una posible deficiencia en el estatus de Zn.

Biomarcadores	Valores Referencia	Inconveniente
Zn Suero	80-140 ug/dl	- No refleja los depósitos del organismo con un rango normal . - Fluctúa más de un 20% en un día
Zn Eritrocito	40-44 ug/g hemoglobina	- Los valores pueden verse afectados en inflamación e infección aguda u otros factores como cirrosis, etc.
Zn Leucocito	80-130 ug/10 Células	-
Zn Saliva	(parótida) 23-70 ng/g	-
Zn Sudor	0.55-1.75 mg/l	-
Zn Uña ⁶⁸	100-400 ug/g	- Pobre correlación entre el pelo y Zn plasmático.
Zn Pelo ⁶⁸	100-230 ug/g	-
Zn Orina ⁶⁸	230-600 UG/día	-
Albúmina ¹³³	3.5 - 5.2 g/dL	- Determinación es sencilla y sirve como orientación para procesos crónicos. - Influenciable por la reacción inflamatoria y poco útil para el seguimiento nutricional, al contrario de la albúmina
Prealbúmina ¹³⁴	20 - 40 ml/dL	-
Colesterol LDL	< 100 mg/dL	-
Colesterol HDL	> 35 mg/dL	-
Creatinina	0.6 y 1.2 mg/dl	- Un marcador relativamente poco estudiado, por lo que su capacidad para reflejar el estado nutricional no está aún bien definida, los valores bajos de Zn/creatinina pueden no ser indicativo
Transaminasas		-
GOT - ALT	0 y 37 U/L	-
GPT - AST	0 y 41 U/L	-
GGT	11 y 50 U/L	-
Factor reumatoide	< 60 U/mL	- En suero y es poco específico.
Alfa1 antitripsina	1.5 - 3.5 g/L	-
Interleucinas		-

Tabla IV. Biomarcadores relacionados con el estatus de Zn.

2.3.8. Relación del Zn con otros metales.

Los mecanismos involucrados en las interacciones entre el Zn y otros minerales, son temas constantes de investigación. De hecho, la existencia de un transportador de cationes divalente con amplia especificidad, indica que probablemente un canal metálico divalente podría justificar numerosas interacciones entre el Zn y otros cationes metálicos divalentes, debido a la competencia común de este transporte.¹³⁵

Los estudios demuestran que hay una alta asociación entre los metales tanto en caso de ingesta como a nivel celular. Un ejemplo es la competencia entre el Fe y el Zn, disminuye la disponibilidad de Zn en intestino.^{136,137} McDonal y Keen¹³⁸ advierten de la importancia de conocer la interacción entre el Zn en la dieta y otros elementos en términos de salud de los deportistas y su rendimiento, ya que el exceso en la ingesta de Fe puede causar deficiencia de Zn, y existe una relación significativa entre el Zn y el Cu. En el caso del Cu se ha demostrado que es un elemento que compite con el Zn debido a que ambos forman parte de la enzima superóxido dismutasa.¹³⁹

La actividad física continua de alto nivel, también tiene efectos importantes en la tejido óseo. La relación del Zn con el Ca, parece ser debida a la formación de complejos con fitatos que reduce la biodisponibilidad intrínseca del Zn.¹⁴⁰ Un deterioro del contenido óseo y de la densidad mineral, puede derivarse de un aumento en la secreción urinaria de Zn.⁶⁶ De hecho, el Zn tiene efectos notables en el metabolismo de Ca, y por tanto en la estructura y el desarrollo del hueso.⁸¹ En un estudio realizado por Baltaci y col.⁴⁴ la deficiencia de zinc en ratas afectó significativamente niveles de Cu, Fe, Ca y P en el suero y estos cambios se acentuaron más con el ejercicio. También se han descrito también la relación entre el Zn y el Mg y su impacto favorable sobre la fuerza muscular.¹⁴¹

2.3.9. Suplementación con Zn en deporte.

Algunos estudios a nivel nutricional, reportan efectos beneficiosos de la intervención con nutrientes.^{44,142-145}

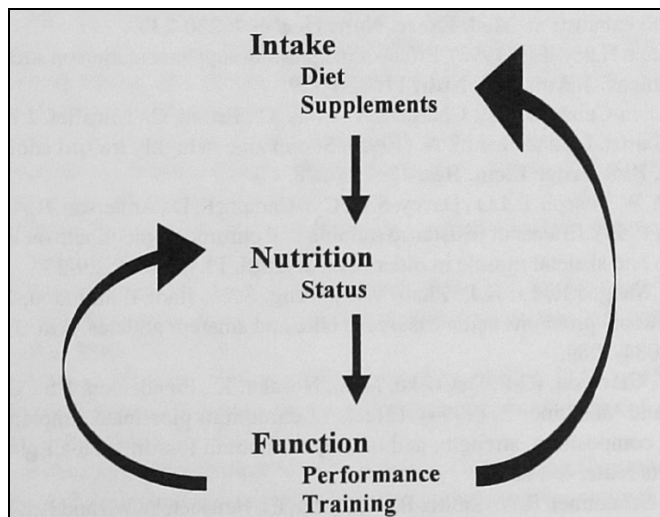


Figura 5. Interacciones entre la ingesta de nutrientes, el estatus y la función.

La dosificación de Zn cuando se suplementa, es de vital importancia ya que podrían producirse efectos adversos a los que se busca con la intervención. Fischer y cols.¹⁴⁶ informaron que los suplementos de Zn podrían influir en la absorción de Cu en un período de 24 horas y que la deficiencia de Cu puede darse principalmente en personas que reciben suplementos de Zn de manera crónica a dosis de 50 mg/día. Del mismo modo que la sobredosificación con Zn es capaz de alterar la absorción de Cu,¹⁴⁷ es importante conocer la interrelación de Zn con el Fe.¹³⁸

Maxwell y Volpe¹⁴⁸ en un estudio en el que evaluaron los efectos la suplementación con 26.4 mg/dL^{-1} de Zn durante 4 meses, mostraron como la suplementación parecía ser directamente responsable del aumento en Zn en plasma y la disminución de las concentraciones de ferritina sérica. De la misma manera, Kilic¹⁴⁹ evaluó la suplementación de Zn por vía oral ($3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$) durante 4 semanas, antes y después del realizar un test con cicloergómetro, y observó que la suplementación parecía prevenir la disminución de ciertas hormonas (hormona de la tiroides y las concentraciones de testosterona), llegando a la conclusión de que la administración de una dosis fisiológica de Zn podría ser beneficioso para el rendimiento en el deportista.

Varios estudios en humanos confirman la importancia del Zn en la función y la fuerza muscular. En un estudio cruzado doble ciego, 16 mujeres recibieron 135 mg/día de Zn o placebo durante 14 días. La intervención con Zn aumentó significativamente la

fuerza dinámica (isocinética).¹⁵⁰ Van Loan y col.⁸⁹ encontraron una disminución de la capacidad total de trabajo de extensión de la rodilla y hombro así como en los músculos flexores, después de que consumieran una dieta deficiente en Zn (0.3 mg/día) frente a una dieta normal en Zn (12 mg/día).

2.4. Transportadores de Zn en el deporte.

El Zn es un cofactor catalítico o estructural para muchas proteínas diferentes. Las proteínas dependientes de Zn se encuentran en el citoplasma y dentro de muchos orgánulos de la célula eucariota, por lo tanto, es necesario que las células posean mecanismos de transporte de Zn para permitir la acumulación de manera eficiente del ion metálico y distribuirla dentro de la célula.¹⁵¹

La entrada de Zn en la célula produce una disminución en la expresión de los transportadores relacionados con la absorción, mientras que, por otro lado, se induce la actividad de los transportadores relacionados con la salida de Zn de la célula. Debido a que esta respuesta no es instantánea, la célula podría acumular Zn en exceso antes de producirse la respuesta de salida. Una vez la absorción cesa, el exceso acumulado de Zn es utilizado o sacado de la célula. Cuando el Zn intracelular se agota, el ciclo puede comenzar de nuevo, por lo tanto, los transportadores van a actuar como “interruptores” alternados entre estados carenciales y de exceso de Zn.¹⁵¹

Se ha descrito que la respuesta a las variaciones en la ingesta de Zn en la dieta, tiene como consecuencia una regulación en la expresión de transportadores de Zn en intestino humano que contribuye al mantenimiento de Zn.¹⁵²

2.5. La familia de los transportadores de Zn.

El Zn es un metal cuya difusión celular es compleja, por eso requiere de transportadores, en general denominados familia ZnT y ZIP, siendo en total 24 transportadores.^{151,153} La familia ZnT con 10 miembros, participa como mediador en el transporte de Zn dentro de la célula, lo que modulará su concentración intracelular. La familia ZIP con 14 miembros, en cambio, tiene la función de transportar hacia afuera el

Zn desde los orgánulos, determinando un aumento en el Zn intracelular.¹⁵³ De esta manera, los transportadores unidos, mantienen la homeostasis del Zn.

2.5.1. SCL30A (Solute Carrier Family 30)/ CDF / ZnT.

La designación CDF significa “catión de difusión facilitador”, que en mamíferos se nombra como ZnT, siendo el nombre sistemático es SLC30.¹⁵⁴ La característica de esta familia es el transporte de Zn y/u otros iones metálicos a partir del citoplasma a los orgánulos intracelulares o al exterior de la célula. Por lo tanto, las proteínas ZnT trabajan en oposición a las proteínas ZIP.¹⁵¹

Los ZnT poseen seis dominios transmembranarios con una región variable entre los dominios III y IV con muchos residuos de histidina capaces de unirse con el Zn. Además, el domino IV y V son ricos en histidina lo que puede representar un dominio de unión con metales (Figura 6).^{151,155}

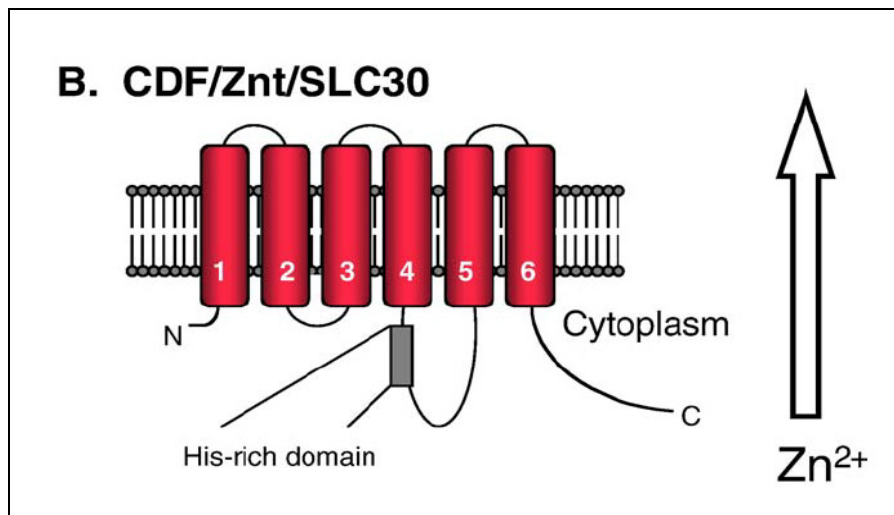


Figura 6. Estructura de los transportadores de Zn familia ZnT.¹⁵¹

La distribución de los transportadores es específica para cada célula. Más de 100 miembros de la familia SLC30 se encuentran en los organismos. La familia ZnT se divide en tres subfamilias: Subfamilia I, que contiene principalmente miembros

procariotas, mientras que subfamilias II y III contienen miembros eucariotas y procariotas en proporción similar.¹⁵⁵ A continuación se muestra una tabla V sobre los transportadores de Zn pertenecientes a la familia ZnT.

Transportador	Cromosoma ¹⁵ ₅	Localización	Ingesta de Zn (R) ¹⁵³	Función	Suplementación
ZnT 1	I	Riñón, intestino delgado, tejido adiposo, hígado, bazo y tejido del timo. ¹⁵⁶	ZnD (-) ZnE (+)	Absorción del Zn de la dieta y transferencia de Zn. ^{157,158} Homeostasis del Zn como exportadores de Zn junto a ZnT2, ZnT4.	Influencia expresión y la localización de los transportadores de Zn en medios de cultivo. ¹⁵³
ZnT2	I	Intestino delgado, placenta, próstata, mama e hígado. ^{154,159}	ZnD (-) ZnE (+)	Implicado en el mecanismo de regulación del Zn en apoptosis ¹⁵⁵ . Homeostasis del Zn como exportadores de Zn junto a ZnT1, ZnT4.	-
ZnT 3	VII	Cerebro, testículo, epitelio mamario ¹⁵³ .	-	Rol crucial en diabetes. ¹⁵⁵ Junto con ZnT2 tienen rol en el transporte vesicular. ¹⁶⁰	-
ZnT 4	XV	Cerebro, ^{156,161} intestino delgado.	ZnD (-)	Alta expresión en las células epiteliales, principalmente en aquellas relacionadas con absorción y con menor expresión en hígado, riñón, bazo, timo, músculo, tejido adiposo y mama. Homeostasis del Zn como exportadores de Zn junto a ZnT1, ZnT2 ^{153,162} . Regulación de la absorción de Zn en la dieta. Interactúa con ZnT6 para formar un complejo que puede transportar el Zn en la vía secretora. ¹⁶⁴ ZnT5 y ZnT7 están localizados en el aparato secretor, responsable de activar la enzima fosfatasa alcalina y también localizado junto a ZnT6 y ZnT7 en el compartimento vesicular ^{165,166} . Juega un papel importante en la maduración de los osteoblastos y en el mantenimiento de las células involucradas en el sistema de conducción cardíaco. ¹⁵⁷	Expresión de ZNT4 parece ser independiente del estado de Zn ¹⁵⁶ .
ZnT 5	V	Intestino delgado, expresado en tejidos humanos, aunque con una expresión alta en las células β-pancreáticas que contienen insulina. ¹⁶³	ZnD (-)		-
ZnT 6	VI	Intestino delgado, hígado, riñón, cerebro y pulmón. Sólo se detectó en cerebro y los pulmones, lo que sugiere que un mecanismo post transcripcional puede jugar un papel en la expresión específica de ZnT6 según el tejido. ¹⁶⁷	ZnD (-) ZnE (+)	Transporte de Zn desde el aparato de Golgi en la periferia de las células. ¹⁶⁷	-
ZnT 7	I	Intestino delgado y pulmones, bazo, corazón,	-	Rol crucial en reabsorción del Zn en el tracto gastrointestinal. ¹⁵⁸ Mantenimiento celular y	En ratones knock-out con fenotipo deficiente en Zn, es

		cerebro, estómago. ^{154,155,168}		homeostasis del Zn y que pueden participar en la regulación de la composición corporal. ¹⁵³ Identificado en células β y facilitar la acumulación de Zn desde el citoplasma a las vesículas intracelulares. ¹⁷⁰ Involucrado en proporcionar Zn para la maduración de la insulina y / o los procesos de almacenamiento en células β secretoras insulina de páncreas. ¹⁵³ Puede conferir susceptibilidad genética para la diabetes. ^{171,172}	insensible a la suplementación con Zn. ¹⁶⁹
ZnT 8	VIII	Cerebro, hígado. ¹⁵³	-		-
ZnT 9	IV	Célula embrionaria. ¹⁷³ pulmonar	-	No han evaluado la función de esta proteína. ¹⁵³	-
ZnT 10	I	Hígado, cerebro fetal. ¹⁵³	-	Homeostasis del Zn durante el desarrollo fetal. Sin embargo, ningún estudio ha sido llevado a cabo para analizar la función de ZnT10. ¹⁵³	-

ZnD = Deficiencia de Zn; ZnE = Exceso de Zn; (+) = Sobreexpresión; (-) = Baja regulación.

Tabla V. Transportadores de Zn ZnT (SLC30A).

2.5.2. SCL39A (Solute Carrier Family 39) / ZIP.

Los transportadores humanos SLC39 son miembros de la familia ZIP de los transportadores de iones metálicos.¹⁷⁴ Una característica clave de la familia ZIP es que, excepto en los casos conocidos, estas proteínas transportan Zn y/u otros sustratos de iones metálicos desde el espacio extracelular o lumen de organelos al citoplasma. Los transportadores ZIP se encuentran en todos los niveles filogenéticos incluyendo bacterias, hongos, plantas y mamíferos.¹⁷⁵

Los ZIP humanos se clasifican en subfamilias I, II, LIV-1 y gufA. La estructura de las proteínas Zip es de 8 dominios transmembranarios con lazo de unión entre dominios citoplasmáticos III y IV, compuesta por residuos de histidina. Muchos miembros también tienen una región de bucle largo localizado entre los dominios transmembrana 3 y 4, y una secuencia rica en histidina que es frecuente encontrarla en este bucle TM3-4.⁹² Las proteínas ZIP se encuentran situadas en la parte extracelular de la membrana.¹⁵³ La función de este dominio no está claro, pero su potencial capacidad de unión de metal sugiere alguna función en el transporte de Zn o su regulación.

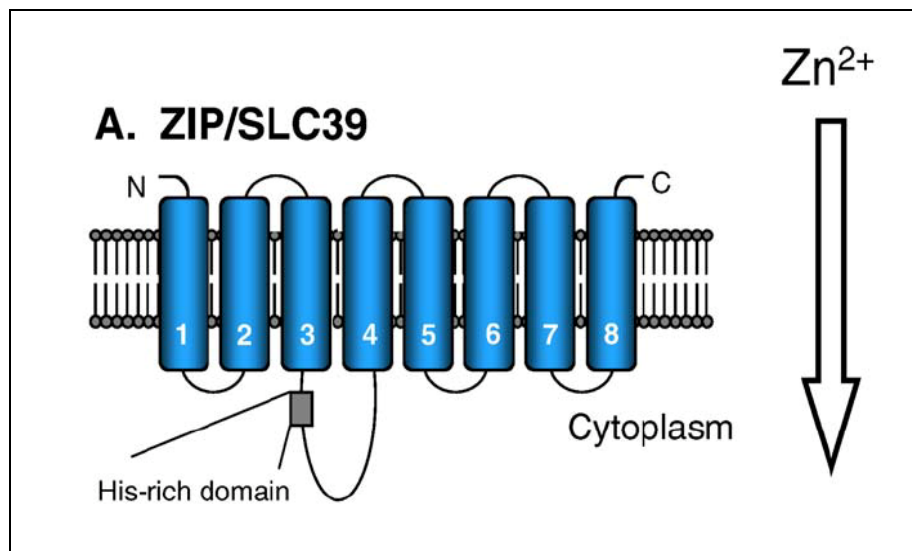


Figura 7. Estructura de los transportadores de Zn familia ZIP.¹⁵¹

Transportador	Cromosoma ¹⁵ ₅	Localización	Ingesta de Zn (R) ¹⁵³	Función	Suplementación
ZIP 1	I	Expresado en varios tejidos. ^{176,177}	Poco regulado por la ingesta del Zn. ¹⁵³	Captación de Zn a través de la membrana plasmática de diversos tipos de células. ⁹² Poco regulado bajo concentraciones aumentadas de Zn. Puede ser utilizado como biomarcador del estatus de Zn en humanos. ¹⁷⁸ Propuesto como gen supresores de tumores. ¹⁷⁹	Con suplementos de Zn se normalizaron los niveles de ZIP1 y ZIP14, pero no afectó los niveles de ARN m de las citoquinas o sus receptores. ¹⁸⁰
ZIP 2	XIV	Hígado, bazo, intestino delgado, medula ósea y células sanguíneas. ¹⁵⁵	ZnD (+)	Asociados con la re-absorción de Zn en el líquido prostático. ¹⁷⁹ En las células mononucleares de la sangre periférica la expresión del Zip 2 incrementa. ¹⁵⁵ Propuesto como gen son genes supresores de tumores. ¹⁷⁹	-
ZIP 3	XIX	Células sanguíneas. ¹⁵³ Medula ósea, bazo, intestino e hígado.	ZnE (-) ZnD (+)	Asociados con la re-absorción de Zn en el líquido prostático. ¹⁷⁹ Bajos niveles de expresión detectados en muchos tejidos, pero en el tejido testicular la expresión es más alta. ¹⁵³ Puede desempeñar papeles específicos para la homeostasis del Zn en lugar de papeles principales en la adquisición de Zn en la dieta. ¹⁵⁵ Propuesto como gen son genes supresores de tumores. ¹⁷⁹ la absorción de Zn puede ser inhibida por otros metales, lo que sugiere que ZIP3 no es específico para el Zn. ¹⁸¹	-
ZIP 4	VIII	Intestino delgado, riñón, Colon. ¹⁵³	ZnD (+)	Rol importante en la absorción intestinal del Zn. Papel importante en la homeostasis del Zn en los seres humanos. ^{182,183} y las alteraciones en la expresión observadas durante la inflamación aguda encontrándose que Zip 4 está disminuido. ¹⁸⁴	Efectividad suplementación de Zn en la dieta. ¹⁸⁵ El suplemento de Zn reduce el Zip4 hasta niveles indetectables en la mucosa ileal. ¹⁵²
ZIP 5	XII	Intestino, páncreas, hígado y riñones.	ZnD (+)	Rol de prevención de sobrecarga de Zn en la célula. Zip 5 puede oponerse con Zip4 y que puedan participar en el transporte del Zn debido a su homología. ¹⁸³ Papel central en el control de nivel de Zn del organismo. ¹⁸⁶	-
ZIP 6	XVIII	Cerebro, próstata, placenta y mama. ¹⁸⁷	-	Importador de Zn que se localiza en la membrana plasmática de ciertos tipos de células. ^{187,188}	-
ZIP 7	VII	Retículo endoplasmático. ¹⁸⁹	-	Involucrada en la progresión del cáncer de mama y componente crítico en la redistribución	La abundancia de proteínas de Zip7 se reprime por

ZIP 8	IV	Pulmón, riñón, testículos, hígado, cerebro, intestino delgado y células sanguíneas.	-	de Zn a partir de depósitos intracelulares. ¹⁹⁰ Importante para el sistema inmune. Puede tener rol importante en la función de los monocitos. ¹⁹¹ Podría inducirse por mediadores inflamatorios como el LPS y TNF- α . Importador de Zn esencial en la aparición de la inflamación, lo que facilita la citoprotección dentro del pulmón. ¹⁹²	suplementos de Zn.
ZIP 9	XIV	-	-	Se supone que interviene en la homeostasis del Zn en la vía secretora sin alterar significativamente la homeostasis del Zn citosólico. ¹⁹³ Poco estudiado.	-
ZIP 10	II	Hígado, cerebro, células progenitoras eritroides. ¹⁵³	ZnD (+)	Papel interesante para el Zn y Zip10 en la actividad migratoria de células metastásicas de cáncer de mama y posible marcador para fenotipos metastáticos del cáncer. ¹⁹⁴	-
ZIP 11	XVII	-	-	Función desconocida.	-
ZIP 12	X	Cerebro, ¹⁸⁹ ojo, pulmón, testículo.	-	Implicado en la esquizofrenia. No hay otra estructura, función o información disponible sobre este transportador.	-
ZIP 13	XI	-	-	Permite el flujo de salida de Zn ²⁺ del aparato de Golgi en el citoplasma. En ratas se demuestra el papel crucial en la formación del tejido conectivo. ¹⁹⁵	-
ZIP 14	VIII	Hígado, intestino.	-	Implicado en la fase aguda de respuesta frente a la deficiencia de Zn en hígado. Asociación con citoquinas inflamatorias IL ₆ y TNF- α . ¹⁹⁶	Con suplementos de Zn se normalizaron los niveles de ZIP1 y ZIP14, pero no afectó sobre los niveles de ARNm de citoquinas o sus receptores.

ZnD = Deficiencia de Zn; ZnE = Exceso de Zn; (+) = Sobreexpresión; (-) = Baja regulación.

Tabla VI. Transportadores de Zn ZIP (SLC39A).

2.6. Localización intracelular de los transportadores de Zn SLC30A y SLC39A.

Como hemos presentado anteriormente, las familias de los transportadores tienen función inversa. Los ZnT expulsan el Zn de los orgánulos o las células. En cambio, los Zip tiene la función de introducir el Zn en la célula.¹⁵¹

En eucariotas, al menos cuatro transportadores diferentes están implicados en la absorción de Zn por este organismo unicelular (Figura 8).¹⁵¹ Dentro de las células los transportadores se pueden situar en la membrana celular o de los orgánulos celulares realizando las funciones específicas de cada uno. ZnT1 se puede encontrar en la membrana celular y mantener el flujo de Zn; el ZnT2 se encuentra en los orgánulos celulares y está asociado con las proteínas; el ZnT3 se encuentra en las vesículas sinápticas de las neuronas; los ZnT4, 5, 6,7 parecen estar en el aparato de Golgi; el ZnT9 está implicado en transporte de Zn al núcleo.¹⁹⁷

Los Zip1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14 se encuentran principalmente localizados en la membrana plasmática, estando implicados en la absorción de Zn por células de mamífero; el Zip 7 se localiza en retículo endoplasmático; el Zip 8 en mitocondrias y vesículas; el Zip 13 parece estar en aparato Golgi.¹⁵¹

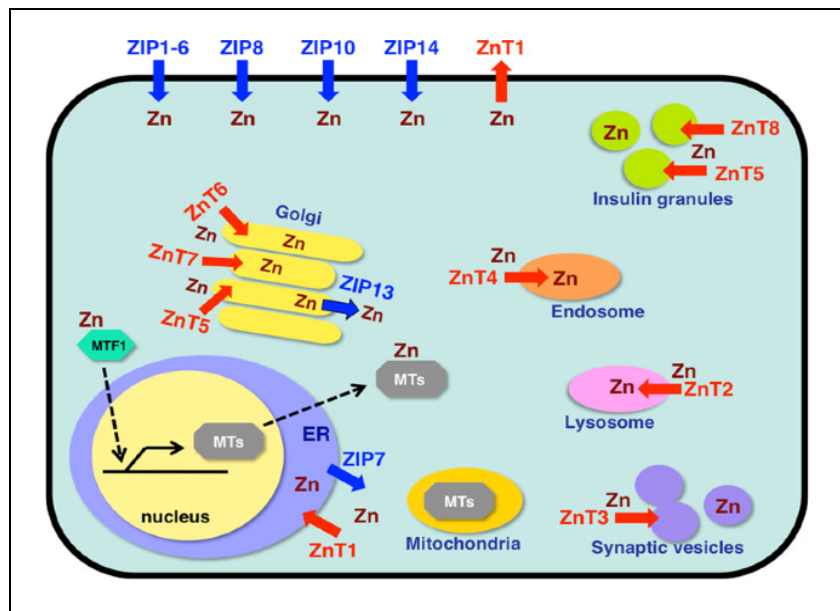


Figura 8. Localización subcelular de los transportadores de Zn y metalotioneínas. Localización y funciones potenciales de transportadores de Zn de la proteína Slc39 / Zrt / Irt-like (ZIP) (azul) y las familias SLC30 / ZnT (rojo). Las flechas muestran la dirección prevista de Zn movilización.¹⁹⁸

Capítulo 3

Sujetos y Metodología

3. SUJETOS Y METODOLOGÍA.

3.1. Diseño del Estudio.

El diseño general está basado en un estudio intra-sujeto, con intervención mediante educación nutricional y suplementación, en un colectivo de jugadores de balonmano, a los que se les realizó un seguimiento a lo largo de la temporada, comprendiendo el periodo competitivo. Se comparó el punto inicial realizado al inicio del estudio, con periodos de suplementación aislada de micronutrientes y periodos de ausencia de suplementación (Figura 9).

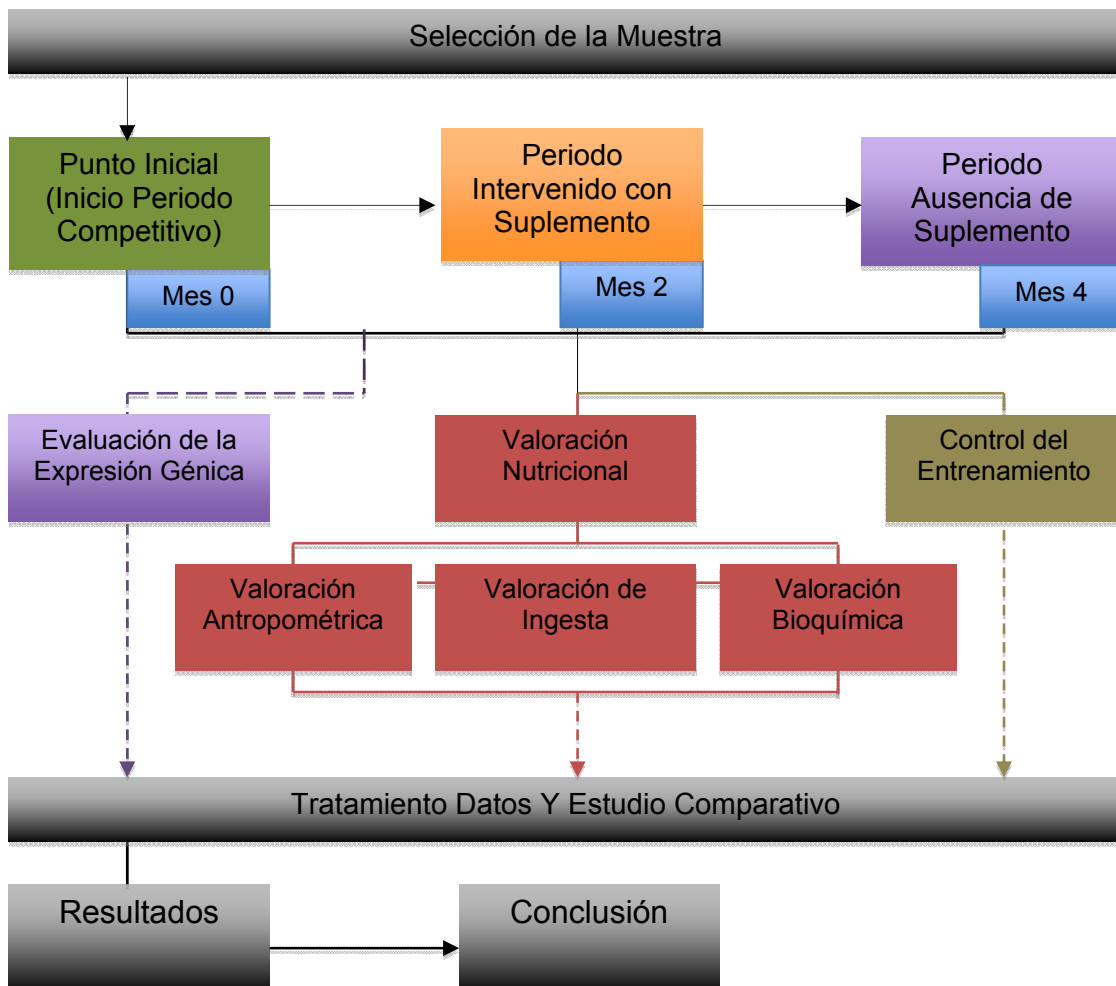


Figura 9: Diseño del Estudio.

Este diseño, se ha realizado con la finalidad de conocer el estatus de los distintos macronutrientes mediante la suplementación individual de cada uno de ellos, como se menciona anteriormente. Hasta el momento, esto ha derivado en dos publicaciones en revistas con factor de impacto recogidas en ISI. La primera, analiza el efecto de la suplementación con ácido fólico sobre este colectivo y su influencia sobre la homocisteína (biomarcador de riesgo cardiovascular -CVD-); la segunda, analiza el efecto de la suplementación con Mg, sobre los niveles plasmáticos y eritrocitarios de este mineral, y su relación con el ejercicio. En esta publicación, encontramos una asociación con el Zn, mineral que desarrollaremos en esta tesis doctoral. Existe una tercera publicación en la que se evaluó el efecto de la aplicación de un programa de educación nutricional sobre los parámetros de ingesta y frecuencia de consumo de alimentos. Todas estas publicaciones han sido adjuntadas en el apartado de resultados como la publicación de los mismos:

- [1] [J Int Soc Sports Nutr. 2013 Feb 21;10\(1\):10. doi: 10.1186/1550-2783-10-10.](#)
- [2] [Magnes Res. 2012 Jul;25\(2\):79-88. doi: 10.1684/mrh.2012.0311.](#)
- [3] [Nutr Hosp. 2013 Julio-Agosto;28\(4\):1065-1076.](#)

En la actualidad, la publicación correspondiente al Zn, que se va a desarrollar en la presente tesis doctoral, se encuentra en fase de publicación, con un estudio de expresión génica que tiene como objetivo valorar la evolución en la expresión de los transportadores de Zn durante el ejercicio como consecuencia de la suplementación con Zn.

3.2. Población de Estudio.

La población estuvo constituida por un colectivo de 16 sujetos mayores de 18 años, jugadores de balonmano de la población de Granada, militantes en División de Plata del balonmano en España. De los 16 jugadores seleccionados para el estudio, 2 abandonaron el estudio, uno tras el consentimiento informado y otro durante la fase de tratamiento.

3.2.1. Puntos de Registro del Estudio.

Los registros se llevaron a cabo cada 4 meses, interviniendo cada dos meses mediante suplementación aislada de Mg, ácido fólico, y Zn, intercalado con dos meses en los que no se suplementó, representando un total de 12 meses (3 bloques de 4 meses) dentro del periodo competitivo de nuestro colectivo.

3.2.2. Recogida de datos en cada punto de medición.

Cada punto de registro o medición se realizaba en un día normal de entrenamiento, en los que se llevaban a cabo una serie de mediciones que se desglosaban de la siguiente forma:

1º A la llegada de los jugadores a la sala de extracción, se realizaba la valoración antropométrica del individuo, mediante la impedancia bioeléctrica y el registro de pliegues, perímetros y amplitudes. Este registro se realizó llevando a cabo el protocolo descrito en la literatura.^{39,40,199}

2º Posteriormente se procedía a la realización de la extracción de sangre por parte de personal cualificado.

3º Finalmente, se realizaban citas individualizadas a cada jugador en las que se hacía el cuestionario de consumo de alimentos mediante recordatorio de 72 horas y el cuestionario de frecuencia de consumo, llevado a cabo por especialistas previamente entrenados.

Una vez registrados todos los parámetros mencionados anteriormente, los deportistas seguían su rutina de entrenamiento.

3.3. Metodología de registro y control del entrenamiento.

El registro y control del entrenamiento, fue llevado a cabo por parte del equipo técnico. Este registro se realizó en base a la periodización y control del entrenamiento descrito por diversos autores.²⁰⁰ La planificación del entrenamiento según este método, se realiza clasificando la temporada en distintos niveles en función del grado de especificidad del entrenamiento: Macro ciclo, Mesociclo y Microciclo. En la siguiente figura (Figura 10), se muestra un ejemplo de la hoja de registro de entrenamiento:

MACROCICLO I	MESOCICLO 1	Microciclo 1 GRADUAL	Microciclo 2 CHOQUE	Microciclo 3 CHOQUE	Microciclo 4 CHOQUE	Microciclo 5 REC + COMP + CONTROL	MESOCICLO 2	Microciclo 6 CARGA + COMP	Microciclo 7 CARGA + COMP	Microciclo 8 CARGA + COMPETICION	Microciclo 9 REC + CONTROL	MESOCICLO 3	Microciclo 10 COMPETICION	Microciclo 11 COMPETICION	Microciclo 12 COMPETICION	Microciclo 13 RECUP + CONTROL	MESOCICLO 4	Microciclo 14 CARGA + COMPETICION	M
TEMPORADA 2009/2010	PREPARATORIO	5 al 9 Agos	10 al 16 Agos	17 al 23 Agos	24 al 30 Agos	31 al 6 Sep	COMPETICION	7 al 13 Sep	14 al 20 Sep	21 al 27 Sep	28 al 4 Oct	COMPETICION	5 al 11 Oct	12 al 18 Oct	19 al 25 Oct	26 al 1 Nov	COMPETICION	2 al 8 Nov	9
RESULTADOS	5-8 al 6-9				AMISTOSOS 2	TORNEO BADAJOZ	7-9 al 4-10	ANAITASUNA	BARAKALDO	TEUCRO	SAGUNTO	5-10 al 1-11	SINFIN	BIDASOA	ARANDA	DESCANSO	2-11 al 29-11	PALMA DEL RIO	H
NIVEL DIFICULTAD							OBJETIVOS	26-30 *****	30-28 ****	25-26 *****	37-24 *****	OBJETIVOS	31-31 ***	29-26 ****	33-25 ****		OBJETIVOS	28-30 *****	20
A1	230	0	0	120	80	30	175	50	65	60	0	25	15	0	10	0	45	15	15
A3	245	50	110	30	15	40	225	85	30	50	60	200	65	30	55	50	220	60	60
A4	60	0	0	15	45	0	30	15	15	0	0	15	0	0	0	15	80	35	35
A5	180	0	0	50	75	55	225	80	60	50	35	135	50	40	45	0	165	55	55
D1	50	20	20	0	10	0	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0	10	10	10
D3	40	0	0	30	0	10	80	15	35	30	0	0	0	0	0	0	45	0	0
D4	15	0	0	15	0	0	105	30	35	20	20	65	25	40	0	0	15	0	0
D5	60	0	0	0	35	25	110	15	30	30	35	125	40	40	45	0	130	35	35
CAL PORT	160	0	60	30	30	40	240	70	70	60	60	160	50	40	50	20	170	40	40
C1	40	10	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
C3	70	0	0	10	30	30	150	40	40	40	30	120	50	40	20	10	110	40	40
C5	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0
R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	1060	120	330	240	220	150	480	155	110	105	110	250	80	80	30	60	330	100	100
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS	87	35	42	10	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	50	25	0	0
LYT	325	65	185	40	35	0	55	0	0	30	25	200	10	0	40	150	140	0	0
SITUA ESP	40	0	0	0	0	40	10	0	10	0	0	15	0	15	0	0	50	10	10
PARTIDO	360	0	0	180	180	360	90	90	90	90	270	90	90	90	90	0	360	90	90
Calentamiento	295	190	45	40	10	10	155	50	45	35	25	125	40	35	50	0	150	35	35
Tiempo Total	2327	490	802	600	765	610	2400	695	635	600	470	1775	535	450	435	355	2085	525	525
Tiempo Tarde																			
RPE Planificado																			
Información																			
HORAS	55	8	13	11	13	10	40	12	11	10	8	30	9	8	7	6	35	9	9

Figura 10: Registro de la temporada de entrenamiento.

El nivel más general de especificidad va a ser el macrociclo. La temporada de los deportistas estuvo compuesta de dos macrociclos, cada uno de ellos correspondiente a las dos fases que componen la temporada (ida y vuelta). Estos dos macrociclos se planificaron con una carga distinta debido a la distribución de los partidos, el momento de la temporada, etc.

Cada macrociclo estuvo compuesto por mesociclos, correspondientes aproximadamente cada uno a un mes natural. Estos tuvieron una carga distinta según el mes de competición en el que se encontraban, así como la cantidad de partidos presentes en ese mes.

Cada mesociclo, a su vez, se dividió en microciclos o semanas, sobre las cuales se planifica de manera más específica la temporada deportiva. La clasificación que se realizó de los distintos microciclos fue la siguiente:

AM = Aprendizaje + Partido; GR = Gradual; MR = Partido + Recuperación; RC = Recuperación + Control; S = Choque, SM = Choque + Partido; T = Transición; TL = Carga de Entrenamiento; TLM = Carga + Partido; TLR = Carga de Entrenamiento + Recuperación.

Podríamos distinguir varios bloques dependiendo de los tipos de microciclos descritos anteriormente.

1º Bloque (GR): Se trata de periodos de inicio de entrenamiento, donde se hace un aumento progresivo de la carga, viniendo precedido generalmente de periodos de reposo entre una temporada y otra (periodos de transición). Su objetivo principal es preparar al atleta para un nuevo nivel más alto de capacidad de trabajo mediante el aumento progresivo del entrenamiento. Se somete a los jugadores a un volumen de intensidad global no muy alta.

2º Bloque (S; SM; TL; TLM; AM): Se trata de periodos en donde se aumenta bruscamente las demandas del entrenamiento por encima de las aplicadas anteriormente. El objetivo fue superar el nivel de adaptación conseguido anteriormente. Los microciclos S y TL se van a diferenciar principalmente en la intensidad, siendo S el microciclo donde la intensidad prevalece sobre el volumen de entrenamiento y TL el microciclo donde el volumen prevalece sobre la intensidad del entrenamiento. Este tipo de microciclos obtienen como resultado un elevado nivel de

fatiga. Los microciclos SM y TLM van a suponer además la adición de un partido al final de este, conllevando un mayor acúmulo de entrenamiento y competición.

El microciclo AM, va a ser un microciclo algo más específico, en el que se entrenó a una intensidad alta, pero con un volumen de entrenamiento elevado. Además, lleva un componente de aprendizaje donde se trabaja la técnica y la táctica pero siempre premiando la calidad de las acciones realizadas. Son semanas donde la precisión de todas las acciones técnico-tácticas es muy elevada.

3º Bloque (MR; TLR; RC; T): Este último bloque, engloba distintos tipos de microciclos, en los que se realizan microciclos MR, caracterizados por ser semanas donde se prefiere recuperar debido a la dificultad del partido presente, microciclos TLR, caracterizados por la ausencia de partidos, y debido a ello, se hace una primera fase con mucha carga de entrenamiento y su posterior recuperación, y finalmente, microciclos RC y T, donde la recuperación prevaleció por encima de todo.

En las siguientes figuras (Figura 11a y 11b) se muestra la distribución de carga durante la temporada. En ellas se pueden observar la planificación llevada a cabo durante toda la temporada, así como las sesiones y horas por semana de entrenamiento.

Temporada 08/09.

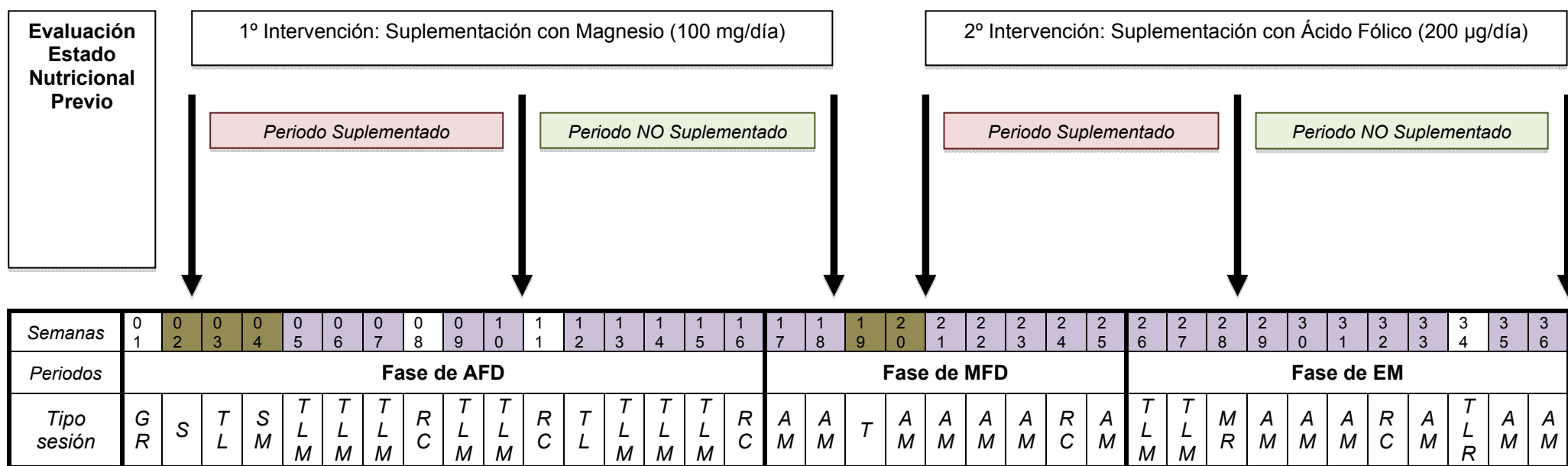
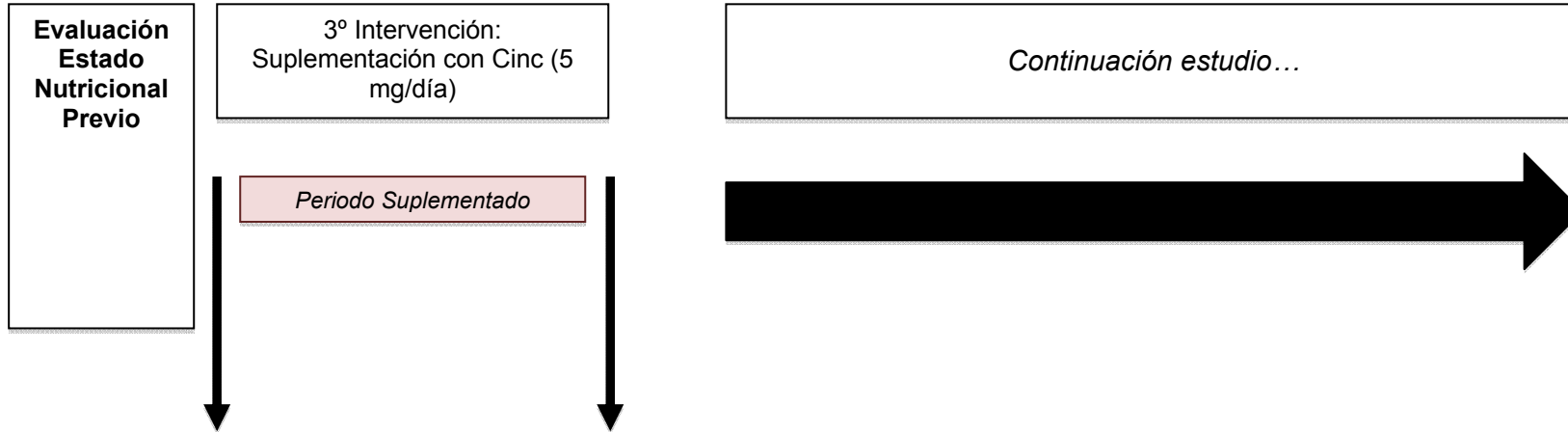


Figura 11a: Diseño y planificación de la temporada de entrenamiento. AM = Aprendizaje + Partido; GR = Gradual; MR = Partido + Recuperación; RC = Recuperación + Control; S = Choque, SM = Choque + Partido; T = Transición; TL = Carga de Entrenamiento; TLM = Carga + Partido; TLR = Carga de Entrenamiento + Recuperación; AFD = Adquisición de la Forma Deportiva; MFD = Mantenimiento de la Forma Deportiva. EM = Entrenamiento Moderado.

Temporada 09/10.



Semanas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
Periodos	Fase de AFD													Fase de MFD						Fase de EM																	
Tipo sesión	GR	S	S	SM	TLM	TLM	TLM	TLM	RC	TLM	TLM	TLM																									
s/s	4	5	5	5	5	6	5	5	4	5	4	4																									
h/s	8	13	11	13	10	12	11	10	8	9	8	7																									

Figura 11b: Diseño y planificación de la temporada de entrenamiento. AM = Aprendizaje + Partido; GR = Gradual; MR = Partido + Recuperación; RC = Recuperación + Control; S = Choque, SM = Choque + Partido; T = Transición; TL = Carga de Entrenamiento; TLM = Carga + Partido; TLR = Carga de Entrenamiento + Recuperación; AFD = Adquisición de la Forma Deportiva; MFD = Mantenimiento de la Forma Deportiva. EM = Entrenamiento Moderado.

3.4. Metodología en la evaluación del estado nutricional.

3.4.1. Valoración antropométrica.

Para la realización del análisis antropométrico, se llevaron a cabo dos procedimientos comúnmente utilizados. El primero de ellos consistió en el análisis mediante bioimpedancia, en el que se registraron parámetros como peso, índice de masa corporal, masa grasa (kg), masa magra (kg), y porcentaje de grasa corporal, mediante un equipo de bioimpedancia Tanita TBF-300WA.

Por otro lado, se realizó un registro de pliegues (pectoral, axilar, subescapular, tríceps, abdomen, suprailiaco, muslo), perímetros (pecho, brazo, cintura, cadera, muslo, pierna media), y amplitudes (diámetro biepiestiloideo, diámetro biepihúmero, diámetro biepi fémur), mediante un protocolo de registro descrito en la literatura (ISAK).^{39,40,199} Esta metodología tiene como objetivo proporcionar información sobre el somatotipo de nuestro colectivo.

La altura se midió en un tallímetro con un rango de error de 0.01 cm. Para la medición de pliegues cutáneos se utilizó un Caliper marca Holtain (Crymych U.K.), de sensibilidad 0,2 mm. El registro de las amplitudes corporales se realizó utilizando un paquímetro compás de corredera graduado tipo Martin con capacidad de medida de 0 a 250 mm, y precisión de 1 mm.

3.4.2. Recordatorio de consumo de alimentos de 72 horas.

El recordatorio de 72 horas nos permitió obtener datos de ingesta de nutrientes y porcentaje de adecuación de ingesta. Se registraron dos días durante la semana y uno festivo, ya que en estos días la alimentación se modifica. Con ello evitaremos sesgos que deriven en errores en el registro de datos.

3.4.3. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

El cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ), nos permitió conocer hábitos de consumo de los jugadores, para poder asociarlo a la ingesta de nutrientes, abarcando las veces que se consumen al día, a la semana, al mes o al año

a partir de una lista de más de 200 alimentos. Esta información nos aporta datos sobre los errores que se comenten en el consumo de determinados grupos de alimentos en estos colectivos.

3.4.4. Programa de educación nutricional.

El Programa de Educación Nutricional fue realizado por un equipo de especialistas en nutrición, y está específicamente diseñado para éste tipo de población.

Dicho programa aborda tres fases:

1ª Fase: El equipo de nutricionistas impartió diversas charlas basadas en aspectos relacionados con la nutrición en general, explicando los tipos de alimentos y nutrientes, y la importancia de ingerirlos de manera equilibrada para conseguir una buena salud y un buen rendimiento a corto y largo plazo.

2ª Fase: La educación se centró cómo deben alimentarse para obtener un rendimiento óptimo al realizar actividad física, mostrando los requerimientos específicos necesarios en los deportistas, así como los errores que se cometen en la actualidad.

3ª Fase: Se estableció un debate entre los ponentes, los deportistas y sus entrenadores, donde cada sujeto exponía sus dudas e inquietudes con respecto al tema en cuestión, de manera que pudieran ser aclaradas.

Durante el periodo de educación nutricional, los nutricionistas dejaron el debate abierto a cualquier duda que surgiera en los participantes.

3.4.5. Software informático de conversión de alimentos a nutrientes: Nutriber®.

Para la transformación de los alimentos en nutrientes se utilizó un software profesional Nutriber, S.A.,²⁰¹ que nos permite obtener el nutriente en valor absoluto y en porcentaje de adecuación de ingesta respecto a la ingesta recomendada de ese nutriente, a partir de los alimentos ingeridos por cada individuo, cualitativa y cuantitativamente.

3.5. Estudio de suplementación con Zn.

Se ha realizado un estudio de intervención mediante la suplementación con Zn a un colectivo de 11 sujetos mayores de 18 años, jugadores de balonmano de la población de Granada, militantes en División de Plata del balonmano en España, realizándose en general una valoración del estado nutricional y un estudio de expresión génica en transportadores de Zn, para observar la evolución como consecuencia de esa suplementación.

3.5.1. Valoración de ingesta de Zn.

Para el Zn, se utilizaron tablas de recomendaciones para población sana elaborada por Mataix y col.¹⁸, y Cuervo y col.⁴⁷ (Tabla VII) donde se realiza una comparación entre Ingestas Dietéticas de Referencia (DRI) según los diferentes países de la Unión Europea, los Estados Unidos (EEUU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en población sana adulta. Se considera el valor de <2/3 de la ingesta recomendada como límite arbitrario por debajo del cual se considera una ingesta insuficiente para el nutriente específico.

País	Rango Edad	mg/día
España	20-39 años	15
Reino Unido	19-50 años	9.5
Países Nórdicos	19-30 años	9
Alemania, Austria y Suiza	19-51 años	10
Francia	22-64 años	12
Bélgica	19-60 años	9
Italia	18-59 años	10
Irlanda	18-64 años	9.5
Comunidad Europea (1992)	> 18 años	9.5
Estados Unidos	19-50 años	11
FAO/WHO (2001)	19-50 años	4.2-14

Tabla VII. Referencia de ingesta de Zn en personas sanas.

3.5.2. Intervención mediante suplementación con Zn en la población de estudio.

Una vez realizada la valoración bioquímica de los jugadores que forman parte del estudio que a continuación se describe en el apartado 3.5.3, en la que

demostramos que aproximadamente el 33% de los sujetos eran deficientes en Zn, se procedió a realizar el estudio de suplementación con dicho mineral.

La intervención dietética consistió en suplementación diaria mediante 5 mg de Zn durante dos meses, comenzando después de la valoración inicial. La sal de Zn empleada a partir de comprimidos fue ZnO. A los jugadores se les prescribió que tomaran el suplemento a primera hora de la mañana, insistiéndoles mucho en el cumplimiento de la prescripción, para lo cual se les suministró una hoja recordatorio en el que anotaban el registro diario de la toma.

Según las recomendaciones españolas, esta dosis se corresponden con el 33% de las RDAs para población adulta sana. En referencia con otras recomendaciones propuestas en otros países como Reino Unido y EEUU, se correspondería con el 53% y 45% de las RDAs respectivamente.

3.5.3. Valoración bioquímica y de Zn en la población de estudio.

3.5.3.1. Recogida de muestras.

El proceso de extracción de sangre, se llevó a cabo a primera hora de la mañana. Esta se realizó en ayunas y transcurridas 12 horas de la sesión de entrenamiento precedente. Posteriormente se procedió a la determinación de los distintos parámetros bioquímicos. La sangre se extrajo en diferentes tipos de tubos según la finalidad a la que se destinaban y los parámetros a analizar:



Figura 12. Recolección de muestras de sangre.

- I. 7.5 ml en tubos de vacío que contienen heparina de litio liofilizada (T Ferumo®, Venojet) destinada al análisis del Zn.
- II. 10 ml repartidos en dos tubos con gelosa (Vacuette® Z serum Sep., Germany) para la obtención de suero destinado al análisis de parámetros clínicos como albúmina, ferritina, hemograma, etc.
- III. 2.5 ml en tubos PAXgene™ RNA tubes para sangre total para posterior extracción de ARN y estudio de expresión génica.
- IV. 2.5 ml en tubos con EDTA para otras medidas bioquímicas como homocisteína y hemograma.

3.5.3.2. Tratamiento de las muestras.

La sangre fue centrifugada a 4°C durante 15 min a 3000 rpm, con el objetivo de separar el plasma y las células sanguíneas. Tanto el plasma anteriormente, como las células sanguíneas, fueron separadas en alicotas en tubos eppendorf y almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis. Las condiciones de trabajo se realizaron en un ambiente oscuro y frío, con finalidad de evitar la oxidación de las muestras. El agua bidestilada empleada es de pureza MilliQ (Millipore® Corp., Bedford, MA) y todos los recipientes y material de laboratorio se deja en remojo en ácido nítrico al 1% durante 24 horas anteriores a su empleo. Todos los reactivos empleados son de la casa Merck de calidad ultra pura (Darmstadt, Alemania).

3.5.3.2.1. Determinación de Zn.

Antes de proceder a la determinación de Zn en el equipo de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo, se procedió a la mineralización de la muestra por vía seca. Para ello las muestras de plasma y células introdujeron en probetas adicionándose 1 ml de ácido nítrico suprapuro (65%) en baño de arena. Una vez eliminados los vapores nitrosos, se añaden 3ml de ácido nítrico al 3% en campana de flujo laminar. La solución obtenida se transfiera a tubos de plástico, hasta posterior análisis. Al mismo tiempo, se realiza un control con agua bidestilada para comprobar posible contaminación.

Las determinaciones de Zn se realizaron por ICP-MS. Se realizaron medidas para la determinación de Zn por espectrometría de masas con fuente de plasma de

acoplamiento inductivo y filtro de iones por cuádruplo ICP_MS NEXION 300D. Este aparato está localizado en el servicio de análisis de King's College (UK).

3.5.3.2.2. Determinación de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

Reactivos: Los reactivos empleados en ésta técnica son: Sustrato Mixto; Solución Tampón; Xantina Oxidasa; Patrón; Tampón Fosfato 0.01 mol/L; Ransod Control.

Proceso de obtención: Para medir la SOD se utilizó el kit RANDOX Ransod-SD125 (determinación cuantitativa in vitro de Superóxido Dismutasa). Se realizan 2 lecturas en lector de placas (Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, USA), con un tiempo de 3 minutos entre lectura y lectura, a una longitud de onda de 505nm a una temperatura de 37°C.

Resultado Final: Se obtienen valores de la actividad de SOD en U/ml, calculados a través del % de inhibición de cada muestra para obtener las unidades de SOD de la curva patrón.

3.5.3.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante total.

La determinación de la capacidad antioxidante total (PAO) se realizó mediante una medida indirecta colorimétrica, en la que se evaluó la capacidad de los antioxidantes como sustrato en la reacción de reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} .

Reactivos: Los reactivos empleados en ésta técnica son: Estándar (polvo de ácido úrico), diluyente de muestra, solución de Cu^{++} , solución stop.

Muestra inicial: Las muestras fueron diluidas previamente antes de comenzar el ensayo.

Proceso de obtención: Para medir la capacidad antioxidante se utilizó el kit JAICA (PAO test kit for Total Antioxidant Capacity -Catalog #KPA050-). Se pone 200 μl de solución diluida de muestras y se hace una primera lectura a 490nm. Después se añade 50 μl de solución Cu^{++} y se deja 3 min a T° ambiente donde Añadir 50 μl de solución stop y leer por segunda vez a 490nm.

Resultado Final: Los niveles de antioxidantes obtenidos se obtienen comparando los valores de absorbancia neta de la muestra con la curva estándar y el equivalente mM de ácido úrico. Este valor se multiplica por el coeficiente 2189 (poder reductor de cobre) dando el resultado en $\mu\text{mol/L}$.

3.5.3.2.4. Otros parámetros bioquímicos relacionados con Zn.

Existen una serie de parámetros asociados al Zn, relacionados con metabolismo de lípidos, proteínas, y de los hidratos de carbono, además de parámetros relacionados con el estado de vitaminas y minerales. También se ha asociado con parámetros relacionados con el estado nutricional (albúmina, prealbúmina y transferrina), la función del sistema inmunológico (linfocitos) y la anemia (hemoglobina).

3.5.4. Estudio Genético: Transportadores de Zn.

En el siguiente apartado se describe el estudio de expresión génica en transportadores de Zn. La monitorización de la expresión génica tanto al inicio (CI) previa a la suplementación, como después de la intervención mediante suplementación (CS).

3.5.4.1. Método de extracción de RNA.

Se trata de un método cómodo en tubos en los que se recogen 2.5 ml de sangre total. Estos tubos, contienen una solución estabilizadora del RNA, que hacen posible su almacenamiento durante varios meses. Se han descrito resultados favorables en cuanto al uso de esta técnica, indicando una buena cantidad, calidad y rendimiento al comparar con otros métodos de extracción del total de RNA de leucocitos extraídos después de lisis de los eritrocitos²⁰² y variando las condiciones ambientales de conservación.²⁰³

3.5.4.1.1. Método de almacenamiento de RNA.

La utilización del método PAXgene™ RNA tubes para sangre total Preanalytix, requiere de 2.5 ml de sangre periférica. La extracción de sangre se realizó el día del control mediante punción venosa en la zona antecubital, utilizando un sistema de extracción con palometas + adaptador para conectar al tubo vacutainer.

Durante el proceso de extracción, el tubo debe mantenerse en posición vertical, por debajo del brazo del donante. Posteriormente, se debe invertir el tubo de RNA de sangre PAXgene de 8 a 10 veces. El objetivo de este proceso es mezclar la sangre de manera uniforme con la solución estabilizadora. Finalmente, se deben realizar varios pasos previos al almacenamiento: 1°.- Dejar 2 horas a temperatura ambiente; 2°.- Almacenar a 4°C durante 24 - 48 horas; 3°.- Almacenar a -80°C hasta realizar el proceso de extracción (no más de 2 meses).

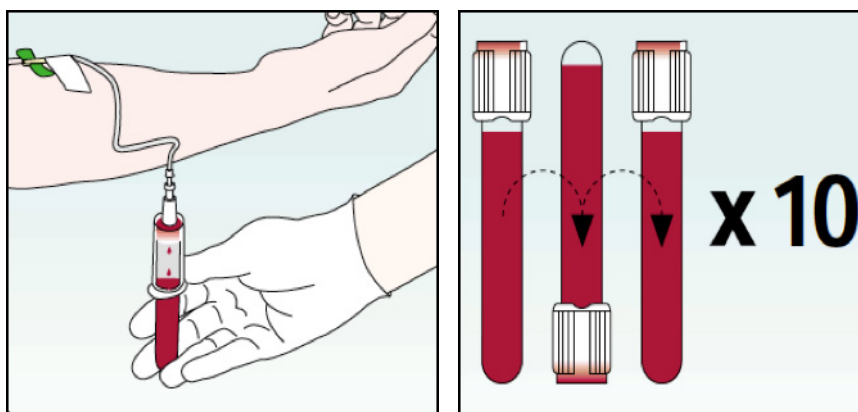


Figura 13: Método de extracción PAXgene™ RNA tubes.

3.5.4.1.2. Técnica de extracción de RNA.

La extracción del ARN se realiza con PAXgene™ Blood RNA Kit. El PAXgene Blood RNA Kit está diseñado para purificar ARN intracelular a partir de sangre humana total (4.8×10^6 - 1.1×10^7 leucocitos/ml) para diagnóstico in vitro, y no para la purificación de ADN genómico o ácidos nucleicos víricos a partir de sangre total.

Previo al inicio de la extracción, los tubos PAXgene™ RNA se incubaron 2 horas en temperatura ambiente. Tras la fase de incubación, se centrifugan los tubos

durante 10 minutos a 6000 rpm y después de elimina el sobrenadante por decantación. Posteriormente, se añade 4 ml de agua RNase-free water y se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 6000 rpm. Eliminar todo el sobrenadante.

Se añade 350 µl de Tampón, se resuspende y se agita hasta que disolución del pellet. En un tubo nuevo se pipeta la solución obtenida y se añaden 300 µl de Tampón de Unión y 40 µl de Proteinasa K.

Se mezcla mediante vortex y se incuba 10 minutos a 55 °C en incubador con agitador en 700 rpm. Posteriormente, el lisado se pipetea en una columna PAXgene Shredder y se centrifuga 3 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante se transfiere en un nuevo tubo y se añade 350 µl de etanol 100% se mezcla bien y se centrifuga corto (1-2 segundos para no destruir el rendimiento del RNA).

Se utiliza una nueva columna PAXgene™ RNA se pipetea la solución obtenida y se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm. Después de añade 350 µl de tampón de lavado y se centrifuga 1 minuto en 13000 RPM.

En otro tubo se prepara 10 µl de DNase I y 70 µl de tampón de digestión del ADN, se mezcla suavemente y se centrifuga durante unos segundos para recoger las gotas de las paredes. Se pipetea 80 µl de la mezcla anteriormente preparada en la columna PAXgene™ RNA y se deja 15 minutos a temperatura ambiente (20-30 °C). Después, se añade a la columna 350 µl tampón de lavado y se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm.

El siguiente paso se realiza de 2 veces y se añade 500 µl de tampón de lavado y se centrifuga 1 minuto y 3 minutos respectivamente a 13000 rpm. Finalmente, se centrifuga durante 1 minuto a 13000rpm.

El último paso va a consistir en colocar la columna PAXgene™ RNA en un tubo nuevo, donde se añade 40 µl de tampón de elusión y se centrifuga 1 minuto el 13000 rpm. Este paso se repite otra vez más veces para que finalmente tengamos un volumen final de 80 µl. Se incuba 5 minutos a 65°C y si el ARN no se utiliza inmediatamente, se guarda a -80 °C hasta su empleo. De cada muestra se pone 2-4 µl en un tubo aparte para medir la integridad y pureza del RNA.

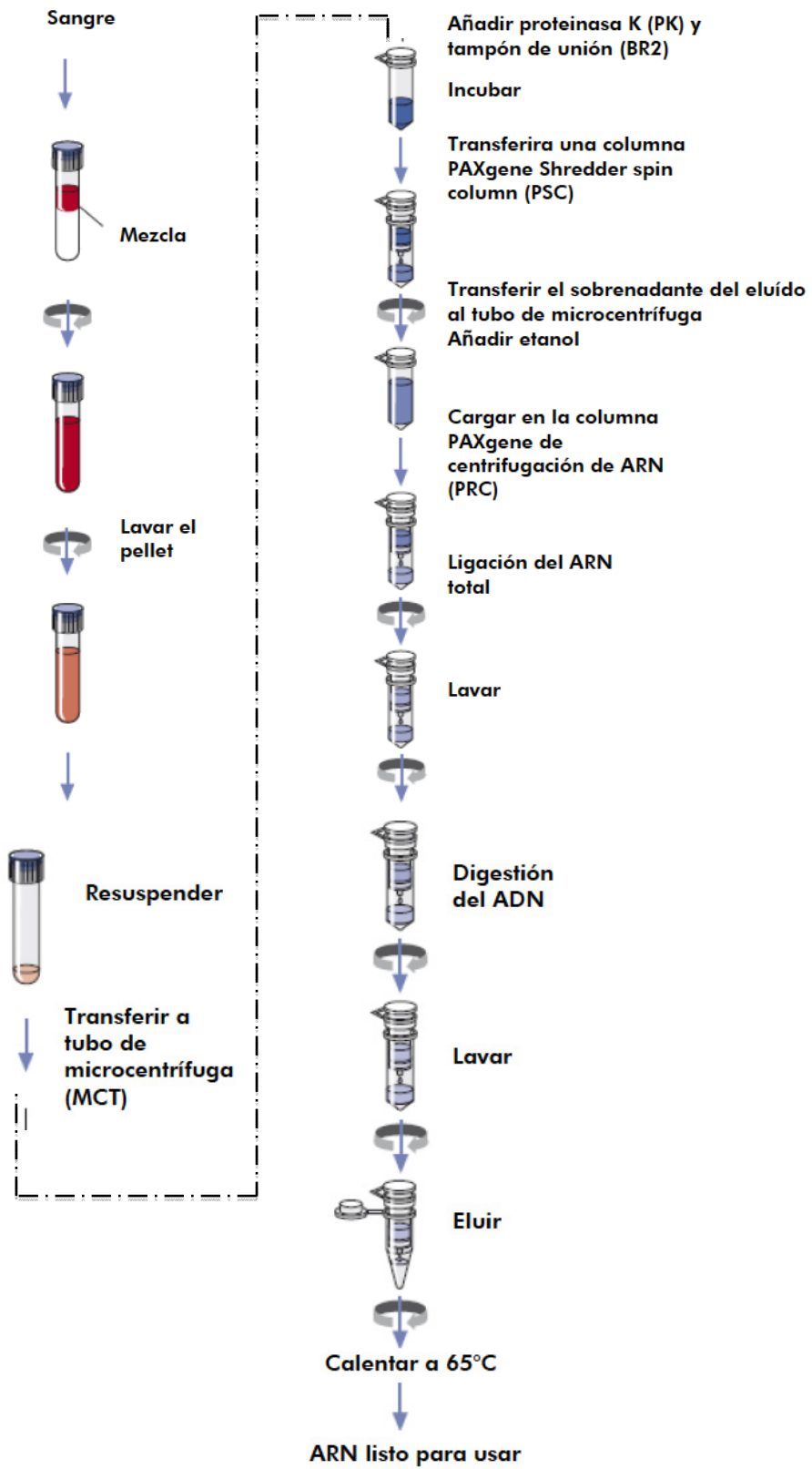


Figura 14. Protocolo de extracción PAXgene Blood RNA kit (QIAGEN, BD Company Switzerland).

3.5.4.2. Cuantificación la pureza y la integridad de RNA

Tras la extracción de ARN mediante columnas, se determinó la pureza y la integridad del ARN con el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) y Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies).

Para determinar la pureza del ARN, se midió la concentración, añadidose 1 μ l de RNA en el espectrofotómetro NanoDrop. La absorbancia del RNA y de las proteínas oscila entre 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) respectivamente. La proporción entre los resultados es la pureza de RNA se aceptará cuando el valor sea ≥ 1.9 . Los contaminantes orgánicos como fenol o alcohol, se midieron a través de la absorbancia a 230 nm (A_{230}). Si el resultado es ≤ 1 , se puede inhibir la reacción de RT-PCR.

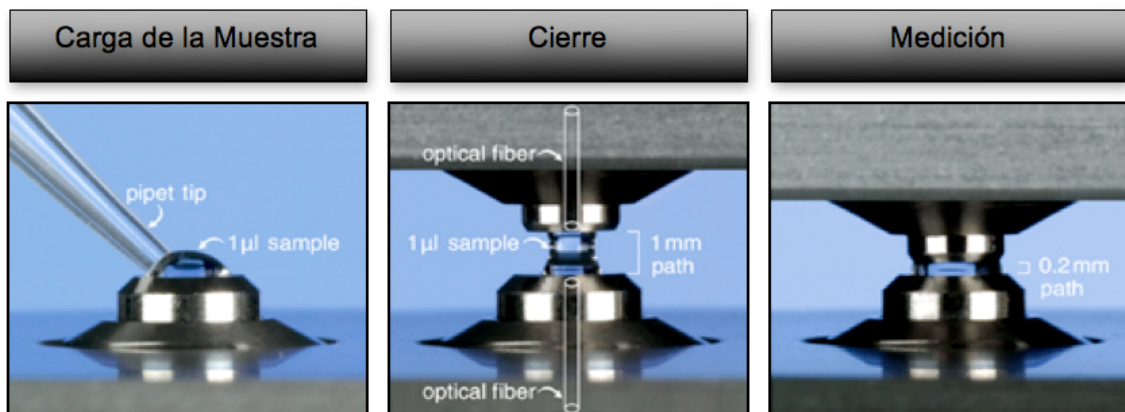


Figura 15: Medición de la pureza mediante espectrofotometría con NanoDrop.

La integridad del ARN, como anteriormente se ha comentado, se determinó utilizando Bioanalyser 2100 System (Agilent Technologies), de acuerdo con el número de integridad RIN o el número RQ. Para la obtención de una buena integridad del ARN, el RIN debía ser de 7-10. El número RIN determina la integridad en una proporción del 18S y 28S del RNA ribosomal.

Cuanto mas cercano sea el RQI al valor 10 del NanoDrop y al RIN del Bioanalyser, se obtendrá una mayor integridad del RNA. Ambas medidas te dan la cantidad de RNA, aunque finalmente se empleó la cantidad determinada mediante NanoDrop. El valore ideal indicativo para obtener una mayor pureza de RNA con NanoDrop a un ratio 260/280 nm, es el valor cuando resulta ser alrededor de 2. Para ver la contaminación orgánica (fenoles o alcoholes), se mide el ratio de absorbancias a

260/230 nm. Cualquier resultado con valor <1 puede indicar una posible inhibición de la reacción de RT-Q-PCR.

La medida de la pureza y de la integridad es crucial para ver si el ARN se encuentra integro o no. Una cantidad, integridad y pureza buenas, es crucial para que los experimentos de q-PCR se realicen de forma idónea.

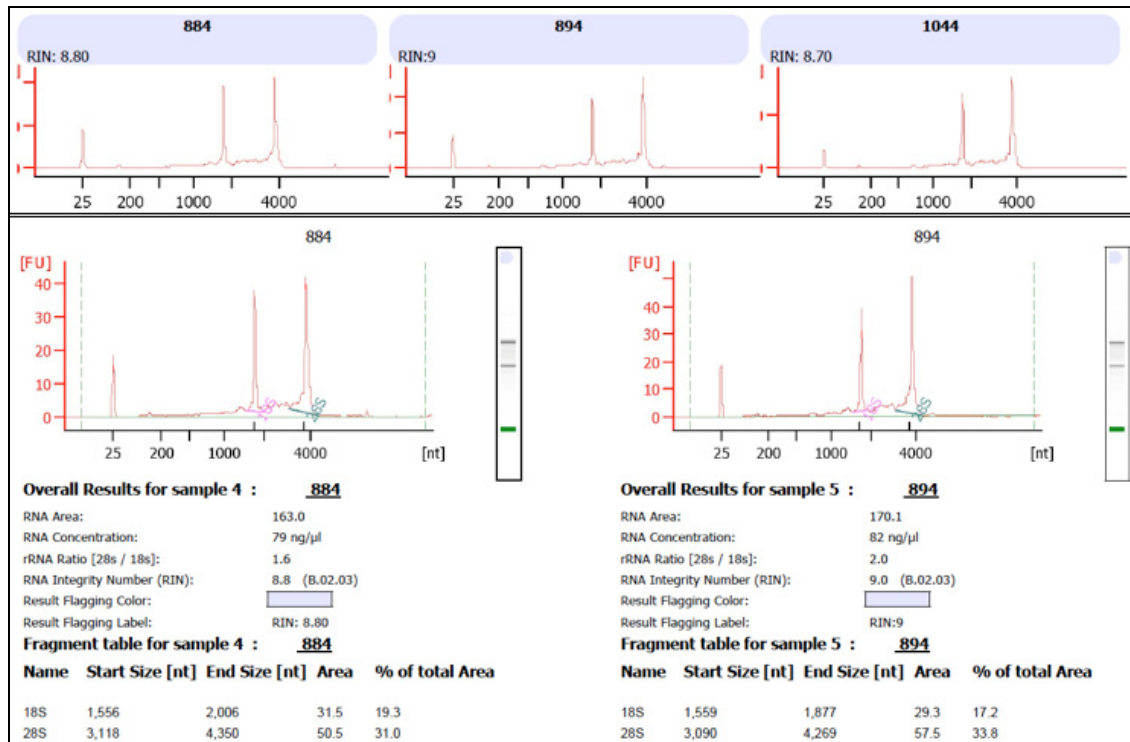


Figura 16. Ejemplo resultados obtenidos sobre la integridad del ARN utilizando el Bioanalyzer.

3.5.4.3. Técnica de síntesis del c-DNA.

Para el proceso de síntesis de c-DNA es necesario utilizar entre 1-5 µl de RNA, 1 µl de Random Hexamer Primer (Invitrogen), 1 µl de dNTP (Invitrogen), y RNase free water hasta completar un total de 12 µl. Mezclar e incubar 5 minutos a 65°C. Después del proceso de incubación, dejar en hielo al menos 1 minuto y centrifugar 1 minuto en TR.

Posteriormente, se añade 4 µl de 5X First Strand Buffer (Invitrogen), 1 µl de DTT (Invitrogen), 2 µl de SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), 1 µl de RNAsa Out, y mezclar pipeteando suavemente. Incubar a 25 °C durante 5 minutos. Después del proceso de incubación, se vuelve a incubar a 50 °C entre 30-60 minutos. Todos los pasos se realizaron en el equipo PCR en un bloque termostático. Para inactivar la reacción se incubó a 70°C durante 15 minutos. Inmediatamente, se guarda a -20 °C o -80 °C hasta que se utiliza la muestra.

3.5.4.4. Síntesis de Primers.

Los Primers para los transportadores de Zn fueron diseñados por Primer Desing (Southampton, UK). Las secuencias de los 24 transportadores humanos y los 3 housekeeping genes se reflejan en la tabla VIII. Todas las reacciones de RT-PCR se han realizado para 50 ciclos.

Los housekeeping genes elegidos fueron: Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (**GAPDH**), 3-Monooxygenase/Tryptophan Tirosina 5 monooxygenasa proteína de activación (**YWHAZ**) y Ubiquitina C (**UBC**). Estos housekeeping genes han sido elegidos para proporcionar una representación más precisa de la normalización.

Gene	Number	Forward	Reverse	BP
SLC30A1	NM_021194	AAGACCCAGCAGTTAGCA	AGGTTGTTTGGTCATGTTT	129
SLC30A2	NM_001004434	GAGAAGTCGTTGGTGGTAC	GAGGGAGAAGAGGCTGATGA	104
SLC30A3	NM_003459	CTTTGGCTGGCACCGTTCA	CTCGATGTGGTAGTCGCTGTG	124
SLC30A4	NM_013309	GCACATTTGGAGTCCCTTTTC	CATTGTTACCCTACTCTGATTCTTAG	96
SLC30A5	NM_022902	TTATAGAGCAGTTGGATGGTTCA	TTCATATTCTGGTGGCAATCTCA	137
SLC30A6	NM_017964	CATTTGGGTTTGAAAGATTAGAAGTC	GTGTGTATCTCGGGCTGTTC	124
SLC30A7	NM_133496	TCCTGTGCCTGAACCTCTC	AGTCGGAAATCAAGCCTAAGC	81
SLC30A8	NM_173851	AGGGAGATTTTAAGATTTTGAGATG	AGGGAAAGGGTAATGGGAGAG	104
SLC30A9	NM_006345	TCCATCCAGCCAGAACAAGT	TGTAACAACCTCGCCATCAAA	150
SLC30A10	NM_018713	ATATCAAGATGCCAGCACAAAAAT	GGGTTCTTCAAGTCCACATT	97
SLC39A1	NM_014437	AGGAACAAGAGATGGTCAAGTC	GTATAGTGTCCAACCTCTGATTCT	96
SLC39A2	NM_014579	TTTGGAGTCGCTGGCATTG	TTTGAGGGTGAGGGTAAATGTC	126
SLC39A3	NM_144564	TTTGGAGGAGGGGTGTTTCT	GGGTAGTCGGTGCTGATGT	107
SLC39A4	NM_01167	GCTGCTGCTGTCCCTGTAC	GGTTTCTGGGCTGTAGGTTTG	107
SLC39A5	NM_173596	GGGGAGAATAGGAGCCAGAA	AAGACGACCCACACACAGAA	105
SLC39A6	NM_012319	ACTACCATCATATTCTCCATCATCA	CATCACCCATTATCACCATCCA	132
SLC39A7	NM_006979	GTTCTCCAAGGTCCAGTTTCC	CCCCAATCACTCCCAATCAG	144
SLC39A8	NM_022154	CTCTCCTCGGATTGATTTGACT	AATGCCTCTGGAATAAGTTGGAA	130
SLC39A9	NM_018375	AGTGGTTGTGGGTGAATAAAGG	GAAATTAACAGCCAAGGGAATGAT	120
SLC39A10	NM_001127257	TGGTGATGGTGACAATGAAGAA	GCAAATCAAAGAGCAATCCTAA	84
SLC39A11	NM_139177	CTGAAATGTCCCTATAAAGAATGAGT	TTGCTACCCCTGTTGGAGAA	86
SLC39A12	NM_152725	CTTGCCTTCCCCAGACTACT	CCAGAGAGTGTTGAGGAGTTG	103
SLC39A13	NM_001128225	ATCGTGGTAATGGTGCTGTTC	CCCTCTGCTCTCACATAT	126
SLC39A14	NM_015359	TTGCCGCTCCATAAATCAAAG	AAACCCATCTGTAGCATAATCATTAG	127

Tabla VIII: Secuencias de primers humanos.

3.5.4.5. Metodología q-PCR.

3.5.4.5.1. Prevención de contaminación.

Trabajar en campana de flujo laminar bien limpia a la que se aplicó DNA-zap; Utilizar puntas con filtro; Emplear RNase-DNase-free water; Utilizar un control negativo (NTC) para ver si se forma primer dimer o ver si las muestras están contaminadas; Cada reacción de RT-PCR, se trabaja con duplicados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ZNT1	ZNT1	NTC	ZNT2	ZNT2	NTC	ZNT3	ZNT3	NTC	ZNT4	ZNT4	NTC
B	ZNT5	ZNT5	NTC	ZNT6	ZNT6	NTC	ZNT7	ZNT7	NTC	ZNT8	ZNT8	NTC
C	ZNT9	ZNT9	NTC	ZNT10	ZNT10	NTC	ZIP1	ZIP1	NTC	ZIP2	ZIP2	NTC
D	ZIP3	ZIP3	NTC	ZIP4	ZIP4	NTC	ZIP5	ZIP5	NTC	ZIP6	ZIP6	NTC
E	ZIP7	ZIP7	NTC	ZIP8	ZIP8	NTC	ZIP9	ZIP9	NTC	ZIP10	ZIP10	NTC
F	ZIP11	ZIP11	NTC	ZIP12	ZIP12	NTC	ZIP13	ZIP13	NTC	ZIP14	ZIP14	NTC
G	GAPDH	GAPDH	NTC	UBC	UBC	NTC	YWHAZ	YWHAZ	NTC	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla IX. Diseño de RT-PCR para la placa de 96 pocillos.

3.5.4.5.2. Procedimiento Q-PCR.

Para cada reacción utilizada 5 µl (entre el 33.3 - 36.5 ng) de cDNA + 10 µl de Primer Design 2x Precision™ Mastermix + 4 µl de RNAsa /DNAsa free water + 1 µl de mezcla de primer mix (volumen total de reacción de 20µl).

Primer Design 2x Precision™ Mastermix: Contiene 2x tampón de reacción + 0.025 U/µl Taq-polimerasa + 5 mM MgCl₂ + 200 µm de cada mezcla del dNTP.

Junto a esto, el mastermix contiene el colorante fluorescente SYBR-verde (SYBR-green) de unión al ADN que aumenta el nivel de fluorescencia al encontrar ADN de doble cadena, así como tinte de calibración ROX.

En las copias del ADN de la muestra después de cada ciclo, la fluorescencia aumenta. El valor recomendado para la plantilla es de 25 ng de cDNA. Sin embargo, en nuestro experimento fue entre 33.3 -y 36.6 ng por reacción. Como se sabe que en algunos de los transportadores de Zn la expresión de genes baja, mediante la adición de una alta concentración de cDNA plantilla, se garantiza la expresión en los genes poco expresados.

La realización de RT-PCR se realizó en el equipo Applied Biosystems 7900 HT RT-PCR. Se realizaron en cuatro etapas: 1º.- Activación de la enzima a 95°C durante 10 minutos; 2º.- 50 ciclos de desnaturalización de la enzima a 95°C durante 15 segundos; 3º.- Recopilación de datos utilizando el tinte SYBR-green a 60 °C durante 60 segundos; 4º.- Análisis de la curva de fusión.

Curva de análisis: Es muy importante ya que debe dar un solo pico estrecho sin "hombros" en torno al 80-85°C, mientras el primer-dimer generalmente tiene un pico más ancho y más bajo formado a temperaturas inferiores de alrededor de 75°C. Para cada una de las reacciones, se aseguró que no había una sola curva de fusión en todos los genes. Las curvas de calibración se realizaron con diferentes concentraciones del DNA.

3.5.4.5.3. Análisis de los datos.

Se realizó mediante el método de cuantificación relativa, que mide la diferencia en el número de veces en la expresión génica a través de la relación de puntos de paso (crossing Point, Cp) con los valores normalizados de housekeeping genes (genes de mantenimiento). Se eligió este método porque no requiere de estándares con una concentración conocida, como es necesario en el método de cuantificación absoluta.

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$$
$$\Delta\Delta\text{Cp} = \Delta\text{CpGene of Interest} - \Delta\text{CpCalibrator}$$
$$\Delta\text{CpGene of Interest} = \text{CpGene of Interest} - \text{Average Ct Housekeeping genes}$$
$$\Delta\text{CpCalibrator} = \text{Cp calibrator} - \text{Average Ct Housekeeping genes}$$

Figura 17 - La expresión relativa entre 2 genes calculada utilizando la formula de expresión relativa.

La expresión relativa de dos genes se calculó midiendo ΔCp para el gen calibrador y el gen de interés por separado. El calibrador puede tener cualquier gen en el conjunto de genes. En nuestro caso hemos comparado con el mismo gen de una muestra diferente. Utilizamos tres housekeeping genes (genes que se expresa in todas las partes), como normalizados, GAPDH, UBC y YWHAZ. Estos 3 genes fueron elegidos utilizando el software geNorm comparado con otros 12 genes de referencia realizados por PrimerDesign (Southampton, UK). Los GAPDH, UBC y YWHAZ son más estables y se eligieron para el estudio. Para los datos de los transportadores se

utilizó la media de la función GeoMean de Microsoft Excel. Los tres genes fueron un promedio de uso de la función GeoMean en Microsoft Excel.

Se debe tener en cuenta durante la medición con la cuantificación relativa, que la expresión relativa supone que la eficiencia de la reacción es de 2.0 o 100%: $E = 10^{-1/\text{slope}}$. La ecuación representa la eficiencia de la reacción de RT-PCR, medida por la pendiente de la curva estándar. La eficacia máxima se obtiene cuando es $E = 2$.

La eficacia se deriva de la pendiente de la curva de calibración del gen de interés. Esto se deriva de la pendiente de la curva de calibración, donde la pendiente de -3.3 es igual a la eficiencia del 100%. Por lo tanto, con el fin de comparar satisfactoriamente dos conjuntos diferentes de datos, es fundamental que tengan la misma eficacia entre ellos.

Curva de calibración: Las curvas de calibración se realizaron con diferentes concentraciones de plantillas del DNA. Se hacen para medir la eficiencia de las reacciones de RT-PCR, la correlación eficiente, ordenada Y en el origen, así como para detectar la presencia de inhibidores de la PCR en la reacción. En el experimento, en cada dilución se utilizaron las curvas de calibración de 2, 5, 10, a partir de 100, 50, 10, 1, 0.5 y 0 ng de la plantilla de DNA.

3.5.4.5.4. Búsquedas de BLAST.

Se realizó para garantizar que los primers empleados en los experimentos de RT-PCR fueran específicos. Los nucleótidos de BLAST se hicieron en contra de las secuencias humanas. Las secuencias en sentido y antisentido se insertaron para asegurar que en el software se observara específicamente las secuencias que contienen los primers.

Enlace web:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.

3.5.4.5.5. Técnica de gel de agarosa.

El gel se utilizó para verificar la formación de primer-dimer. Las muestras de qPCR se han realizado en gel de agarosa al 1% en buffer Tris-acetate-EDTA 1X (TAE 1X) con 100V. El gel contiene un 1% de Orange G en glicerol para sobrecargar el tampón. Se incorporó, bromuro de etidio en el gel para poder visualizar las bandas bajo UV. Como marcador se utilizó Hyper Ladder (BIOLINE) para poder visualizar las bandas.



Figura 18: Imagen sobre el análisis realizado a una de las muestras analizadas.

3.6. Análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Para la expresión de los datos se ha utilizado la estadística descriptiva, indicándose los resultados de las variables numéricas como media aritmética, desviación estándar ($X \pm DE$) y error estándar de la media (EEM), y los resultados de las variables categóricas en frecuencias (%).

Hay que remarcar, que ante la dificultad en la extracción de sangre de este colectivo en el CI del presente trabajo, se procedió a estimar mediante el análisis

estadístico a través de técnicas predictivas los valores de ingesta de Zn, plasma y células sanguíneas. Se utilizaron todos los puntos no suplementados a lo largo del total de controles realizados, para estimar los valores del CI.

Como paso previo a la ejecución de un modelo paramétrico o no, se aceptó la hipótesis de distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

En el estudio de los datos o variables numéricas, se utilizó el test de la t de Student para muestras relacionadas, con la finalidad de evaluar la significación estadística del cambio producido en las distintas variables numéricas durante el estudio. Para estudiar los datos o variables categóricas y establecer comparaciones entre los grupos, se ha empleado el test de Mann-Whitney, ya que debido al carácter cualitativo de dichas variables no podemos asumir normalidad.

En análisis de regresión lineal se utilizó para la búsqueda de correlaciones bivariadas, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson o de Spearman para variables no normales.

3.7. Limitaciones del estudio general.

La dificultad en la recogida de la muestra en este tipo de población itinerante impide la recogida de datos de ingesta y realizar la extracción de sangre de una manera adecuada, teniendo en cuenta que éste es un estudio a largo plazo que incluye la intervención en diferentes periodos durante la fase de competición y temporada.

No ha habido disponibilidad completa de los individuos para realizarles la valoración de ingesta, antropométrica y bioquímica. Por ello, en nuestro caso, el control inicial en la experiencia de suplementación con Zn, se ha realizado a partir de un estudio predictivo estadístico que facilite datos aproximados a los valores reales para obtener resultados fiables, siempre comprobado a partir de datos obtenidos en otros periodos experimentales en controles realizados antes de la suplementación, y a los mismos individuos que forman parte del estudio.

Capítulo 4

Intervención con Educación Nutricional

Implementation of a nutrition education program in a handball team: Consequences on nutritional status.

Artículo 1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889623>.

Molina-López J, Molina JM, Chiroso LJ, Florea D, Sáez L, Jiménez J, Planells P, Pérez de la Cruz A, Planells E. *Nutr Hosp.* 2013, 28(4):1065-1076.

4. Abstract.

Objective: To evaluate nutritional status and dietary habits after implementation of a nutritional education program in professional handball players. Research methods and procedures: Longitudinal study of 14 handball players evaluated with 72-h recall, a questionnaire on food consumption and anthropometric measures during 4 months. The intervention consisted of a nutrition education program. Results: Energy intake was consistently below the recommended allowances. Macronutrient intakes as a percentage of total energy intake were below the recommended allowances for carbohydrates, and above recommended allowances for fats. Nutritional education was followed by a significant increase ($p < 0.01$) in total energy and macronutrient intakes, with no significant changes in macronutrient or micronutrient intakes after adjustment for energy intake. Discussion: The imbalance in nutrient intake in handball players suggests that detailed re-analysis is needed to determine specific recommendations for this population. Nutritional education with continuous follow-up to monitor athletes' dietary habits may lead them to adopt appropriate nutritional habits to optimize dietary intakes. The lack of specific recommendations for micronutrient intakes in athletes leads to confusion regarding appropriate intakes; biochemical tests that yield normal values (albeit approaching cut-off values for deficiency) may disguise deficient status for some nutrients when strenuous exercise is involved. Conclusion: In-depth studies with nutrition education programs that include long-term follow-up are advisable to avoid deficiencies that can lead to irreversible damage in competitive athletes.

4.1. Abstract Español.

Objetivos: Evaluar el estado nutricional y los hábitos dietéticos en respuesta a la aplicación de un programa de educación nutricional en jugadores profesionales de balonmano. Sujetos y metodología: Estudio longitudinal realizado a una muestra de 14 jugadores pertenecientes a un equipo de balonmano de alto rendimiento, a los que se les evaluó mediante recordatorio de 72 horas, un cuestionario de frecuencia de consumo, medidas antropométricas a lo largo de 4 meses, y a los que se les aplicó un programa de educación nutricional al inicio del estudio. Los valores de ingesta y de frecuencia de consumo fueron comparados con las recomendaciones de macronutrientes existentes para deportistas y micronutrientes para población sana, respectivamente, y con la pirámide de alimentos para población sana española. Resultados: La ingesta de energía de los deportistas se situó por debajo de las recomendaciones a lo largo de todo el estudio. La ingesta de macronutrientes respecto a la energía ingerida, se situó por debajo de las recomendaciones para la ingesta de carbohidratos y por encima de las recomendaciones para la ingesta de grasa, mostrada en los resultados obtenidos de frecuencia de consumo de alimentos. La educación nutricional produjo un incremento significativo ($p < 0,01$) en la ingesta de energía y macronutrientes tras su aplicación. A pesar de ello, no se produjeron cambios significativos en la ingesta de macronutrientes y micronutrientes al ajustar por energía ingerida. Los niveles bioquímicos se encontraron dentro de los rangos de normalidad durante todo el estudio. Discusión: El desequilibrio en la ingesta de nutrientes presente en los jugadores de balonmano hace necesario realizar un ajuste nutricional completo para poder establecer recomendaciones específicas para este tipo de población. La aplicación de un programa de educación nutricional monitorizada de manera continuada mediante seguimiento en los deportistas, puede tener como consecuencia la instauración de hábitos nutricionales adecuados que lleve a una optimización en la ingesta. La ausencia de recomendaciones específicas de micronutrientes en el deporte, provoca una cierta confusión a la hora de establecer una ingesta adecuada de micronutrientes, ya que en muchos casos demuestran normalidad en los niveles bioquímicos, aunque muy cercanos a la deficiencia, pudiendo comprometer el estatus de algún nutriente en situaciones de ejercicio extremo. Conclusión: Sería aconsejable realizar estudios exhaustivos de valoración del estatus nutricional que planteen la instauración de programas de educación nutricional a largo plazo, con el fin de evitar carencias que deriven en daños irreversibles en el deportista de competición.



Original / Deporte y ejercicio

Implementation of a nutrition education program in a handball team; consequences on nutritional status

Jorge Molina-López¹, José Manuel Molina², Luis Javier Chiroso², Daniela Florea¹, Laura Sáez¹, Jorge Jiménez⁴, Paloma Planells⁵, Antonio Pérez de la Cruz³ and Elena Planells¹

¹Department of Physiology. Institute of Nutrition and Food Technology. University of Granada. Granada. Spain. ²Department of Physical Education and Sports. Faculty of Sports Sciences. University of Granada. Granada. Spain. ³Nutrition and Dietetic Unit. Virgen de las Nieves Hospital. Granada. Spain. ⁴Department of Psychology of Evolution. University of Granada. Spain. ⁵Complutense University. Madrid. Spain.

Abstract

Objective: To evaluate nutritional status and dietary habits after implementation of a nutritional education program in professional handball players.

Research methods and procedures: Longitudinal study of 14 handball players evaluated with 72-h recall, a questionnaire on food consumption and anthropometric measures during 4 months. The intervention consisted of a nutrition education program.

Results: Energy intake was consistently below the recommended allowances. Macronutrient intakes as a percentage of total energy intake were below the recommended allowances for carbohydrates, and above recommended allowances for fats. Nutritional education was followed by a significant increase ($p < 0.01$) in total energy and macronutrient intakes, with no significant changes in macronutrient or micronutrient intakes after adjustment for energy intake.

Discussion: The imbalance in nutrient intake in handball players suggests that detailed re-analysis is needed to determine specific recommendations for this population. Nutritional education with continuous follow-up to monitor athletes' dietary habits may lead them to adopt appropriate nutritional habits to optimize dietary intakes. The lack of specific recommendations for micronutrient intakes in athletes leads to confusion regarding appropriate intakes; biochemical tests that yield normal values (albeit approaching cut-off values for deficiency) may disguise deficient status for some nutrients when strenuous exercise is involved.

Conclusion: In-depth studies with nutrition education programs that include long-term follow-up are advisable

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROGRAMA DE EDUCACIÓN NUTRICIONAL EN UN EQUIPO DE BALONMANO; CONSECUENCIAS EN ESTADO NUTRICIONAL

Resumen

Objetivos: Evaluar el estado nutricional y los hábitos dietéticos en respuesta a la aplicación de un programa de educación nutricional en jugadores profesionales de balonmano.

Sujetos y metodología: Estudio longitudinal realizado a una muestra de 14 jugadores pertenecientes a un equipo de balonmano de alto rendimiento, a los que se les evaluó mediante recordatorio de 72 horas, un cuestionario de frecuencia de consumo, medidas antropométricas a lo largo de 4 meses, y a los que se les aplicó un programa de educación nutricional al inicio del estudio. Los valores de ingesta y de frecuencia de consumo fueron comparados con las recomendaciones de macronutrientes existentes para deportistas y micronutrientes para población sana, respectivamente, y con la pirámide de alimentos para población sana española.

Resultados: La ingesta de energía de los deportistas se situó por debajo de las recomendaciones a lo largo de todo el estudio. La ingesta de macronutrientes respecto a la energía ingerida, se situó por debajo de las recomendaciones para la ingesta de carbohidratos y por encima de las recomendaciones para la ingesta de grasa, mostrada en los resultados obtenidos de frecuencia de consumo de alimentos. La educación nutricional produjo un incremento significativo ($p < 0,01$) en la ingesta de energía y macronutrientes tras su aplicación. A pesar de ello, no se produjeron cambios significativos en la ingesta de macronutrientes y micronutrientes al ajustar por energía ingerida. Los niveles bioquímicos se encontraron dentro de los rangos de normalidad durante todo el estudio.

Discusión: El desequilibrio en la ingesta de nutrientes presente en los jugadores de balonmano hace necesario realizar un ajuste nutricional completo para poder establecer recomendaciones específicas para este tipo de población. La aplicación de un programa de educación nutricional monitorizada de manera continuada mediante seguimiento en los deportistas, puede tener como consecuencia la instauración de hábitos nutricionales adecuados que lleve a una optimización en la ingesta. La ausencia de recomendaciones específicas de micronutrientes en el deporte, provoca

Correspondence: Elena María Planells del Pozo.
Departamento de Fisiología.
Facultad de Farmacia.
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.
Centro de Investigaciones Biomédicas.
Universidad de Granada.
Parque Tecnológico de la Salud.
Avda. del Conocimiento, s/n.
18071 Granada. Spain.
E-mail: elenamp@ugr.es

Recibido: 28-III-2013.
Aceptado: 28-V-2013.

to avoid deficiencies that can lead to irreversible damage in competitive athletes.

(*Nutr Hosp.* 2013;28:1065-1076)
DOI:10.3305/nh.2013.28.4.6600

Key words: *Handball. Nutritional education. Nutritional assessment. Team sports. Supplementation.*

Introduction

Changes are currently taking place in sports nutrition in favor of strategies intended to favor the adaptations that occur in response to training.¹ Acquiring knowledge about athletes' energy and nutrient needs is a priority to facilitate maximum performance.²⁻⁶ Training and nutrition are closely interrelated, since optimum adaptation to meet the demands of repeated training sessions generally requires an appropriate diet in terms of the amounts and types of nutrients.^{7,8}

Although there is no specific set of dietary recommendations or consensus regarding nutritional requirements during exercise,⁹ it is generally agreed that athletes need to consume a diet consistent with recommendations for the general population for overall good health.^{10,11} Current studies have emphasized that nutrition in athletes is often inadequate.^{4,12} One of the most important strategies to help athletes consume an adequate diet is nutrition education.¹¹ The aims of this strategy for athletes are identify and take appropriate measures to meet nutritional needs, correct possible deficiencies in food intake and promote optimum health and performance.^{11,13}

The nutritional requirements for different sports are determined by the game's rules, duration and frequency of competition, duration of the sports season, training phase, number of players and substitutions that are allowed during competition.¹⁴ Like other team sports, handball is characterized by an intermittent pattern of activity, with periods that requires mainly aerobic metabolism as an energy source alternating with bursts of highly intense activity that require mainly anaerobic metabolism.^{14,15} In this highly complex sport, successful performance depends on a series of basic skills such as strength, power, speed and endurance.¹⁶ During periods of intensive training, the recommended intakes for energy and macronutrients must be met, especially for carbohydrates (CHO) and proteins, in order to maintain appropriate body mass, optimal recovery of muscle glycogen stores, and tissue construction and regeneration. Fat intake should be sufficient to cover the

una cierta confusión a la hora de establecer una ingesta adecuada de micronutrientes, ya que en muchos casos demuestran normalidad en los niveles bioquímicos, aunque muy cercanos a la deficiencia, pudiendo comprometer el estatus de algún nutriente en situaciones de ejercicio extremo.

Conclusión: Sería aconsejable realizar estudios exhaustivos de valoración del estatus nutricional que planteen la instauración de programas de educación nutricional a largo plazo, con el fin de evitar carencias que deriven en daños irreversibles en el deportista de competición.

(*Nutr Hosp.* 2013;28:1065-1076)
DOI:10.3305/nh.2013.28.4.6600

Palabras clave: *Balonmano. Educación nutricional. Valoración nutricional. Deportes de equipo. Suplementación.*

requirements for essential fatty acids,^{7,17} and micronutrient intakes should not be overlooked since exercise increases micronutrient requirements.¹⁸⁻²¹

In the last 30 years there have been no studies designed to analyze nutritional status in men's handball teams or to investigate whether nutrition education in handball players affects their nutritional status. The present study aimed to evaluate professional handball players' responses to a nutrition education program in terms of their clinical and nutritional status.

Material and methods

The present study involved 14 handball players and was carried out between October 2009 and February 2010 during the first phase of training and competition in the Honor B Division of the Spanish professional handball league.

Subjects

Mean age of the participants was 22.9 ± 2.7 years, and all were members of the Puente Genil Handball Club in Granada, Spain. Training took place an average of 4 to 5 days per week and competition matches were held once per weekend. Participation in the study was voluntary, and after receiving information about the procedures and objectives of the study, each participant provided his informed consent in writing, and was allowed to withdraw from the study at any time. The study was approved by the University of Granada Ethics Committee.

Dietary intake

Dietary intakes in all participants were recorded by 72-h recall,²² and each 3-day recall period included one Saturday or Sunday. Intakes were recorded during the 4-month study period at three times: baseline (control)

in week 0 before the nutrition education program was implemented, week 8 after the nutrition education program, and week 16. Data on food intakes were obtained in the course of individual interviews to request information from each participant about the types of foods and serving sizes. Recall accuracy was facilitated with a set of photographs of prepared foods and dishes that are frequently consumed in Spain.

The Nutriber[®] software program was used to convert food intakes to absolute and percentage values of recommended intakes of each nutrient for individual athletes.²³ Estimated energy expenditure was calculated for each participant with the equation proposed by the Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO)/United Nations University (UNU).²⁴ Resting metabolic rate (RMR) was calculated from body weight and height. Total energy expenditure was calculated by multiplying RMR by the appropriate activity factor. Macronutrient intakes were compared with the recommended daily allowances (RDA) proposed by the American Dietetic Association (ADA) and American College of Sports Medicine (ACSM).^{5,6} Vitamin and mineral intakes were compared with the dietary reference intakes (DRI) for the Spanish population and the European Union population according to Cuervo et al.²⁵ Adequate intake levels were determined by comparing actual intakes of each nutrient with the recommended intake for each participant, and were recorded as < 75% of the RDA, between 75% and 100% of the RDA, and > RDA.

A questionnaire was used to obtain information about consumption frequencies (CF) for a list of more than 200 types of food. For each participant we compared these frequencies with the recommendations proposed by the Spanish Community Nutrition Society (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, SENC),^{26,27} and recorded the results as the percentage of participants whose CF was below or above the recommended number of servings. If the SENC had not issued a recommended number of servings for a given food because it is consumed only occasionally or in small portions, we reported the results as servings consumed per week.

Nutritional educational program

The educational intervention was designed ad hoc for this type of study population by a team of nutrition specialists. The intervention consisted of three phases. First, the nutrition team explained, by personalized way, aspects related with nutrition in general, with emphasis on the different types of nutrients and their importance for maintaining good health in basically healthy persons. This was followed by education focusing more specifically on nutrition and physical activity. In this second phase, the emphasis was on specific nutritional requirements in persons who perform continuous physical activity, and on frequent errors in nutrition in this popu-

lation. In the third phase, researchers responded to the questions each participant individually raised at any time throughout the study period, to provide additional information and clarification.

Biochemical analysis

Blood samples for laboratory analyses were obtained after a 12-h fast after the last training session in each time period, and were collected in the morning after the participants had abstained from eating and drinking overnight.

Venous blood was drawn, centrifuged to separate plasma and red blood cells, and stored at -80° C. Laboratory values were determined for glucose, transferrin, albumin, prealbumin, creatinine, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, triglycerides, total cholesterol concentrations and iron with enzymatic colorimetric tests in a Hitachi Modular P autoanalyzer (Roche Diagnostics, Grenzach, Germany). These data were used to verify adequate nutritional status in all participants and rule out the possibility of nutritional alterations that might have affected the findings.

Data analysis

The data are reported with descriptive statistics. For numerical variables we used the arithmetic mean, standard deviation, confidence interval and standard error of the mean. The results for categorical variables are reported as percentage frequencies. To determine whether the data fitted a parametric model, the Kolmogorov-Smirnov test was used to verify normal distribution. For comparisons we used single-factor analysis of variance. Linear regression analysis was used to identify correlations by calculating Pearson's bivariate correlation coefficient. All statistical analyses were done with SPSS v. 17.0 for Windows.

Results

The general characteristics of the participants (age, height, weight, body mass index, VO₂ max, body fat and estimated energy expenditure and estimated energy intake) are shown in table I. Mean estimated intake was significantly greater ($p < 0.01$) in week 8 and week 16 compared to week 0. No significant differences were seen for any of the other nutritional parameters compared across the three time points.

Food intake

The results for energy, macronutrient and fatty acid intakes as a percentage of the allowances for athletes recommended by the ACSM and ADA^{5,6} are shown in

Table I
Characteristics of the participants

<i>Sample characteristics</i>						
<i>Measurement</i>	<i>Mean</i>		<i>SD</i>			
Age (years)	22.9		2.7			
Height (m)	1.87		0.06			
VO ₂ max (mL·min·kg ⁻¹)	60.44		5.19			
Estimated energy expenditure (kcal·day ⁻¹)	3,534.64		169.63			
	<i>Week 0</i>		<i>Week 8</i>		<i>Week 16</i>	
	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Weight (kg)	86.72	5.36	86.47	5.59	86.38	4.81
Body mass index (kg/m ²)	24.72	1.12	24.61	1.30	24.62	1.14
Body fat (%)	11.58	2.53	11.60	2.45	11.57	2.34
Estimated energy intake (kcal·day ⁻¹)	2,974.50	211.12	3,355.10 ^a	325.30	3,328.64 ^a	306.13

All data are expressed as the mean and standard deviation (SD).

^aStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 ($p < 0.01$) according to Student's t-test.

Table II
Macronutrient intake in handball players

		<i>Measurement points</i>					
		<i>Week 0</i>		<i>Week 8</i>		<i>Week 16</i>	
	<i>Recommendation*</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
<i>Energy</i>							
Per day (kcal·day ⁻¹)		2,974.50	211.11	3,355.08 ^a	325.31	3,328.64 ^a	306.13
Per unit body mass (kcal·kg ⁻¹)	44	34.45	3.56	38.91 ^a	4.15	38.54 ^a	2.94
<i>Protein</i>							
Per day (g·day ⁻¹)	104-147	133.43	14.32	146.64	35.64	147.04 ^b	25.51
Per unit body mass (kcal·kg ⁻¹)	1.2-1.7	1.54	0.22	1.70	0.44	1.70 ^b	0.33
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹)	–	44.93	4.58	43.68	9.32	39.67	5.42
<i>Carbohydrate</i>							
Per day (g·day ⁻¹)	519-865	360.91	27.64	421.50 ^b	49.24	416.80 ^b	38.82
Per unit body mass (kcal·kg ⁻¹)	6-10	4.17	0.41	4.88 ^b	0.60	4.82 ^b	0.36
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹)	–	121.67	10.26	125.54	6.35	125.51	9.07
<i>Fat</i>							
Per day (g·day ⁻¹)	78-95	118.57	22.52	132.22 ^a	17.75	129.57	21.79
Per unit body mass (kcal·kg ⁻¹)	0.9-1.1	1.37	0.28	1.53 ^a	0.19	1.49	0.21
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹)	–	39.67	5.42	39.45	4.23	38.80	4.45

All data are expressed as the mean and standard deviation (SD).

Macronutrient intakes are expressed as g·day⁻¹, kcal·kg⁻¹ and mg·kcal·day⁻¹.

*Recommended intakes for athletes according to the ADA⁶.

^aStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 ($p < 0.01$).

^bStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 ($p < 0.05$).

table II. Energy intake was below the recommended amount at all three time points. Compared to week 0 (baseline), energy intake was significantly higher ($p < 0.01$) at week 8 and week 16 after the nutrition education program was implemented.

Protein intake met the recommended amount at week 0 and week 8 but not at week 16, when intake was slightly above the recommended amount of 147 g·day⁻¹. At week 16, protein intake was significantly higher

than at week 0 ($p < 0.05$). Carbohydrate intake was significantly higher after the nutrition education program at week 8 and week 16 than at week 0 ($p < 0.01$). Despite the significant change in this macronutrient with time, the reference value was not met at any of the three time points. In contrast, fat intake was above the recommended amount at all three time points, and the difference between week 0 and week 8 was significant ($p < 0.01$). When the data were adjusted

Table III
Fatty acid intakes in handball players

	Recommendation*	Measurement points					
		Week 0		Week 8		Week 16	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Saturated fatty acids</i>							
Per day (g·day ⁻¹)	–	39.42	8.94	40.09	7.20	40.54	12.02
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹)	–	13.21	2.54	11.95	1.90	12.02	2.63
Per energy (%)	10 %	11.89	2.89	10.76	1.72	10.82	2.37
Per percentage of RDA (%)	100 %	151.92	34.33	155.07	30.47	155.16	41.04
<i>Monounsaturated fatty acids</i>							
Per day (g·day ⁻¹)	–	40.13	5.53	48.82 ^a	13.07	50.43 ^b	11.81
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹)	–	13.49	2.34	14.60	3.86	15.09	2.97
Per energy (%)	10 %	12.14	2.11	13.14	3.47	13.59	2.68
Per percentage of RDA (%)	100 %	155.75	33.83	188.42 ^a	50.46	194.25 ^b	43.49
<i>Polyunsaturated fatty acids</i>							
Per day (g·day ⁻¹)	–	12.52	3.34	14.20	4.63	15.45	5.55
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹)	–	4.18	0.90	4.27	1.48	4.64	1.64
Per energy (%)	10 %	3.76	0.81	3.84	1.33	4.18	1.48
Per percentage of RDA (%)	100 %	48.78	14.71	55.17	19.04	59.86	22.05

All data are expressed as the mean and standard deviation (SD).

Fatty acid intakes are expressed as g·day⁻¹, mg·kcal·day⁻¹, percentage energy or percentage of the RDA covered.

*Recommended intakes for athletes according to the ADA⁵.

^aStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 ($p < 0.01$).

^bStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 ($p < 0.05$).

for each macronutrient separately as a percentage of energy intake, there were no significant differences for comparisons between any pair of time points.

The results for fatty acid intake showed significant differences ($p < 0.01$ and $p < 0.05$) for monounsaturated fatty acids (MUFA) between week 0 and week 8 ($p < 0.01$), and between week 0 and week 16 ($p < 0.05$). There were no significant differences between time points when MUFA intake was recorded as an absolute value or calculated as a percentage of total energy intake. When fatty acid intakes as a percentage of total energy intake were compared, we found that saturated fatty acids (SFA) and MUFA intakes were above the amounts recommended by the ADA and ACSM,^{5,6} according to which saturated, polyunsaturated (PUFA) and monounsaturated fatty acids should each account for 10% of the total energy intake.

The results for vitamin intake showed no significant changes for any vitamin at any time point, with the exception of vitamin B₁₂ at week 8 and vitamins D and E at week 16 compared to week 0 (both $p < 0.05$). The intake of B group vitamins (thiamin, riboflavin, niacin and vitamin B₆) as a percentage of total energy decreased significantly ($p < 0.05$) at week 8 after the nutrition education program compared to week 0. Mineral intake showed no significant changes for any of the minerals. When intakes were expressed as a percentage of energy intake, significant differences were found at week 16 compared to week 0 ($p < 0.05$) for calcium, potassium and copper. In addition, potassium intake showed a significant decrease at week 8 ($p < 0.05$) compared to week 0.

Consumption frequency

Comparisons of the CF for different foods in our sample of athletes (table VI) showed no significant changes in any of the values except for beer and wine intake, which was significantly higher at week 8 compared to week 0 ($p < 0.05$) (table VI). When we compared the results with the recommendations of the SENC for the healthy population,^{26,27} a large percentage of participants consumed fewer than the recommended number of servings of potatoes, rice, bread, wholemeal bread and pasta, vegetables, fruits, olive oil, milk and dairy products. In addition, a large percentage of participants did not meet the recommended number of servings per day at any of the three time points (table VI). None of the participants consumed more than the recommended number of servings of any type of food except for milk and dairy products: at each time point, 14.3% of the participants consumed more than the recommended allowance.

The numbers for fish, lean meat, poultry and egg consumption (servings/week) showed that most participants consumed more than the recommended number of servings of each of these types of food. The frequency of consumption was as high as 100% above the recommended allowance for lean meats, poultry and eggs. For fish, although approximately half of the participants (42.9% at weeks 0 and 16, 50% at week 8) exceeded the recommended number of servings, other participants (between 14.3% and 35.7% depending on the time point) consumed less than the recommended amount.

Table IV
Vitamin intakes in handball players

	Spain RDAs*	European RDAs*	Measurement points					
			Week 0		Week 8		Week 16	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Thiamin</i>								
Per day (mg·day ⁻¹)	1.2	1.1	2.49	0.49	2.32	0.57	2.38	0.75
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			0.84	0.17	0.69 ^a	0.15	0.73	0.27
<i>Riboflavin</i>	1.8	1.6						
Per day (mg·day ⁻¹)			2.67	0.62	2.57	0.60	2.43	0.93
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			0.90	0.21	0.76 ^a	0.15	0.75	0.33
<i>Niacin</i>	20	18						
Per day (mg·day ⁻¹)			39.10	8.04	34.99	8.17	40.34	9.58
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			13.15	2.63	10.55 ^a	2.88	12.16	2.94
<i>Vitamin B6</i>	2.1	2.5						
Per day (mg·day ⁻¹)			2.88	0.68	2.69	0.53	3.02	0.53
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			0.97	0.23	0.81 ^a	0.18	0.91	0.19
<i>Folic acid (mg)</i>	400	200						
Per day (mg·day ⁻¹)			301.97	89.06	316.11	54.49	290.35	98.57
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			101.53	29.59	94.61	15.99	88.11	30.61
<i>Vitamin B12</i>	2	1.4						
Per day (µg·day ⁻¹)			7.44	1.75	10.98 ^a	4.30	7.92	1.74
Per energy (µg·kcal·day ⁻¹) [†]			2.49	0.58	3.27	1.27	2.39	0.56
<i>Vitamin C</i>	60	45						
Per day (mg·day ⁻¹)			118.53	52.52	128.10	52.62	109.93	67.57
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			39.95	17.68	39.29	17.83	33.68	21.32
<i>Vitamin A</i>	1,000	700						
Per day (µg·day ⁻¹)			898.16	305.88	893.79	397.46	991.28	499.82
Per energy (µg·kcal·day ⁻¹) [†]			300.95	96.82	268.01	124.86	294.79	131.66
<i>Vitamin D</i>	5	10						
Per day (µg·day ⁻¹)			5.31	2.63	6.47	3.75	8.75 ^a	3.69
Per energy (µg·kcal·day ⁻¹) [†]			1.78	0.88	1.97	1.26	2.65	1.07
<i>Vitamin E</i>	12	–						
Per day (mg·day ⁻¹)			10.56	4.37	12.49	2.96	14.70 ^a	5.12
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			3.50	1.30	3.77	1.05	4.43	1.53

All data are expressed as the mean and standard deviation (SD).

Vitamin intakes are expressed as mg·day⁻¹ or µg·day⁻¹.

*Recommendations for the healthy population according to Cuervo et al.²⁵

[†]All data are expressed as a factor of 103.

^aStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 (p < 0.05).

For legumes (servings/week), between 35.7% and 57.1% of the participants consumed fewer than the recommended number of servings, and for nuts, CF was below the recommended amount in 92.9% of the participants at all three time points.

The CF of foods from the sausages and meat fats, sweets, snacks, soft drinks, butter, margarine and pastries, and beer and wine groups, which should be consumed only occasionally and in moderation according to current recommendations, is reported as servings/day because these foods were consumed relatively frequently by the participants in this study. Mean CF for sausages and meat fats ranged from 0.85 to 1.03 servings/day depending on the time point. For the

group that included sweets, snacks and soft drinks, CF ranged from 2.90 to 3.03 servings/day depending on the time point.

Biochemical analysis

Table VII summarizes the biochemical profiles of athletes at each of the three time points. The results indicate that the values for all parameters were normal. The values for lipid profile parameters showed significant differences (p < 0.05) in high- and low-density lipoprotein (mg/dL) at week 16 compared to week 0 and week 8.

Table V
Mineral intakes in handball players

	Spain RDAs*	European RDAs*	Measurement points					
			Week 0		Week 8		Week 16	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Calcium	800	700						
Per day (mg·day ⁻¹)			1,251.36	338.19	1,383.33	365.24	1,235.28	392.57
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			421.37	112.75	413.91	114.60	367.19 ^a	94.23
Phosphorus	700	550						
Per day (mg·day ⁻¹)			1,682.58	318.01	1,809.93	437.88	1,814.46	228.40
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			566.01	104.17	538.75	116.18	546.23	64.31
Potassium	3,500	3,100						
Per day (g·day ⁻¹)			4,191.29	923.16	4,096.86	653.42	3,983.64	854.64
Per energy (g·kcal·day ⁻¹) [†]			1,415.15	328.13	1,222.20 ^a	170.17	1,203.42 ^a	269.13
Magnesium	350	–						
Per day (mg·day ⁻¹)			374.30	122.62	388.74	79.62	385.89	92.11
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			126.12	41.79	115.47	18.40	116.28	27.40
Iron	10	9						
Per day (mg·day ⁻¹)			24.15	8.50	24.87	4.96	24.42	6.10
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			8.19	3.09	7.45	1.52	7.39	1.88
Zinc	15	9.5						
Per day (mg·day ⁻¹)			18.06	9.91	26.13	12.50	23.70	10.16
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			5.98	3.29	7.59	4.17	7.06	2.97
Copper	–	1.1						
Per day (mg·day ⁻¹)			1.56	0.89	1.45	0.83	1.17	0.32
Per energy (mg·kcal·day ⁻¹) [†]			0.52	0.27	0.43	0.24	0.36 ^a	0.10
Iodine	140	130						
Per day (µg·day ⁻¹)			105.37	68.22	96.24	44.81	110.51	50.25
Per energy (µg·kcal·day ⁻¹) [†]			35.60	24.16	28.85	13.69	33.29	15.76
Selenium	70	55						
Per day (µg·day ⁻¹)			95.68	20.73	105.71	30.52	106.14	23.53
Per energy (µg·kcal·day ⁻¹) [†]			32.23	7.10	31.40	8.08	32.03	8.92

All data are expressed as the mean and standard deviation (SD).

Mineral intakes are expressed as mg·day⁻¹ or µg·day⁻¹.

*Recommendations for the healthy population according to Cuervo et al.²⁵

[†]All data are expressed as a factor of 103.

^aStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 (p < 0.05).

Discussion

The main finding from our analysis of food and nutrient intakes in professional handball players is a tendency toward imbalances in nutritional status, as previously found in other team sports.^{28,29} To date there have been no studies that were designed to evaluate overall nutritional status in male handball players.

Although the anthropometric parameters we studied showed some similarities with the measures reported by Chaouachi et al.³⁰ such as height and body weight, the values for percentage fat were slightly higher in their study compared to our participants. Sibila et al.³¹ found percentage values almost identical to those in our study, and noted that in general, a greater mean height and lower percentage of fat was often associated

with better team performance. In sports such as volleyball, handball and basketball, team members are usually characterized by their tall stature and high proportion of muscle mass,¹⁴ and the predominant body type is mesomorphic tending toward ectomorphic.³¹ In our participants, VO₂ max (mL·min·kg⁻¹) was slightly higher than in the sample of Croatian national handball team players studied by Sporis et al.,¹⁶ and was similar to the 58 mL·min·kg⁻¹ value reported by Rannou et al.³² as indicative of good aerobic capacity in the handball players they studied.

Macronutrient intakes, whether considered in quantitative or qualitative terms, play a fundamental role in performance during training and competition.^{8,17} When we compared macronutrient intakes as a percentage of total energy intake, we found that our results were

Table VI
Frequencies of consumption of different types of foods in handball players

Food groups	Recommendations	Measurement points											
		Week 0			Week 8			Week 16					
		Mean (CI)	< R	> R	Mean (CI)	< R	> R	Mean (CI)	< R	> R			
Potatoes, rice, bread, wholemeal bread and pasta	4-6 servings/day	3.55 (2.77-4.38)	64.3%	-	3.50 (2.86-4.15)	57.1%	-	3.40 (2.90-3.91)	71.4%	-	-	-	
Vegetables	≥ 2 servings/day	2.21 (1.65-2.77)	42.9%	-	2.30 (1.89-2.72)	28.6%	-	2.06 (1.56-2.55)	57.1%	-	-	-	
Fruits	≥ 3 servings/day	1.70 (0.68-2.72)	85.7%	-	1.29 (0.61-1.98)	85.7%	-	1.14 (0.66-1.63)	92.9%	-	-	-	
Olive oil	3-6 servings/day	1.62 (1.17-2.07)	100%	-	1.50 (1.13-1.88)	100%	-	1.43 (1.05-1.80)	100%	-	-	-	
Milk and dairy	2-4 servings/day	2.72 (1.84-3.60)	42.9%	14.3%	2.71 (2.02-3.40)	42.9%	14.3%	2.71 (2.16-3.27)	14.3%	14.3%	14.3%	14.3%	
Fish	3-4 servings/week	4.46 (2.97-5.95)	14.3%	42.9%	3.88 (2.93-4.84)	21.4%	50.0%	3.71 (2.70-4.73)	35.7%	50.0%	42.9%	42.9%	
Lean meats, poultry and eggs	3-4 servings/week	7.45 (6.30-8.60)	-	100%	7.20 (5.93-8.46)	-	100%	6.80 (5.76-7.83)	-	100%	100%	100%	
Legumes	2-4 servings/week	2.12 (1.42-2.81)	57.1%	7.1%	2.17 (1.59-2.75)	35.7%	-	1.95 (1.37-2.53)	50.0%	-	-	-	
Nuts	3-7 servings/week	0.97 (0.24-1.70)	92.9%	-	1.06 (0.35-1.78)	92.9%	-	1.05 (0.44-1.65)	92.9%	-	-	-	
Sausages and meat fats*	Occasional and moderate	1.03 (0.66-1.41)	-	100%	0.85 (0.61-1.09)	-	100%	0.87 (0.54-1.19)	-	100%	-	-	
Sweets, snacks and soft drinks*	Occasional and moderate	2.90 (2.18-3.62)	-	-	3.03 (2.35-3.72)	-	-	2.98 (2.15-3.80)	-	-	-	-	
Butter, margarine and pastries*	Occasional and moderate	0.85 (0.50-1.21)	-	-	0.85 (0.52-1.18)	-	-	0.87 (0.48-1.25)	-	-	-	-	
Beer or wine*	Optional consumption and moderate in adults	0.17 (0.10-0.23)	-	-	0.20 (0.13-0.28) [†]	-	-	0.16 (0.08-0.23)	-	-	-	-	

All data are expressed as the mean followed by the confidence interval in parentheses.

Consumption of different foods is reported as the number of servings for each food group. Recommendations for athletes according to SENC^{38,37}.

*If occasional servings are recommended or if there is no specific recommendation for a food group, intake is reported as servings/day.

[†]Statistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and Week 16 (p < 0.05).

R = Percentage of participants in whom intake covered (> R) or failed to cover (< R) the recommended amounts.

Table VII
Biochemical profile

<i>Nutritional status parameters</i>	<i>Reference value</i>	<i>Measurement points</i>					
		<i>Week 0</i>		<i>Week 8</i>		<i>Week 16</i>	
		<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Glucose (mg/dL)	70-110	85.15	5.67	84.15	7.23	87.85	6.22
Creatinine (mg/dL)	0.7-1.2	0.92	0.11	0.93	0.12	0.92	0.11
Iron (µg/dL)	59-158	84.21	30.73	81.57	17.77	98.28	54.62
Transferrin (mg/dL)	200-360	261.21	27.81	261.71	33.00	265.50	28.67
Prealbumin (mg/dL)	20-40	26.76	3.53	27.18	3.12	26.76	2.77
Albumin (mg/dL)	3.5-5.2	4.68	0.15	4.68	0.21	4.76	0.19
HDL (mg/dL)	40-60	58.28 ^a	13.58	57.28 ^a	12.28	61.00	13.30
LDL (mg/dL)	70-150	74.00 ^a	22.89	71.36 ^a	20.84	83.07	22.59
Triglycerides (mg/dL)	50-200	64.50	26.59	69.86	27.00	57.00	14.83
Total cholesterol (mg/dL)	110-200	147.86	26.74	149.71	27.68	154.57 ^a	26.80

All data are expressed as the mean and standard deviation (SD).

^aStatistically significant differences between Week 0 vs Week 8, and vs Week 16 ($p < 0.05$) according to Student's t-test.

similar to those of Holway & Spriet,¹⁴ who analyzed team sports similar to handball and found that percentage CHO intake was below the allowances recommended by the ADA and ACSM,^{5,6} whereas fat and protein intakes were higher than the optimum values. This finding is consistent with our results: we found that CHO intake approached 50% of total energy intake, compared to 18% for protein and 35% for fat (fig. 1). Obtaining accurate information regarding athletes' energy and nutritional needs is a priority and can facilitate strategies to achieve maximal performance; moreover, a healthy and well-balanced diet forms the basis of maximum performance capacity in all athletes.¹¹

Baseline values for energy intake in our participants was $2,974.50 \pm 211.11$ kcal·day⁻¹, a value similar to that reported recently by Aguiar et al.³³ in elite athletes in different team sports including handball. After the nutrition education program was implemented in the present study, energy intake increased significantly to a maximum of $3,355.08 \pm 325.31$ kcal·day⁻¹. This value is consistent with the results of the meta-analysis of team sports in several countries by Holway & Spriet,¹⁴ who found a similar result for energy intake measured with the same method as we used here. However, despite the increase in energy intake after the nutrition education intervention, energy intake remained below the mean energy expenditure. Aerenhouts et al.¹⁰ evaluated

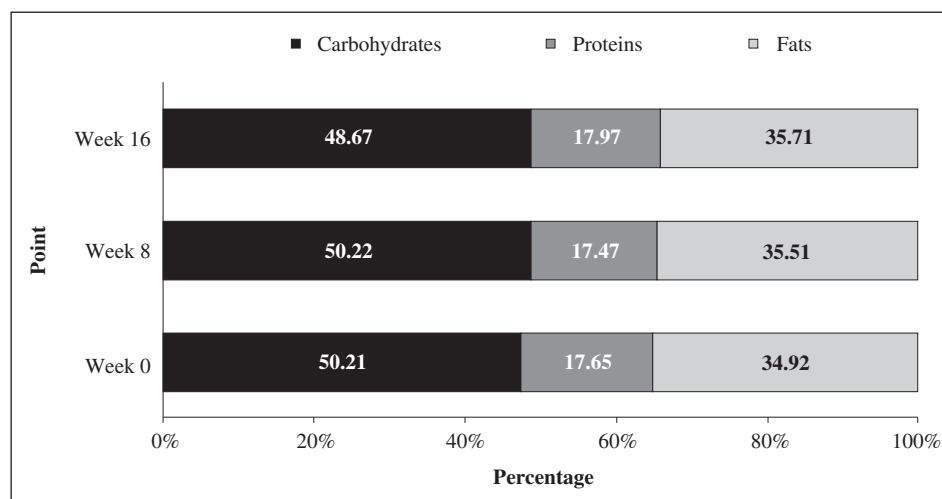


Fig. 1.—Percentage macro-nutrient intake referred to total energy intake at each time point.

energy intake in sprint runners, and found, like others, that energy intake was below energy expenditure. Although energy balance is not a priority for training and performance, athletes should aim to maintain energy balance within healthy limits.³⁴ We note, however, that although energy intake was below the recommended values and increased after the nutrition education program, plasma concentrations of nutritional status indicators (i.e. albumin and prealbumin) remained within normal limits throughout the study period.

The main characteristic of team sports such as handball is the intermittent activity pattern in which high-intensity and lower-intensity activities alternate. This pattern thus combines the use of aerobic and anaerobic systems, and CHO intake is the main source of fuel in both energy systems.^{2,14} In our participants, CHO intake was clearly below the recommended allowance for athletes of 6-10 g·kg·day⁻¹ suggested by the ADA and ACSM.^{5,6} Low CHO stores may result in increased levels of stress in athletes, which can in turn affect the functional capacity of their immune system¹. In the present study we found a low CF for CHO-rich foods: in a large percentage of participants, intake was less than the amount recommended by the SENC^{26,27} for the healthy population. This finding confirms an earlier report by Úbeda et al.,²⁹ who found that the CF of CHO-rich foods by Spanish combat sports athletes was very low. Similarly, Farajian et al.³⁵ noted that the CF of foods such as potatoes, rice, bread, wholemeal bread and pasta, vegetables and fruits, which are the main sources of CHO, was low in a large percentage of participants in their study.

Protein intake in the handball players we studied was within the range of recommended values (1.2 to 1.7 g·kg·day⁻¹) proposed by the ADA and ACSM.^{5,6} In contrast, fat intake was higher than the recommended range (20% to 35% of total energy intake) proposed by these organizations,^{5,6} and was similar to the values for fat intake found by Holway & Spriet.¹⁴ According to the CF in our participants, a high percentage consumed more servings of fatty foods than the SENC recommends.^{26,27} Excess fat consumption has been reported to diminish glycogen stores in the muscle and liver, and may compromise training intensity because of premature fatigue.¹⁷ However, research in rats found that the prolonged consumption of a high-fat, low-CHO diet increased muscle capacity for fat oxygenation by stimulating mitochondrial biogenesis, and could increase endurance.¹ Fatty acid intakes in the present study exceeded current ADA and ACSM recommendations (not more than 10% of total intake)^{5,6} for SFA and MUFA, but PUFA intake was clearly below the recommended value. This result is consistent with the findings of Ruiz et al.³⁶ in a sample of participants similar in age to those in the present study. However, plasma concentrations of all components of the lipid and protein profiles in our participants remained normal throughout the study period.

Some authors have suggested that nutritional intervention programs for athletes are the best option for optimizing intakes since they can improve the quality of the diet by favoring appropriate food choices.^{11,29} In the present study the increased macronutrient intakes after the nutrition education program led to increases in energy intake; however, when the intake of individual nutrients was determined as a percentage of total energy intake, we observed no improvements in the quality of the diet consumed by the athletes. This may have been related with the fact that our program consisted of a single session of nutrition education; continuous education throughout the sports season may be needed to achieve noticeable changes in athletes' dietary habits.

The role of micronutrients is fundamental during exercise, since they maintain immune system functioning, protect tissues against oxidative damage, support good bone health and help repair muscle tissue.²¹ Physical activity is said to foment excess loss of micronutrients due to catabolism and excretion.^{18,20} Micronutrient intakes in the present study were compared with the DRIs for the Spanish and European Union population (based on data provided by Cuervo et al.).²⁵ Our findings for vitamin intakes showed that all B group vitamins as well as vitamin C exceeded current recommendations. In fact, mean vitamin B₁₂ intake in our participants was 784.39 ± 307.41% of the recommended allowance, a value similar to the 854.7 ± 93.8% figure found by Lun et al. in Canadian athletes.⁴ Like us, other authors^{4,21,28,37} found that B group vitamin intakes (especially vitamin B₁₂) as well as vitamin C intake were in excess of current recommendations. In contrast, vitamin A, D and E intakes at all three time points were below the DRIs for the Spanish and European Union populations, a finding also reported by Iglesias-Gutiérrez et al.²⁸ in their study of adolescent Spanish soccer players. Low vitamin intakes can alter performance, while adequate intakes play a protective role. The aim of dietary nutritional supplementation is to achieve an appropriate nutritional status and restore biochemical and physiological functions as determined with specifically chosen biomarkers.³⁸

In our sample of athletes, all mineral intakes were close to the DRIs for the healthy Spanish and European Union population (as reported by Cuervo et al.).²⁵ This result is consistent with earlier findings by Lun et al.⁴ in Canadian athletes. Although mineral intakes in our participants were above the DRIs provided by Cuervo et al. for the healthy population,²⁵ it should be recalled that in overall terms, the total energy expenditure estimated for these athletes was not covered.^{39,40} A further consideration is that specific recommendations for micronutrient intakes in athletes are lacking, so reliance on recommendations developed for the general population may underestimate the needs of high-performance athletes. Moreover, the generally inadequate quality of the diet in the handball players we studied may mean that even after the nutrition

education intervention, the significant increase in energy intake may have been offset by a decrease in some micronutrient densities.

Conclusions

The main findings of the present study show a tendency toward imbalances in nutrient intakes in a sample of professional Spanish handball players. Nutritional status should be monitored to establish specific recommendations for the population of athletes. According to our results, the program of nutrition education we used to improve the diet consumed by athletes during three times into the professional competition season, was insufficient to achieve an appropriate balance between the participants' nutritional requirements and the quality and quantities of different foods and nutrients they consumed, despite disciplinary habits of this population. An intervention program prior and during competition based on nutrition education for athletes may result in appropriate eating habits that can lead to a balanced diet able to meet their nutritional requirements over the long term.

The intermittent nature of handball play makes it difficult to establish recommendations that will meet the athletes' actual requirements, because this sport involves aerobic metabolism as the main energy source, alternating with periods of highly intense activity that require mainly anaerobic metabolism. To add to this challenge, optimum performance in handball requires a combination of physical attributes such as strength, power, speed and endurance.

An additional factor that needs to be considered is the lack of specific recommendations for micronutrient intakes in athletes. These allowances, once determined, are likely to be higher than those recommended for the non-athlete population. For most of the micronutrients we analyzed, intakes were clearly inadequate to meet the recommended allowances even for the general population.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Education (grant number AP2009-3701) and by FIS Project PI07/1228, of Carlos III Health Institute. The authors thank K. Shashok for translating the manuscript into English and for advice on technical editing.

References

1. Maughan RJ, Shirreffs SM. Nutrition for sports performance: issues and opportunities. *Proc Nutr Soc* 2011; 17: 1-8.
2. Burke LM. Fueling strategies to optimize performance: training high or training low? *Scand J Med Sci Sports* 2010; 20 (Suppl. 2): 48-58.
3. Gilbert N. Conference on Multidisciplinary approaches to nutritional problems. Symposium on Performance, exercise and health. Practical aspects of nutrition in performance. *Proc Nutr Soc* 2009; 68 (1): 23-8.
4. Lun V, Erdman KA, Reimer RA. Evaluation of nutritional intake in Canadian high-performance athletes. *Clin J Sport Med* 2009; 19 (5): 405-11.
5. Rodríguez NR, Di Marco NM, Langley S. American College of Sports Medicine position stand. Nutrition and athletic performance. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 41 (3): 709-31.
6. Rodríguez NR, DiMarco NM, Langley S. Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *J Am Diet Assoc* 2009; 109 (3): 509-27.
7. Hawley JA, Tipton KD, Millard-Stafford ML. Promoting training adaptations through nutritional interventions. *J Sports Sci* 2006; 24 (7): 709-21.
8. Magkos F, Yannakoulia M. Methodology of dietary assessment in athletes: concepts and pitfalls. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6 (5): 539-49.
9. Pendergast DR, Meksawan K, Limprasertkul A, Fisher NM. Influence of exercise on nutritional requirements. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111 (3): 379-90.
10. Aerenhouts D, Deriemaeker P, Hebbelinck M, Clarys P. Energy and macronutrient intake in adolescent sprint athletes: A follow-up study. *J Sports Sci* 2011; 29: 73-82.
11. Spendlove JK, Heaney SE, Gifford JA, Prvan T, Denyer GS, O'Connor HT. Evaluation of general nutrition knowledge in elite Australian athletes. *Br J Nutr* 2011; 1-10.
12. Heaney S, O'Connor H, Michael S, Gifford J, Naughton G. Nutrition knowledge in athletes: a systematic review. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2011; 21 (3): 248-61.
13. Glanz K, Hersey J, Cates S, Muth M, Creel D, Nicholls J, et al. Effect of a Nutrient Rich Foods Consumer Education Program: Results from the Nutrition Advice Study. *J Am Diet Assoc* [serial on the Internet]. 2011 Nov 3; [cited 2012 Jan 22]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22055080>
14. Holway FE, Spriet LL. Sport-specific nutrition: Practical strategies for team sports. *J Sports Sci* [serial on the Internet]. 2011 Ago 11; [cited 2012 Jan 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831001>
15. Póvoas SCA, Seabra AFT, Ascensão AAMR, Magalhães J, Soares JMC, Rebelo ANC. Physical and physiological demands of elite team handball. *J Strength Cond Res/Natl Str Cond Assoc J* [serial on the Internet]. 2012 Jan 3; [cited 2012 Feb 1]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22222325>
16. Sporis G, Vuleta D, Vuleta D Jr, Milanovi D. Fitness profiling in handball: physical and physiological characteristics of elite players. *Coll Antropol* 2010; 34 (3): 1009-14.
17. Zalzman I, Guarita HV, Juzwiak CR, Crispim CA, Antunes HKM, Edwards B et al. Nutritional status of adventure racers. *Nutrition* 2007; 23 (5): 404-11.
18. Lukaski HC. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. *Nutrition* 2004; 20 (7-8): 632-44.
19. Volpe SL. Micronutrient requirements for athletes. *Clin Sports Med* 2007; 26 (1): 119-30.
20. Whiting SJ, Barabash WA. Dietary Reference Intakes for the micronutrients: considerations for physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006; 31 (1): 80-5.
21. Woolf K, Manore MM. B-vitamins and exercise: does exercise alter requirements? *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2006; 16 (5): 453-84.
22. Mataix J, Aranda P, López-Jurado M, Sánchez C, Planells E, Llopis J. Factors influencing the intake and plasma levels of calcium, phosphorus and magnesium in southern Spain. *Eur J Nutr* 2006; 45 (6): 349-54.
23. Mataix J, Garcia Diz L. Nutriber® software. FUNIBER-Fundación Universitaria Iberoamericana. Barcelona, Spain, 2006. Available form: <http://www.funiber.org>
24. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. [serial to the Internet]; [cited 2012 Feb 16]. Available from: <http://search.proquest.com/>

- medline/docview/76589431/134ECE32F204171066B/1?accounid=14542
25. Cuervo M, Corbalan M, Baladía E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C et al. [Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization]. *Nutr Hosp* 2009; 24 (4): 384-414.
 26. Aranceta J, Serra-Majem L. Dietary guidelines for the Spanish population. *Public Health Nutr* 2001; 4 (6A): 1403-8.
 27. Daprich V, Salvador Castell G, Ribas Barba L, Pérez Rodrigo C, Aranceta Bartrina L, Serra Majem L. Guía de la alimentación saludable. Editado por Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Madrid; 2004.
 28. Iglesias-Gutiérrez E, García-Roves PM, Rodríguez C, Braga S, García-Zapico P, Patterson AM. Food habits and nutritional status assessment of adolescent soccer players. A necessary and accurate approach. *Can J Appl Physiol* 2005; 30 (1): 18-32.
 29. Úbeda N, Palacios Gil-Antuñano N, Montalvo Zenarruabeitia Z, Garcia Juan B, Garcia A, Iglesias-Gutierrez E. Food habits and body composition of Spanish elite athletes in combat sports. *Nutr Hosp* 2010; 25 (3): 414-21.
 30. Chaouachi A, Brughelli M, Levin G, Boudhina NBB, Cronin J, Chamari K. Anthropometric, physiological and performance characteristics of elite team-handball players. *J Sports Sci* 2009; 27 (2): 151-7.
 31. Sibila M, Pori P. Position-related differences in selected morphological body characteristics of top-level handball players. *Coll Antropol* 2009; 33 (4): 1079-86.
 32. Rannou F, Prioux J, Zouhal H, Gratas-Delamarche A, Delamarche P. Physiological profile of handball players. *J Sports Med Phys Fitness* 2001; 41 (3): 349-53.
 33. Aguiar D, Matias C, Monteiro CP, Silva AM, Rocha PM, Minderico CS et al. Magnesium intake is associated with strength performance in elite basketball, handball and volleyball players. Magnesium Research: Official Organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium [Internet]. 2011 Oct 10; [cited 2011 Dec 12]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983266>
 34. Koehler K, Braun H, De Marees M, Fusch G, Fusch C, Mester J et al. Parallel assessment of nutrition and activity in athletes: validation against doubly labelled water, 24-h urea excretion, and indirect calorimetry. *J Sports Sci* 2010; 28 (13): 1435-49.
 35. Farajian P, Kavouras SA, Yannakoulia M, Sidossis LS. Dietary intake and nutritional practices of elite Greek aquatic athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2004; 14 (5): 574-85.
 36. Ruiz F, Irazusta A, Gil S, Irazusta J, Casis L, Gil J. Nutritional intake in soccer players of different ages. *J Sports Sci* 2005; 23 (3): 235-42.
 37. Juzwiak CR, Amancio OMS, Vitalle MSS, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. Body composition and nutritional profile of male adolescent tennis players. *J Sports Sci* 2008; 26 (11): 1209-17.
 38. Margaritis I, Rousseau AS. Does physical exercise modify antioxidant requirements? *Nutr Res Rev* 2008; 21 (1): 3-12.
 39. Ramfrez J, Muros JJ, Morente J, Sánchez C, Femia P, Zabala M. Effect of an 8-week aerobic training program during physical education lessons on aerobic fitness in adolescents. *Nutr Hosp* 2012; 27 (3): 747-54. doi:10.3305/nh.2012.27.3.5725.
 40. Jáuregui I, Tomillo S, Santiago MJ, Bolaños P. Body shape model, physical activity and eating behaviour. *Nutr Hosp* 2011; 26 (1): 201-7.

Capítulo 5

Estudio de Suplementación con Magnesio

Association between erythrocyte concentrations of magnesium and zinc in high-performance handball players after dietary magnesium supplementation

Artículo 2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695485>.

Molina-López J, Molina JM, Chiroso LJ, Florea D, Sáez L, Millán E, Planells E. *Magnes Res.* 2012 Jul;25(2):79-88. doi: 10.1684/mrh.2012.0311.

5. Abstract.

Currently, research on athletes focuses on optimizing the nutritional status in order to adjust their minerals requirements. This study was designed to evaluate baseline nutritional status and the effect of a nutritional intervention based on magnesium (Mg) supplementation, on plasma and erythrocyte concentrations of Mg and zinc (Zn), and their relationship with training load. We analyzed training load by recording the training volume, intensity and rating of perceived exertion (RPE) during a four-month period, in 14 high-performance handball players. Intensity was studied in different levels of residual heart rate (RHR). We analyzed nutrient intake and plasma and erythrocyte concentrations of Mg and Zn by FAAS. All biomarkers were measured at baseline, after two months of dietary supplementation with Mg, and after two months without supplementation. RPE was associated with training volume at different intensities of RHR. Mg supplementation significantly increased plasma Mg levels during the supplemented period and preserved for subsequent changes in the non-supplemented period. Erythrocyte concentrations of Mg and Zn show associations between baseline and Mg supplementation. Mg levels were associated with training volume at different intensities after supplementation. In conclusion, our findings in high-performance handball players show that during competition, there is a relationship between erythrocyte Zn and Mg levels, regardless of Mg supplementation or Zn intake. Mg dietary supplementation tended to preserve changes in mineral levels during training and competition.

5.1. Abstract Español.

Actualmente, la investigación en atletas se centra en la optimización del estatus nutricional con el fin de ajustar sus requerimientos minerales. Este estudio fue diseñado para evaluar el estatus nutricional inicial y el efecto de una intervención nutricional basada en la suplementación con magnesio (Mg), sobre las concentraciones de Mg y cinc (Zn) en plasma y eritrocitos, y su relación con la carga de entrenamiento. Se analizó la carga de entrenamiento mediante el registro del volumen de entrenamiento, la intensidad y el valor de esfuerzo percibido (RPE) durante un período de cuatro meses en 14 jugadores de balonmano de alto rendimiento. La intensidad fue estudiada en diferentes niveles de tasa residual (RHR). Se analizó la ingesta de nutrientes y las concentraciones plasmáticas y eritrocitos de Mg y Zn por FAAS. Todos los biomarcadores se midieron al inicio del estudio, después de dos meses de la suplementación dietética con Mg, y después de dos meses sin suplementación. RPE se asoció con el volumen de entrenamiento en diferentes intensidades de RHR. La suplementación con Mg aumentó significativamente Mg plasma niveles durante el período suplementado y preservó de cambios posteriores en el período de no suplementado. Las concentraciones eritrocitarias de Mg y Zn se asociaron entre la al inicio y en el periodo suplementado con Mg. Los niveles de Mg se asociaron con el volumen de entrenamiento en diferentes intensidades después de la suplementación. En conclusión, nuestros hallazgos en jugadores de balonmano de alto rendimiento muestran que durante la competición, existió una relación entre eritrocitos Zn y los niveles de Mg, independientemente de la suplementación con Mg o la ingesta de Zn. La suplementación con Mg tendió a preservar los cambios en los niveles de minerales durante el entrenamiento y la competición.

Association between erythrocyte concentrations of magnesium and zinc in high-performance handball players after dietary magnesium supplementation

Jorge Molina-López¹, José Manuel Molina², Luis Javier Chiroso², Daniela Florea¹, Laura Sáez¹, Elena Millán¹, Elena Planells¹

¹Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology; ²Department of Physical Education and Sports, Faculty of Physical Activity Sciences and Sports, Universidad de Granada, Granada, Spain

Correspondence: Elena María Planells del Pozo. Centro de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18071 Granada, Spain.

<elenamp@ugr.es>

Abstract. Currently, research on athletes focuses on optimizing the nutritional status in order to adjust their minerals requirements. This study was designed to evaluate baseline nutritional status and the effect of a nutritional intervention based on magnesium (Mg) supplementation, on plasma and erythrocyte concentrations of Mg and zinc (Zn), and their relationship with training load. We analyzed training load by recording the training volume, intensity and rating of perceived exertion (RPE) during a four-month period, in 14 high-performance handball players. Intensity was studied in different levels of residual heart rate (RHR). We analyzed nutrient intake and plasma and erythrocyte concentrations of Mg and Zn by FAAS. All biomarkers were measured at baseline, after two months of dietary supplementation with Mg, and after two months without supplementation. RPE was associated with training volume at different intensities of RHR. Mg supplementation significantly increased plasma Mg levels during the supplemented period and preserved for subsequent changes in the non-supplemented period. Erythrocyte concentrations of Mg and Zn show associations between baseline and Mg supplementation. Mg levels were associated with training volume at different intensities after supplementation. In conclusion, our findings in high-performance handball players show that during competition, there is a relationship between erythrocyte Zn and Mg levels, regardless of Mg supplementation or Zn intake. Mg dietary supplementation tended to preserve changes in mineral levels during training and competition.

Key words: nutritional status, handball player, magnesium, zinc, erythrocyte

Considerable research has focused on the search for strategies to optimize nutritional status in athletes. One current trend is to use nutritional supplements for this purpose [1]. Several minerals

have been studied because of their implication in sports performance and the potential benefits of supplementation. In this connection, other authors have reported [2] that athlete nutrition

education programs usually aim to rectify dietary inadequacies and promote optimal health and athletic performance.

Magnesium (Mg) is required for a variety of fundamental cellular activities involved in different physiological systems [3, 4]. Research has shown that Mg insufficiency diminishes physical performance, and that Mg status can affect exercise capacity [4-6]. Some studies have found that extreme exercise reduces Mg concentrations and the number of erythrocytes or monocytes, and that the decrease persists after the training session had ended [7, 8]. Several authors have reported that brief, intense exercise is associated with hypermagnesemia, whereas moderate, prolonged exercise appears to be associated with hypomagnesemia [7, 9-12]. Erythrocyte concentrations of Mg may be low as a result of inadequate dietary intake or an imbalance in Mg metabolism [13].

Zinc (Zn) has considerable effects on metabolism during exercise [14-16], and plays a fundamental role in cell division, growth and maturation [3]. Moreover, Zn is needed to ensure the function of many enzymes that can affect physical performance [17]. Zinc deficiency may be involved in the development of insulin resistance and increased susceptibility to oxidative damage [18-20]. Recent studies have tried to elucidate the relationship between Zn and other elements and exercise, by focusing mainly on how this element is distributed in the body in response to exercise [3, 14].

The findings of different studies to date have been unclear regarding the effects of Mg supplementation on physical performance [21]. Research that investigated the changes in plasma Zn after exercise has likewise yielded contradictory results [22]. In light of these uncertainties, we attempted a new approach to studying the behaviour of these minerals. To date, there appear to be no studies that recorded changes in the status of these nutrients during prolonged periods of intense competition in terms of specific variables such as volume, intensity and rating of perceived exertion (RPE). In this respect, it should be borne in mind that the actual sports season for professional athletes involves a succession of stimuli and responses triggered by repeated sessions of training and competition. To our knowledge, the present study is the first to evaluate nutritional status and the effect of Mg supplementation on plasma and erythrocyte concentrations of Mg and Zn in a group of high-performance athletes, taking into account the training load parameters

mentioned above. The present study was thus designed to evaluate nutritional status at baseline and the effect of dietary Mg supplementation, on plasma and erythrocyte concentrations of Mg and Zn in a group of high-performance handball players, and to determine the relationships between these variables and training load.

Subjects and methods

Participants

The study was performed during the sports season (10/2009 to 02/2010), and all participants were members of a handball team ($n = 14$) sponsored by the Club Deportivo Puente Genil de Balonmano (Granada, Spain), in the Honor B Division of the Spanish professional handball league. The sample comprised 14 men (mean age 22.9 ± 2.7 years) who trained for an average of four days per week in addition to competing in matches at weekends.

Participation in the study was voluntary. All players provided their informed consent in writing, and were given detailed information at the beginning and end of the study regarding the aims and procedures involved. The study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Granada.

Dietary intake

To evaluate dietary intakes we used a procedure consistent with a 72-h recall system over three consecutive days (two working days and one nonworking day). Three time points were used during a four-month period: baseline, followed by two months of dietary supplementation followed by two months without supplementation. Food intakes were recorded with the help of a manual containing photographs of standard amounts of different foods and prepared dishes. The participants were asked to identify the foods consumed and describe the size of the portions as accurately as possible.

Food intakes were analyzed with Nutriber[®] software [23] to convert them into data for absolute nutrient intakes and percentage values of appropriate intakes according to individual needs. Total energy expenditure was calculated as basal metabolism for each participant multiplied by an

activity factor of 1.7. Macronutrient intakes (carbohydrates, proteins and fats), as well as Mg and Zn intakes were compared to reference intakes [4, 24, 25]. Percentage macronutrient intakes in relation to total energy intake were compared with recommended dietary allowances (RDA) [26].

Supplementation

The dietary intervention consisted of daily supplementation with 100 mg Mg as MgO for two months starting immediately after baseline measurements.

Training program

To record training parameters, we used three variables that defined training load: volume, intensity and RPE. All participants trained for a mean of four-to-five days per week, in addition to participating in competition matches at weekends.

Training volume was recorded during a four-month period covering the professional handball competition season, and divided into four, one-month mesocycles. In each training session, we recorded the number of minutes spent on each type of exercise during warm-up and actual training in order to evaluate training load in each weekly microcycle and each of the four-monthly mesocycles.

Training intensity was recorded with Polar S610 and Polar Team pulse meters (Polar Electro Ibérica, Barcelona, Spain) once per training week. Finally, 22 records of training sessions, 11 for each training period, were obtained. To calculate maximum heart rate (HR_{max}), we used the "course navette" test of maximum aerobic power. We also recorded baseline heart rate over one week to obtain an accurate mean value. Heart rate reserve or residual heart rate (RHR) was calculated as HR_{max} minus basal heart rate to establish the level of intensity and the time each athlete spent at each level. We assessed the volume training at three ranges of intensity: <60%, between 60% and 80%, and >80% RHR [27].

The RPE was used to determine whether the amount of exertion was consistent with actual intensity of exertion [28], defined in this study as overall RPE as determined by each participant at the end of each training session once per training week, (finally 22 recorded training sessions, 11 for each training period). We calculated RPE as

the mean \pm standard deviation to evaluate perceived load in each microcycle (week of training), and mesocycle (month of training).

Nutritional education intervention

The educational intervention was designed *ad hoc* by a team of nutrition specialists for this type of study population. The intervention consisted of three phases. First, the nutrition team explained aspects related to nutrition in general, with emphasis on the different types of nutrients and their importance for maintaining good health in basically healthy persons. This was followed by education focusing more specifically on nutrition and physical activity. In this second phase, the emphasis was on specific nutritional requirements in persons who perform continuous physical activity, and on the frequent errors in nutrition in this population. In the third phase, team members responded to the questions participants raised at any time throughout the study period, in order to provide additional information and clarification.

Biochemical analyses

To separate blood cells and plasma, blood samples were centrifuged in Venoject[®] tubes for 15 min at 3,000 rpm. The blood cell samples were washed three times in saline solution, divided into aliquots and stored at -80°C until analysis.

Samples were mineralized by wet acid digestion using the method of Palacios *et al.* [29], and Merck GR for analysis grade reagents (Merck, Darmstadt, Germany). Concentrated erythrocyte or plasma samples (0.4-0.4 mL) were placed in a beaker, covered with an inverted watch glass and placed in a preheated sand bath, after which NO_3H/ClO_4H (1:1) was added. When the solution had cooled, 5 N HCl was added.

Plasma concentrations of Zn and Mg were determined in all samples by FAAS (Perkin Elmer[®] Analyst300, Norwalk, CT, USA). The background correction used was based on the D2 method, which required a single-element, hollow cathode lamp for the element-specific absorption and a deuterium lamp for the background absorption. The deuterium arc background correction provided simultaneous correction for molecular absorption and light scattering. The source of energy for free atom production was heat in

the form of an air-acetylene flame (Air Liquide, Granada, Spain). The mixture was ignited in a flame ranging in temperature from 2,100 to 2,800°C. Plasma and erythrocyte levels of Mg and Zn were determined in samples that were diluted in water (Milli Q quality) before the analysis.

The calibration line was calculated from a stock solution of Mg or Zn at 1,000 mg/L ($r^2 = 0.9995$). For quality control we used human serum Ca, Mg, Li BCR304-BCR® Certified Reference Material for Mg (Fluka, Madrid, Spain), and human serum Al, Se, Zn BCR637-BCR® Certified Reference Material, for Zn (Fluka, Madrid, Spain). The value obtained for Mg was 12.22 ± 0.05 mg/L (certified value 12.25-14.32 mg/L), and the value for Zn was 1.12 ± 0.17 µg/L (certified value, 1.18-1.42 µg/L). All samples were analyzed in triplicate.

Mg in plasma and erythrocyte samples was analyzed at a wavelength of 285.2 nm (slit 0.7 nm) with a flow rate (air/C₂H₂) of 10/1.9 L/min. We used a six-point calibration curve for Mg in the concentration range of 0-0.3 mg/L established by Perkin Elmer for quantification, and obtained $r^2 = 0.9998$. Plasma and erythrocyte levels of Zn were analyzed at a wavelength of 213.9 nm (slit 0.7 nm), using a flow rate (air/C₂H₂) of 10/1.9 L/min. We used a six-point calibration curve for Zn in a concentration range of 0-1 µg/L established by Perkin Elmer for quantification, and obtained $r^2 = 0.9997$.

Statistical analyses

The data are reported with descriptive statistics. For numerical variables, we used the arithmetic mean, standard deviation and standard error of the mean. For categorical variables, we used per-

centage frequencies. To determine whether the data fitted a parametric model, the Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normal distribution. For comparisons, we used single-factor analysis of variance. Linear regression analysis was used to identify correlations by calculating Pearson's bivariate correlation coefficient. All statistical analyses were performed with SPSS v. 16.0 for Windows.

Results

Table 1 summarizes the characteristics of the participants. There were no statistically significant differences in any of the parameters between any of the pairs of time points.

Training characteristics

Table 2 shows the results for volume, RPE and the levels of intensity based on RHR for each of the four-monthly mesocycles. Training volume in mesocycles 2 and 3, with dietary Mg supplementation differed significantly from volume in mesocycles 1 and 4 without dietary Mg supplementation ($p < 0.05$). The mean overall RPE during mesocycles 1 and 2 during the intervention (dietary supplementation period) was significantly lower than in mesocycles 3 and 4 ($p < 0.05$), when dietary supplementation was not used. There were no significant differences between medium training volumes with or without dietary Mg supplementation.

During mesocycles 1 and 2, 30.35% of the training volume was in the 60%-80% range of

Table 1. Anthropometric characteristics of the participants.

Measurement	Subjects characteristics		
	Mean (SD)		
Age (y)	22.9 (2.7)		
Height (m)	1.87 (0.06)		
	Time points		
	Bp	S	NS
Weight (kg)	86.72 (5.36)	86.47 (5.59)	86.38 (4.81)
Body mass index (kg/m ²)	24.72 (1.12)	24.61 (1.30)	24.62 (1.14)
Body fat (%)	11.58 (2.53)	11.60 (2.45)	11.57 (2.34)

Results are shown as mean and standard deviation (SD)

Bp: baseline point; S: after training with dietary supplementation; and NS: after training without dietary supplementation.

Table 2. Volume, intensity and rating of perceived exertion in each mesocycle of the dietary intervention and non-intervention period.

	With dietary Mg supplementation			Without dietary Mg supplementation		
	Mesocycle 1	Mesocycle 2	Mean	Mesocycle 3	Mesocycle 4	Mean
Volume (min)	1,215	1,480 ^{a,b}	1,347.5 Mean \pm SD	1,462 ^{a,b}	1,155	1,308.5 Mean \pm SD
Overall rating of perceived exertion	15.27 (1.26)	16.21 (0.91)	15.78 (1.13)	16.58 (1.12)	16.85 (1.00)	16.71 (1.03) ^c
Residual heart rate <60%	55.60 (7.38)	56.01 (8.29)	55.85 (7.51)	46.32 (7.32)	50.67 (10.1)	48.30 (8.51)
Residual heart rate 60%-80%	29.70 (2.96)	30.78 (3.73)	30.35 (3.31)	36.94 (2.76) ^{a,b}	34.60 (4.92)	35.87 (3.87) ^c
Residual heart rate >80%	14.68 (4.52)	13.21 (4.78)	13.80 (4.49)	16.74 (6.90)	14.74 (5.26)	15.83 (6.00)

Results are shown as mean and standard deviation (SD)

^a Statistically significant difference ($p < 0.05$) mean of mesocycles 1 *versus* mesocycles 2, mesocycles 3 and *versus* mesocycles 4.

^b Statistically significant difference ($p < 0.05$) mean of mesocycles 2 *versus* mesocycle 3 *versus* mesocycles 4

^c Statistically significant difference ($p < 0.05$) mean of mesocycles 1 and 2 *versus* mean of mesocycles 3 and 4.

RHR, whereas during mesocycles 3 and 4 this percentage increased to 35.87% ($p < 0.05$). In addition, our results show significant differences ($p < 0.05$) between mesocycle 3 and mesocycles 2 and 1. Bivariate analysis with Pearson's correlation coefficient revealed a statistically significant correlation between overall RPE and the proportion of training volume in the intensity range of 60%-80% RHR ($p < 0.01$, $r = 0.64$), and between the former and the intensity range of >80% of RHR ($p < 0.01$, $r = 0.76$).

Evaluation of nutrient intakes

Our analysis of energy and nutrient intakes was based on current RDA [24, 25]. We found statistically significant differences ($p < 0.05$) in energy intake between baseline levels and both with and without dietary Mg supplementation, with a significant increase in energy intake following the nutritional education program (*table 3*).

The percentage protein intake referred to the RDA was $129.25 \pm 18.75\%$ at baseline, and increased to $147.04 \pm 25.51\%$ during the period without with dietary Mg supplementation. For carbohydrates, the percentage of the RDA covered at baseline was $69.76 \pm 6.92\%$ at baseline, with the highest percentage of the RDA for this macronutrient recorded as $81.34 \pm 9.63\%$ during the period with dietary Mg supplementation.

For fats, the percentage RDA covered initially was $152.99 \pm 31.52\%$ at baseline, with this figure increasing to $169.92 \pm 21.38\%$ during the dietary Mg supplementation period. Carbohydrate and fat intakes were significantly higher during the supplementation period than at baseline ($p < 0.05$), and carbohydrate and protein intakes were significantly higher during the non-supplemented period than at baseline (*table 3*).

The percentage, optimal, macronutrient intake based on total energy intake, as calculated in accordance with current recommendations [26], showed that protein and fat intakes were above the RDA. The only exception was fat intake during the non-supplemented period, which was within the range of recommended values.

Magnesium intake was 89.12% of the RDA at baseline and 91.88% of the RDA during the period without dietary Mg supplementation, compared to reference values [4]. Mineral intake surpassed 100% of the RDA only during the supplementation period, as a result of the dietary supplementation. Significant differences in Mg intake were found ($p < 0.05$) at baseline compared with the period with dietary Mg supplementation, and between the baseline and the period without dietary Mg supplementation.

Zinc intakes were above the RDA [4]. Significant differences in Zn intake were found ($p < 0.05$) between baseline and supplementation periods.

Table 3. Mean intake and percentage of the RDA covered for macronutrients, magnesium and zinc at three time points.

Nutrients	Recommended daily allowance	Intake Mean (SD)		
		Bp	S	NS
Energy (kcal/kg/day)	44	34.45 (3.56)	38.91 (4.15) ^a	38.54 (2.94) ^a
Macronutrients (g/day)				
Protein	104-147	133.43 (14.32)	146.64 (35.64)	147.04 (25,51) ^a
Carbohydrate	519-865	360.91 (27.64)	421.50 (49.24) ^a	416.80 (38.82) ^a
Fat	78-95	118.57 (22.52)	132.22 (17.75) ^a	129.57 (21.79)
Macronutrients (g/kg/day)				
Protein	1.2-1.7	1.54 (0.22)	1.70 (0.44)	1.70 (0.33) ^a
Carbohydrate	6-10	4.17 (0.41)	4.88 (0.60) ^a	4.82 (0.36) ^a
Fat	0.9-1.1	1.37 (0.28)	1.53 (0.19) ^a	1.49 (0.21)
Macronutrients (% E)				
Protein	12-15	17.97 (1.83)	17.47 (3.73)	17.65 (2.54)
Carbohydrate	45-65	48.66 (4.10)	50.21 (2.54)	50.20 (3.62)
Fat	20-35	35.71 (4.88)	35.51 (3.81)	34.92 (4.01)
Minerals (mg/day)				
Magnesium	400	374.30 (122.62)	488.73 (79.61) ^a	388.73 (79.61) ^b
Zinc	11	18.06 (9.91)	26.13 (12.50)	23.70 (10.16)
Macronutrients (% RDA)				
Protein	-	129.25 (18.75) ^c	141.85 (35.93)	142.39 (28.54) ^c
Carbohydrate	-	69.76 (6.92)	81.34 (9.63) ^a	80.33 (6.30) ^a
Fat	-	152.99 (31.52)	169.92 (21.38) ^a	166.18 (24.30)
Minerals (% RDA)				
Magnesium	-	89.12 (29.19)	116.37 (18.95) ^a	91.88 (21.93) ^b
Zinc	-	164.18 (90.09)	237.54 (113.53)	215.45 (92.36)

Results are shown as mean and standard deviation (SD)

^a Statistically significant difference (p<0.05) Bp versus S and NS

^b Statistically significant difference (p<0.05) S versus NS

Bp: baseline point; S: after training with dietary supplementation; NS: after training without dietary supplementation.

Relationship between training and nutritional status

Bivariate analysis, showed no correlation between training volume and biochemical Mg and Zn levels.

We found significant correlations (p<0.01) at 60-80% of RHR volume training between plasma Mg levels during the periods with and without supplementation (r = 0.36) and (r = 0.38) respectively. Furthermore, there were significant correlations (p<0.01) at >80% of RHR training volume between plasma (r = -0.28) and erythrocyte (r = 0.52) Mg levels (*figure 1*). Zn plasma levels were associated (p<0.01, r = 0.26) with 60-80% of RHR volume training during the supplementation period. There were no correlations at <60% of RHR volume training between Mg and Zn levels.

Finally, RPE correlated significantly with erythrocyte Mg levels (r = -0.29; p<0.01).

Biochemical analyses

Table 4 summarizes the findings for the biochemical parameters analyzed here. Clinical parameters for nutritional status were within the standard reference values at all three time points.

Plasma Mg concentrations were within the reference range in all participants. However, comparisons of the values at different time points showed significant differences (p<0.01) between baseline and the periods with supplementation, and without supplementation.

As regards Zn intake, plasma Zn concentrations were above the reference values at all three time points. However, we found no correlation between

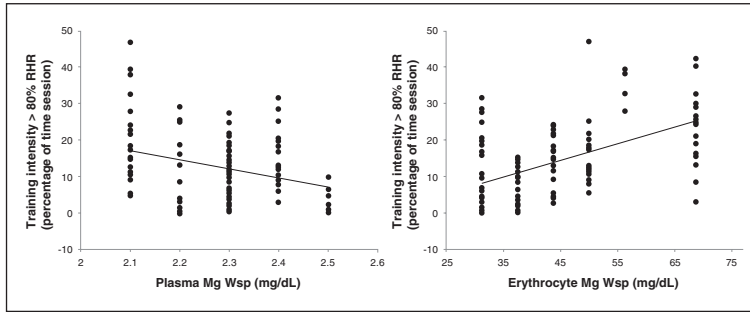


Figure 1. Correlation between training volume in >80% of RHR intensity range and plasma and erythrocyte Mg concentrations at points without supplementation (NS), in high-performance handball players.

Table 4. Biochemical parameters at three time points compared to reference values.

Biochemical parameters (mg/dL)	Reference (mg/dL)	Time points		
		Bp	S	NS
Transferrin	200-360	261.21 (27.82)	261.71 (33.00)	265.50 (28.67)
Prealbumin	20-40	26.76 (3.53)	27.19 (3.12)	26.76 (2.77)
Cholesterol	110-200	147.86 (26.74)	149.71 (27.68)	154.57 (26.80) ^a
Plasma Mg	1.7-2.6	2.06 (0.15)	2.27 (0.18) ^a	2.28 (0.13) ^a
Plasma Zn	0.07-0.1	0.36 (0.16)	0.38 (0.13)	0.48 (0.12)
Erythrocyte Mg	-	48.21 (9.62)	43.22 (17.15)	43.30 (17.24)
Erythrocyte Zn	-	1.13 (0.33)	1.01 (0.33)	1.04 (0.31)

Results are shown as mean and standard deviation (SD)

^a Statistically significant difference according to Student's *t* test ($p < 0.05$) Bp *versus* S and NS.

Bp: baseline point; S: after training with dietary supplementation; NS: after training without dietary supplementation.

Zn intake and plasma concentrations at any time during the study.

In erythrocytes, neither Mg nor Zn concentrations differed significantly between any two time points. Bivariate analysis with Pearson's correlation coefficient revealed a positive correlation ($p < 0.001$) between Mg and Zn at baseline ($r = 0.83$) (figure 2) and during the supplementation period ($r = 0.87$) (figure 2).

Discussion

The anthropometric profiles of the athletes who participated in this study were similar for all parameters, and our sample was consequently highly homogeneous in this aspect.

Our results for macronutrient intakes showed that protein and fat accounted for a large proportion of the total energy intake. Many earlier studies have reported similar findings and noted imbalances in macronutrient intakes. For example, Zalcmán *et al.* [30] reported a protein intake of $17.6 \pm 6.4\%$ and a fat intake of $32.3 \pm 5.7\%$, the latter value being slightly lower than in our sample of handball players. Carbohydrate intake in our sample was highest during the supplementation period (4.88 ± 0.60 g/kg/day), but was below the recommended allowance [24, 26] of 6-10 g/kg/day, and was lower than the 5.9 ± 1.8 g/kg/day value in the adventure racers studied by Zalcmán *et al.* [30]. In their sample of swimmers, Lukaski *et al.* [15] obtained a carbohydrate intake of 440 ± 33 g/day, a protein intake of 120 ± 7 g/day (both lower than in our sample), and a fat intake

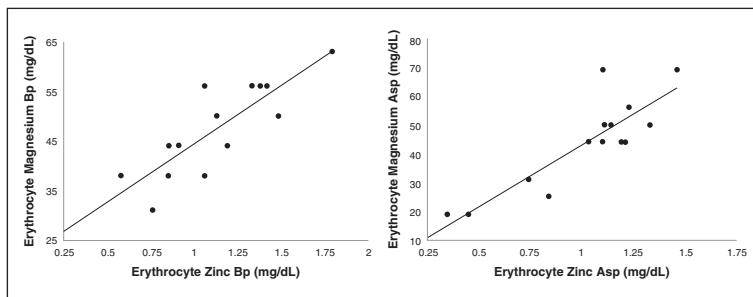


Figure 2. Correlations between Mg and Zn concentrations in erythrocytes at baseline (Bp) and after supplementation (S) points in high-performance handball players.

of 149 ± 9 g/day (higher than in our sample). These results suggest that different nutritional strategies are needed to achieve a balanced diet in different types of athletes.

Our analysis of mineral intakes showed, unsurprisingly, that Mg intake increased significantly ($p < 0.05$) during the nutritional intervention period as a result of the dietary Mg supplementation. No significant changes were found in Mg intake in relation to diet without Mg supplementation. Some earlier studies of athletes found that dietary intake did not cover 100% of the RDA for Mg intake (400 mg/day), but led to Zn intakes above 100% of the RDA (11 mg/day) [4]. In our sample, as in other studies, the RDA for Mg was covered only during the supplementation period, whereas Zn intakes surpassed the RDA at all time points [4].

A noteworthy aspect of nutritional research in athletes is that most of the studies we reviewed reported plasma and erythrocyte concentrations of Mg and Zn measured at baseline, immediately after a specific exercise test used to measure macronutrient levels, and in some cases a only a few minutes after the test had been completed. We aimed to improve upon this methodology by measuring mineral concentrations 12 h after training sessions had ended, since during exercise, nutrient concentrations can be expected to vary. As a result, the most appropriate time to evaluate nutritional status and test for possible deficiencies in athletes is not immediately after exertion, but after the body has had time to respond to changes in nutrient levels and recover from transitory deficits.

We monitored hydration status in our participants to avoid possible interference by this factor. Biochemical analysis detected no deficiencies for

Mg or Zn at any time point according to reference values for the adult population. After the nutritional intervention and training period (during both supplemented and non-supplemented periods), we found that plasma Mg concentration increased significantly ($p < 0.05$) compared to baseline. Cinar *et al.* [9] reported significant differences in plasma Mg levels ($p < 0.05$) in a group of athletes after Mg supplementation. Earlier studies without dietary supplementation failed to find changes in plasma concentrations of either mineral in athletes after training [11, 31, 32]. In our study, we found no changes in plasma Zn levels between baseline and supplementation periods. Cinar *et al.* [9] found no changes in plasma Zn levels in Mg-supplemented athletes.

During the non-supplemented period, there were no changes in Mg and Zn levels, despite significant increases in their concentrations ($p < 0.05$) caused by training load in this last period. These results may reflect the fact that the body's high Mg requirements prevent storage of this mineral in tissues such as the liver or muscle, so that it remains readily available in the bloodstream during exercise, as described by Elin [33], who attributed the lack of change to the long, biological half-life of magnesium. However, Córdova [34] noted that both plasma and erythrocyte concentrations of Mg increased immediately after completion of three different types of exercise or test, and suggested that this change reflected the redistribution of Mg. However, the possible influence of dehydration may also have contributed to these increases.

Several authors have noted that brief, high-intensity exercise is associated with a hypermagnesemic state as measured in plasma, whereas moderate exercise for prolonged periods appears to be associated with hypomagnesemia [7, 9-12].

The participants in our study performed strenuous exercise, and we measured both plasma and erythrocyte concentrations of Mg. Our long-term follow-up documented the effects of subsequent recovery from 12 hours of strenuous exercise. During training sessions, the plasma concentration of Mg decreased while erythrocyte levels of the mineral increased, probably because of the anaerobic nature of the exercise [7, 9]. During recovery, this process was inverted as a result of the redistribution of Mg in different body compartments due to the increased demand during exercise [7]. Associations found in our study, confirm this redistribution process supported by the evidence that exercise caused temporal, intercompartmental Mg changes [35].

Newhouse *et al.* [1] criticized earlier studies because of differences in the amount of dietary supplements given to athletes, and because supplements were given without establishing pre-supplementation intakes. This made it impossible to evaluate changes in Mg levels that might have reflected actual deficiencies in this nutrient [8]. We determined Mg nutritional status at baseline, and found that before the dietary intervention, athletes in our study had inadequate dietary Mg intakes based on the reference value for the healthy adult population. Nielsen and Lukaski [8] suggested that the best method to document Mg status may be to evaluate whether mineral intake is adequate. However, other authors have pointed out the difficulties arising from the lack of consensus on adequate Mg intake in athletes [8, 36].

On the other hand, associations found in our study between Mg and Zn levels in erythrocytes were possibly caused by co-transport mechanism into the red blood cells [37].

In conclusion, our findings in high-performance handball players show that during competition, there is a relationship between erythrocyte Zn and Mg levels regardless of Mg supplementation or Zn intake. Mg dietary supplementation tended to preserve changes in mineral levels during training and competition.

Acknowledgements

We thank K. Shashok for translating the manuscript into English and for advice on technical editing.

Disclosure

Financial support: this study was supported by the Junta de Andalucía (PAI CTS 642), the Spanish Ministry of Education (grant number AP2009-3701) and FIS Project PI07/1228 from the Carlos III Health Institute. Conflict of interest: none.

References

1. Newhouse IJ, Finstad EW. The effects of magnesium supplementation on exercise performance. *Clin J Sport Med* 2000; 10: 195-200.
2. Heaney S, O'Connor H, Michael S, Gifford J, Naughton G. Nutrition knowledge in athletes: a systematic review. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2011; 21, 248-61.
3. Lukaski HC. Magnesium, zinc, and chromium nutrition and athletic performance. *Can J Appl Physiol* 2001; 26 Suppl: S13-22.
4. Lukaski HC. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. *Nutrition* 2004; 20: 632-44.
5. Bohl CH, Volpe SL. Magnesium and exercise. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002; 42: 533-63.
6. Cinar V, Nizamlioglu M, Moğulkoc R. The effect of magnesium supplementation on lactate levels of sportsmen and sedanter. *Acta Physiol Hung* 2006; 93: 137-44.
7. Laires MJ, Monteiro C. Exercise, magnesium and immune function. *Magnes Res* 2008; 21: 92-6.
8. Nielsen FH, Lukaski HC. Update on the relationship between magnesium and exercise. *Magnes Res* 2006; 19: 180-9.
9. Cinar V, Mogulkoc R, Baltaci AK, Nizamlioglu M. Effect of magnesium supplementation on some plasma elements in athletes at rest and exhaustion. *Biol Trace Elem Res* 2007; 119: 97-102.
10. Mooren FC, Golf SW, Lechtermann A, Völker K. Alterations of ionized Mg²⁺ in human blood after exercise. *Life Sci* 2005; 77: 1211-25.
11. Shiu-Min Cheng M-HH, Jiunn-Min Wang, Ming-Shih Lee, Chien-Pin Lee, Fu-Chou Cheng, Mao-Tsun Lin. Changes in serum magnesium concentration in trained and untrained subjects after exercise. *J Biomed Lab Sci* 2007; 19: 25-9.
12. Soria M, González-Haro C, López-Colón JL, Llorente MT, Escanero JF. Submaximal exercise intensities do not provoke variations in plasma magnesium concentration in well-trained euhydrated endurance

- athletes with no magnesium deficiency. *Magnes Res* 2011; 24: 36-44.
13. Feillet-Coudray C, Trzeciakiewicz A, Coudray C, et al. Erythrocyte magnesium fluxes in mice with nutritionally and genetically low magnesium status. *Eur J Nutr* 2006; 45: 171-7.
 14. Baltaci AK, Gokbel H, Mogulkoc R, Okudan N, Ucok K, Halifeoglu I. The effects of exercise and zinc deficiency on some elements in rats. *Biol Trace Elem Res* 2010; 134: 79-83.
 15. Lukaski HC, Siders WA, Hoverson BS, Gallagher SK. Iron, copper, magnesium and zinc status as predictors of swimming performance. *Int J Sports Med* 1996; 17: 535-40.
 16. Ohno H, Hirata F, Terayama K, et al. Effects of training of short duration on the levels of zinc and carbonic anhydrase isoenzymes in human erythrocytes. *Ind Health* 1982; 20: 365-9.
 17. Kilic M, Baltaci AK, Gunay M. Effect of zinc supplementation on hematological parameters in athletes. *Biol Trace Elem Res* 2004; 100: 31-8.
 18. Bo S, Milanesio N, Schiavone C, et al. Magnesium and trace element intake after a lifestyle intervention. *Nutrition* 2011; 27: 108-10.
 19. De Oliveira K de JF, Donangelo CM, de Oliveira AV Jr, da Silveira CLP, Koury JC. Effect of zinc supplementation on the antioxidant, copper, and iron status of physically active adolescents. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 162-166.
 20. Kara E, Gunay M, Cicioglu I, et al. Effect of zinc supplementation on antioxidant activity in young wrestlers. *Biol Trace Elem Res* 2010; 134: 55-63.
 21. Finstad EW, Newhouse IJ, Lukaski HC, McAuliffe JE, Stewart CR. The effects of magnesium supplementation on exercise performance. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 493-8.
 22. Mundie TG, Hare B. Effects of resistance exercise on plasma, erythrocyte, and urine Zn. *Biol Trace Elem Res* 2001; 79: 23-8.
 23. Mataix JM, García Diz L. *Nutriber*® software, Barcelona, Spain, 2006. Available at nutriber.softonic.com.
 24. Rodriguez NR, Di Marco NM, Langley S. American College of Sports Medicine position stand. Nutrition and athletic performance. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 41: 709-31.
 25. Rodriguez NR, DiMarco NM, Langley S. Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 509-27.
 26. Pendergast DR, Meksawan K, Limprasertkul A, Fisher NM. Influence of exercise on nutritional requirements. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111: 379-90.
 27. Control de la carga de entrenamiento en deportes colectivos. Cuantificación de la carga interna de entrenamiento 2011. Granada, Spain. Revised by Editorial Académica Española, 1-216.
 28. Borg E, Kaijser L. A comparison between three rating scales for perceived exertion and two different work tests. *Scand J Med Sci Sports* 2006; 16: 57-69.
 29. Palacios M, Arévalo I, Cámara C. Determinación de selenio en muestras biológicas por absorción atómica mediante generación de hidruros. *Quim Anal* 1985; 4: 320-5.
 30. Zalzman I, Guarita HV, Juzwiak CR, et al. Nutritional status of adventure racers. *Nutrition* 2007; 23: 404-11.
 31. Dressendorfer RH, Petersen SR, Lovshin SEM, Keen CL. Mineral metabolism in male cyclists during high-intensity endurance training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2002; 12, 63-72.
 32. González-Haro C, Soria M, López-Colón JL, Llorente MT, Escanero JF. Plasma trace elements levels are not altered by submaximal exercise intensities in well-trained endurance euhydrated athletes. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25 Suppl 1: S54-8.
 33. Elin RJ. Re-evaluation of the concept of chronic, latent, magnesium deficiency. *Magne Res* 2011; 23: 1-3. doi:10.1684/mrh.2011.0298.
 34. Cordova A. Changes on plasmatic and erythrocytic magnesium levels after high-intensity exercises in men. *Physiol Behav* 1992; 52: 819-21.
 35. Deuster PA, Dolev E, Kyle SB, Anderson RA, Schoomaker EB. Magnesium homeostasis during high-intensity anaerobic exercise in men. *J Appl Physiol* 1987; 62: 545-50.
 36. Hunt CD, Johnson LK. Magnesium requirements: new estimations for men and women by cross-sectional statistical analyses of metabolic magnesium balance data. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 843-52.
 37. Planells E, Sánchez-Morito N, Montellano MA, Aranda P, Llopis J. Effect of magnesium deficiency on enterocyte Ca, Fe, Cu, Zn, Mn and Se content. *J Physiol Biochem* 2000 Sep; 56: 217-22.

Capítulo 6

Estudio de Suplementación con Ácido Fólico

Effect of folic acid supplementation on homocysteine concentration and association with training in handball players.

Artículo 3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432819>.

Molina-López J, Molina JM, Chiroso LJ, Florea DI, Sáez L, Planells E. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013,10(1):10. doi: 10.1186/1550-2783-10-10.

6. Abstract.

Background: Strenuous physical activity can alter the status of folic acid, a vitamin directly associated with homocysteine (Hcy); alterations in this nutrient are a risk factor for cardiovascular disease. Handball players are a population at risk for nutrient deficiency because of poor dietary habits. Objective: The aims of this study were to evaluate nutritional status for macronutrients and folic acid in members of a high-performance handball team, and determine the effect of a nutritional intervention with folic acid supplementation and education. Design: A total of 14 high-performance handball players were monitored by recording training time, training intensity (according to three levels of residual heart rate (RHR): <60%, 60%–80% and >80%), and subjective perceived exertion (RPE) during a 4-month training period. Nutritional, laboratory and physical activity variables were recorded at baseline (Week 0), after 2 months of dietary supplementation with 200 µg folic acid (50% of the recommended daily allowance) (Week 8) and after 2 months without supplementation (Week 16). We compared training load and analyzed changes in plasma concentrations of Hcy before and after the intervention. Results: Bivariate analysis showed a significant negative correlation ($P < 0.01$) between Hcy and folic acid concentrations ($r = -0.84$) at Week 8, reflecting a significant change in Hcy concentration ($P < 0.05$) as a result of hyperhomocysteinemia following the accumulation of high training loads. At Week 16 we observed a significant negative correlation ($P < 0.01$) between Hcy concentration and training time with an RHR <60%, indicating that aerobic exercise avoided abrupt changes in Hcy and may thus reduce the risk of cardiovascular accidents in high performance athletes. Conclusion: Integral monitoring and education are needed for practitioners of handball sports to record their folic acid status, a factor that directly affects Hcy metabolism. Folic acid supplementation may protect athletes against alterations that can lead to cardiovascular events related to exertion during competition.

6.1. Abstract Español.

Antecedentes: La actividad física extenuante puede alterar el estado de ácido fólico, una vitamina directamente asociada con la homocisteína (Hcy); las alteraciones en este nutriente son un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular. Los jugadores de balonmano son una población en riesgo de deficiencia de nutrientes debido a los malos hábitos alimenticios. Objetivo: Los objetivos de este estudio fueron evaluar el estado nutricional de macronutrientes y ácido fólico de un equipo de balonmano de alto rendimiento, y determinar el efecto de una intervención mediante educación nutricional y suplementación con ácido fólico y la educación. Diseño: Un total de 14 jugadores de balonmano de alto rendimiento fueron controlados mediante el registro de tiempo de entrenamiento, la intensidad del entrenamiento (de acuerdo con tres niveles de tasa cardíaca residual (RHR): <60%, 60% -80% y > 80%) y percepción subjetiva del esfuerzo (RPE) durante un período de entrenamiento de 4 meses. Las variables nutricionales, de laboratorio y de actividad física se registraron al inicio del estudio (semana 0), después de 2 meses de suplementación de la dieta con 200 mg de ácido fólico (50% de la cantidad recomendada diaria) (Semana 8) y después de 2 meses sin suplementación (semana 16) . Se comparó la carga de entrenamiento y analizaron los cambios en las concentraciones plasmáticas de Hcy antes y después de la intervención. Resultados: El análisis bivariante mostraron una correlación negativa significativa ($P < 0,01$) entre las concentraciones de ácido fólico y homocisteína ($r = -0,84$) en la semana 8, lo que refleja un cambio significativo en la concentración de Hcy ($P < 0,05$) como resultado de la hiperhomocisteinemia después de la acumulación de altas cargas de entrenamiento. En la semana 16 se observó una correlación negativa significativa ($P < 0.01$) entre la concentración de Hcy y tiempo de entrenamiento con un RHR <60%, lo que indica que el ejercicio aeróbico evitar cambios bruscos de Hcy y por lo tanto puede reducir el riesgo de accidentes cardiovasculares en deportistas de alto rendimiento. Conclusión: La monitorización y la educación nutricional son necesarias en jugadores de balonmano para registrar su estado de ácido fólico, un factor que afecta directamente el metabolismo de Hcy. Suplementar con ácido fólico podría proteger a los atletas contra las alteraciones que pueden conducir a eventos cardiovasculares relacionados con el esfuerzo durante la competición.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Effect of folic acid supplementation on homocysteine concentration and association with training in handball players

Jorge Molina-López¹, José M Molina², Luís J Chiroso^{2†}, Daniela I Florea^{1†}, Laura Sáez^{1†} and Elena Planells^{1*}

Abstract

Background: Strenuous physical activity can alter the status of folic acid, a vitamin directly associated with homocysteine (Hcy); alterations in this nutrient are a risk factor for cardiovascular disease. Handball players are a population at risk for nutrient deficiency because of poor dietary habits.

Objective: The aims of this study were to evaluate nutritional status for macronutrients and folic acid in members of a high-performance handball team, and determine the effect of a nutritional intervention with folic acid supplementation and education.

Design: A total of 14 high-performance handball players were monitored by recording training time, training intensity (according to three levels of residual heart rate (RHR): <60%, 60%–80% and >80%), and subjective perceived exertion (RPE) during a 4-month training period. Nutritional, laboratory and physical activity variables were recorded at baseline (Week 0), after 2 months of dietary supplementation with 200 µg folic acid (50% of the recommended daily allowance) (Week 8) and after 2 months without supplementation (Week 16). We compared training load and analyzed changes in plasma concentrations of Hcy before and after the intervention.

Results: Bivariate analysis showed a significant negative correlation ($P < 0.01$) between Hcy and folic acid concentrations ($r = -0.84$) at Week 8, reflecting a significant change in Hcy concentration ($P < 0.05$) as a result of hyperhomocysteinemia following the accumulation of high training loads. At Week 16 we observed a significant negative correlation ($P < 0.01$) between Hcy concentration and training time with an RHR <60%, indicating that aerobic exercise avoided abrupt changes in Hcy and may thus reduce the risk of cardiovascular accidents in high-performance athletes.

Conclusion: Integral monitoring and education are needed for practitioners of handball sports to record their folic acid status, a factor that directly affects Hcy metabolism. Folic acid supplementation may protect athletes against alterations that can lead to cardiovascular events related to exertion during competition.

Keywords: Nutritional status, Sport, Folic acid, Supplementation, Homocysteine

Background

Folic acid is a vitamin needed by a number of enzymes essential for DNA synthesis and amino acid metabolism [1]. This nutrient is an important co-factor in the methionine pathway, the most important source of methyl groups in the human organism [2]. Low folic acid intake

is known to contribute to increased levels of homocysteine (Hcy) as a result of its interrelation with methionine metabolism [2-6]. Inadequate intake of folic acid has been described in athletes who practice different sports [1], and athletes are often deficient in their intake of total calories, carbohydrate, protein, and micronutrients [7]. Some authors consider supplementation with folic acid as an efficient way to reduce elevated Hcy levels [8,9], and it has been suggested that in certain cases, folic acid supplementation should be used for preventive purposes [10]. Earlier findings have suggested that doses

* Correspondence: elenamp@ugr.es

†Equal contributors

¹Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, Granada 18071, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

of 0.2 to 0.4 mg/d can achieve maximal reductions in Hcy in healthy young populations, whereas doses up to 0.8 mg/d are needed to reduce Hcy in individuals with coronary heart disease [11].

Regular physical activity (PA) can alter the requirements for some micronutrients [1]. This makes it important to choose foods carefully, taking into account the quality and quantity of macronutrient intakes, since requirements can vary depending on the type of exercise performed [12].

Elevated plasma levels of Hcy are considered a risk factor for cardiovascular disease (CVD) [13]. Regular physical activity is now well established as a key component in the maintenance of good health and disease prevention, and has been specifically recognized to reduce the risk of appearance of CVD by reducing chronic inflammation, which plays a key role in the atherogenic process, blood pressure, body composition, insulin sensitivity and psychological behavior [14,15].

In contrast, acute intense exercise has been shown to increase plasma Hcy concentrations [14]. Several factors have been reported to be associated with increases in Hcy, such as endothelial cell injury, which stimulates vascular smooth muscle cell growth, increases platelet adhesiveness, enhances LDL cholesterol oxidation and deposition in the arterial wall, and directly activates the coagulation cascade [16]. Some research has concluded that Hcy levels may be influenced by the duration, intensity and type of exercise [6,14,17,18], whereas other studies have identified lifestyle factors such as smoking, eating habits and alcohol consumption [6,19,20], as well as age, elevated blood pressure, renal failure [17,21] and genetic factors [22], as factors that contribute to increased plasma concentrations of Hcy. In addition, nutritional factors such as reduced folic acid intake have been implicated [3,13].

Several authors [4,13,22,23] have established a direct relationship between regular physical exercise (PA) and a reduction in CVD risk, although the data regarding the effect of PA on plasma Hcy concentrations remain controversial because of methodological differences among different studies. Murakami et al. [13] noted that these discrepancies may reflect differences in the methods used to evaluate PA, the lack quantitative information on training intensity or training time, and in some cases the lack of adjustment for folate intake status [4]. However, Venta et al. [14] suggested three possible mechanisms that may explain the increase in Hcy with increasing exercise intensity: increased free radical production [15], increases in methylated forms such as creatine and acetylcholine, and increases in the amino acid pool as a result of protein catabolism. The need for research in athletes who take part in different sports has been suggested to be important in order to account for

the high prevalence of hyperchromocysteinemia [15]. To date, however, there have been no studies that evaluated plasma Hcy levels while taking into account nutrient intakes, training intensity and training time, and rate of perceived exertion (RPE). Moreover, the relationship between PA and Hcy has not been studied in team sports such as handball, in which intermittent activity alternates with periods of intense aerobic activity [24].

In the present study our aims were to evaluate macronutrient and folic acid nutritional status in high-performance athletes (handball players), and to determine the effect on these parameters of training and a nutritional intervention based on dietary supplementation with folic acid. We analyzed the data in the light of training load and plasma Hcy concentrations.

Methods

Participants

The study was done during the February to June 2010 sports season and all participants were members of the handball team ($n = 14$) sponsored by the Club Deportivo Puente Genil de Balonmano (Granada, Spain), in the Honor B Division of the Spanish professional handball league. The sample comprised 14 men (mean age 22.9 ± 2.7 years) who trained for a mean of 4 days per week in addition to competing in matches on weekends.

Participation in the study was voluntary. None of the participants had evidence of CVD, diabetes or hypertension. All participants provided their informed consent in writing, and were given detailed information at the beginning and end of the study regarding the aims and procedures involved. The study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Granada.

Anthropometric and biochemical measures

Body weight, body mass index and body fat percentage in all participants were determined with a Tanita TBF-300WA Body Composition Analyzer. Height was measured on a scale to within the nearest 0.01 cm.

Blood samples for laboratory analyses were obtained after a 12-h fast after the last training session in each time period. Venous blood was drawn, centrifuged to separate plasma and red blood cells, and stored at -80°C . Folic acid concentration was measured with an electrochemical luminescence immunoassay (ECLIA, Elecsys 2010 and Modular Analytics E 170, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with a reference value of 3 pg/l [25]. Plasma concentrations of Hcy were measured with a fluorescence polarization immunoassay (IM[®], Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) [25]. Laboratory values were determined for transferrin, prealbumin, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein and total cholesterol to verify adequate nutritional status in

all participants and rule out the possibility of nutritional alterations that might have affected the findings.

Assessment of macronutrient and folic acid intake

To evaluate dietary intakes we used a food consumption questionnaire [26] consistent with a 72-h recall system during 3 consecutive days (2 working days and 1 non-working day). During the educational intervention the participants were instructed to abstain from consuming caffeine or alcohol. Three time points were used during a 4-month period: baseline (Week 0), followed by 2 months of dietary supplementation (Week 8), followed by 2 months without supplementation (Week 16). Food intakes were recorded with the help of a manual containing photographs of standard amounts of different foods and prepared dishes. To record portion sizes and the amounts of different foods as accurately as possible, the participants were asked to identify the foods consumed and describe the size of the portions. Food intakes were analyzed with *Nutriber*[®] software [27] to convert them into data for absolute nutrient intakes and percentage values of adequate intakes according to individual needs.

Macronutrient intakes (carbohydrates, protein, and fat and folic acid) were compared to reference intakes [28]. Percentage macronutrient intakes referred to total energy intake were compared with recommended dietary allowances (RDA) [29].

Nutritional supplementation and education intervention

Dietary supplementation consisted of folic acid at 200 µg/d, starting on day 1 in Week 0 and ending on the final day of this 2-month period in Week 8. For the following 2 months no dietary supplementation was used; this period lasted from Week 8 to Week 16, when the study period ended.

The educational intervention was designed ad hoc for this type of study population by a team of nutrition specialists. The intervention consisted of three phases. First, the nutrition team explained aspects related with nutrition in general, with emphasis on the different types of nutrients and their importance for maintaining good health in basically healthy persons. This was followed by education focusing more specifically on nutrition and PA. In this second phase the emphasis was on specific nutritional requirements in persons who perform continuous PA, since nutrition in this population is often not well balanced, and supplements are often used to increase performance [1]. In the third phase, team members responded to the questions participants raised at any time throughout the study period to provide additional information and clarification.

Training profile

To record training parameters we used three variables that define training load: training time, intensity and RPE. All participants trained for a mean of 4 days per week in addition to participating in competition matches on weekends.

Training time was recorded during a 4-month period covering the professional handball competition season, divided into four 1-month mesocycles. In each training session we recorded the number of minutes spent on each type of exercise until the desired training time was reached. The first 2 months (mesocycles 1 and 2) comprised the period of training when supplementation was used (STp), and the following 2 months (mesocycles 3 and 4) comprised the period of training without dietary intervention (NSTp). Total training time in each mesocycle was calculated as the sum for all training sessions and competition match times.

Training intensity was recorded with Polar S610 and Polar Team pulse meters (Polar Electro Ibérica, Barcelona, Spain) once per training week, for a total of 22 final recorded training sessions (11 for each training period). To calculate maximum heart rate (HR_{max}) we used the course navette test of maximum aerobic power. We also recorded baseline heart rate during 7 days to obtain an accurate mean value. Heart rate reserve or residual heart rate (RHR) was calculated as HR_{max} minus basal heart rate to establish the level of intensity and the time each athlete spent in each level [30]. We used three ranges of intensity: <60%, between 60% and 80%, and >80% RHR.

The RPE was used to determine whether the amount of exertion each participant perceived was consistent with actual intensity of exertion once per training week, for a total of 22 final recorded training sessions (11 for each training period). The participants indicated one of the three levels of perceived exertion at the end of each training session. We calculated RPE as the mean \pm standard deviation (SD) ($n = 14$) to evaluate perceived load in each mesocycle or month of training.

Training sessions were monitored and standardized by using the same exercises in the same order and with the same duration across sessions. The results were compared as the mean \pm SD ($n = 14$) for each of the three study periods.

Data analysis

The data are reported with descriptive statistics. For numerical variables we used the arithmetic mean, SD and standard error of the mean. The results for categorical variables are reported as percentage frequencies. To determine whether the data fitted a parametric model, the Kolmogorov-Smirnov test was used to verify normal distribution. To check the homoscedasticity of the

variables, the Levene test was used. Between-group comparisons were made with the chi-squared test and single-factor analysis of variance. Linear regression analysis was used to identify correlations by calculating Pearson's bivariate correlation coefficient. All statistical analyses were done with SPSS v. 16.0 for Windows.

Results

The general characteristics of the participants are shown in Table 1, and these characteristics did not change significantly during any of the three study periods.

Assessment of macronutrient and folic acid intake

Energy, macronutrient and folic acid intakes are summarized in Table 2, and are referred to RDAs for athletes [28,29]. The main finding was a significantly higher ($P < 0.01$) folic acid intake in Week 8 compared to Week 0 and Week 16, as a result of supplementation. When folic acid intake was adjusted for energy intake in Week 8 regardless of supplementation, the difference became nonsignificant.

Macronutrient intakes were significantly higher ($P < 0.05$) in Week 0 compared to Week 8 and Week 16 for carbohydrates. Fat intake was significantly higher in Week 0 and Week 8, and protein intake was significantly higher in Week 0 and Week 16.

Table 3 shows the percentages of participants whose macronutrient and folic acid intakes were within each tercile of the RDA, or were above the RDA, in each of the three study periods. The results show that folic acid intake was above 100% the RDA in Week 8. In Week 0 and Week 16, intake was below 2/3 of the RDA in 42.9% of the participants [29]. Mean carbohydrate intake was below the RDA [28] at all time points, whereas fat and protein intakes were above 100% of the RDA [28].

Training profile

The results in Figure 1 show the training loads recorded during the study period. Training load is reported here as training time, RPE and distribution among three

levels of intensity during the intervention (STp) and post-intervention periods (NSTp). There were no statistically significant differences in training time between STp and NSTp.

Overall RPE during STp was significantly lower ($P < 0.05$) than during NSTp. With regard to the durations of different RHR levels (training intensity), a significant difference ($P < 0.05$) was found for the 60%–80% range, which accounted for 30.35% of the total training time during STp, and for 35.87% of the training time during the NSTp. There were no significant differences for training intensity levels in the <60% range or the >80% range.

Bivariate analysis to calculate Pearson's correlation coefficient detected statistically significant correlations ($P < 0.01$) between overall RPE and training intensity levels of 60%–80% RHR ($r = 0.64$) and >80% RHR ($r = 0.76$).

Biochemical assays

The results of biochemical analyses are shown in Table 4. There were no significant changes in plasma folic acid at any time point, and all values were within the normal range for the healthy population. However, plasma concentrations of Hcy increased significantly ($P < 0.05$) to above the normal range of values during the Week 8 and Week 16 periods compared to baseline values in Week 0. Regarding the relationship between plasma concentrations of Hcy and folic acid and training intensity, we found that both plasma concentrations showed a significant negative correlation ($r = -0.75$) ($P < 0.01$) with the level of intensity of <60% RHR. Bivariate analysis disclosed a significant negative correlation ($P < 0.01$) between Hcy and folic acid concentrations ($r = -0.84$) in Week 8.

The other nutritional parameters studied here (albumin and prealbumin) showed no statistically significant changes at any time point. Among the lipid parameters we measured, HDL, LDL and total cholesterol were significantly higher ($P < 0.05$) in Week 0 compared to Week 16, and HDL and LDL were significantly higher in Week 8 compared to Week 16.

Discussion

The results of the present study suggest that after the dietary and educational intervention, there were no significant changes in plasma concentrations of folic acid. However, we did note changes in plasma Hcy levels, despite the significant inverse correlation between the two values. Folic acid supplementation may have reduced cardiovascular risk during the NSTp in the handball players we studied.

In the present study, increased food intake as a result of nutritional education may have contributed to weight maintenance throughout the experimental period, which

Table 1 Characteristics of the participants at three time points

N = 14						
Measurement	Mean		SD			
Age (years)	22.9		2.7			
Height (m)	1.87		0.06			
	Week 0		Week 8		Week 16	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Weight (kg)	86.72	5.36	86.47	5.59	86.38	4.81
Body mass index (kg/m ²)	24.72	1.12	24.61	1.30	24.62	1.14
Body fat (%)	11.58	2.53	11.60	2.45	11.57	2.34

SD, standard deviation.

Table 2 Energy, macronutrient and folic acid intakes at three time points

N = 14	RDA	Week 0		Week 8		Week 16	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Energy (kcal/kg/day)	44*	34.45	3.56	38.91 ^a	4.15	38.54 ^a	2.94
Macronutrients (g/day)							
Protein	104 – 147*	133.43	14.32	146.64	35.64	147.04 ^a	25.51
Carbohydrate	519 – 865*	360.91	27.64	421.50 ^a	49.24	416.80 ^a	38.82
Fat	78 – 95*	118.57	22.52	132.22 ^a	17.75	129.57	21.79
Macronutrients (g/kg/day)							
Protein	1.2 - 1.7*	1.54	0.22	1.70	0.44	1.70 ^a	0.33
Carbohydrate	6 – 10*	4.17	0.41	4.88 ^a	0.60	4.82 ^a	0.36
Fat	0.9 – 1.1*	1.37	0.28	1.53 ^a	0.19	1.49	0.21
Macronutrients (% energy intake)							
Protein	12 – 15%*	17.97	1.83	17.47	3.73	17.65	2.54
Carbohydrate	45 – 65%*	48.66	4.10	50.21	2.54	50.20	3.62
Fat	20 – 35%*	35.71	4.88	35.51	3.81	34.92	4.01
Vitamins (µg/day)							
Folic acid	400*	301.97	89.05	516.11 ^a	54.49	290.35 ^b	98.57

RDA, recommended daily allowance. SD, standard deviation.

* Values used for comparison were from previous publications [28,29].

^a Statistically significant differences ($P < 0.05$) between Week 0 vs. Week 8 and Week 16.

^b Statistically significant differences ($P < 0.05$) between Week 8 vs. Week 16.

would avoid possible alterations in body weight as a result of poor dietary habits [1]. Regular PA is known to alter the requirements for certain micronutrients [1]. Folic acid intake in the athletes studied here (Table 2) was below the RDA except during Week 8, and was similar to the values reported by Rousseau et al. [12]. In this connection, a meta-analysis by Woolf and Manore [1]

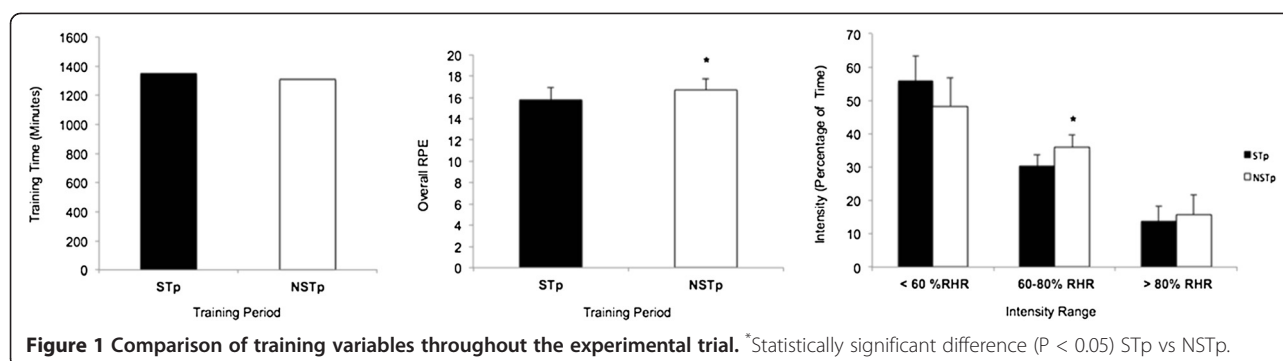
concluded that most studies which had analyzed folic acid intake based on a 3-day (72-h) recall period obtained values similar to those found in the present study. Supplementation with folic acid was implemented after an initial evaluation which showed the intake of this nutrient to be inadequate. The amount used in the dietary supplement was consistent with the theoretical basis described by McNully et al. [11], who suggested that doses of 0.2 to 0.4 mg folic acid per day may achieve maximal reductions in Hcy in healthy young people, whereas doses up to 0.8 mg folic acid per day would be needed to reduce Hcy in individuals with coronary artery disease. However, in the present study plasma Hcy concentration did not change despite the significant increase in folic acid intake.

Regular PA is known to reduce the risk of CVD [6,12]. Handball, like other team sports such as soccer and field hockey, is considered an intermittent intensity sport on the basis of the aerobic energy pathways involved [31]. When we analyzed training load, we found a significant negative correlation between exercise training time at an intensity range of <60% RHR and plasma Hcy level (Figure 2). Rousseau et al. [12] reported that athletes who performed aerobic exercise had lower levels of Hcy. This finding is consistent with our results; moreover, our direct method for quantifying training load provided data that can be considered accurate and reliable. However, a potential limitation that should be taken into account is that the present study was done under actual

Table 3 Recommended daily allowance covered for energy, macronutrients and folic acid at three time points

Nutrient		≤ 2/3 RDA	> 2/3 RDA ≤ RDA	> RDA
		Macronutrients (%)		
Protein	Week 0	-	-	100
	Week 8	-	-	100
	Week 16	-	-	100
Carbohydrate	Week 0	35.7	64.3	-
	Week 8	-	92.9	7.1
	Week 16	-	100	-
Fat	Week 0	-	-	100
	Week 8	-	-	100
	Week 16	-	-	100
Vitamins (%)				
Folic acid	Week 0	42.9	42.9	14.3
	Week 8	-	-	100
	Week 16	42.9	50.0	7.1

RDA, recommended daily allowance.



training conditions, although it seems that a better study design would have been to (prospectively) control the volume and intensity of PA to keep them equal among participants.

Other authors reported different values for Hcy levels after exercise; the variations among different studies may reflect the use of indirect methods to quantify PA, the lack of nutritional studies and differences between studies in mean age of the participants [4,31,32].

It is worth noting that folic acid levels in plasma were near the lower limit of normality. Other authors found that a 5-mmol/l increase in plasma Hcy levels (>10 mmol/l) was associated with a 60% increase in the risk of coronary artery disease in men [8,33]. McCully [10] noted that if the concentration of Hcy is between 8 and 12 mmol/l, improvements in the quality of the diet are needed to provide adequate vitamin intakes able to maintain Hcy at concentrations that can reduce the risk of coronary disease in adults. As described in the Results section, there was a significant negative correlation between plasma Hcy levels and plasma folic acid levels in Week 8. However, Hcy concentration increased despite dietary folic acid supplementation. This finding suggests that in contrast to the expected increase in plasma folic

acid concentrations and decrease in Hcy, the opposite effect was likely attributable to training. In most participants in the present study, plasma levels of folic acid were near the lower limit of the reference values (4.2–19.1 ng/ml), and after the intervention there was no significant change at the end of the supplementation period or at the end of the post-supplementation period. König et al. [5] showed that the increase in Hcy was dependent on the initial plasma level of folic acid as well as on training time. These authors attributed the increase in Hcy to increased methionine catabolism, which induced a greater influx of molecules with methyl groups as a result of high-intensity PA [4]. A study by Borrione et al. [15] analyzed team sports similar to handball but did not use dietary supplementation. They found Hcy levels that were much higher than those we found, and folic acid levels similar to those in the athletes we studied.

Our experimental approach was designed to evaluate training load, nutritional and biochemical indicators in an integrated manner to obtain accurate data in professional athletes during the sports season. Our method emphasized accurate data capture for both training load and dietary intakes. Variations in either of these factors

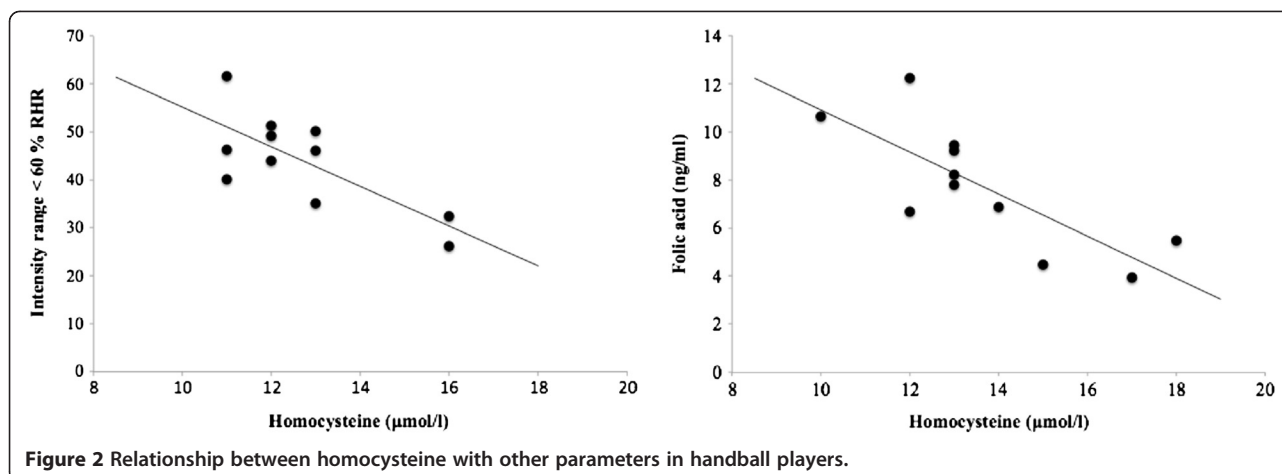
Table 4 Biochemical values of clinical and nutritional parameters at three time points

Biochemical parameters	Reference value	Study period					
		Week 0		Week 8		Week 16	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Transferrin (mg/dl)	200 – 360	261.21	27.82	261.71	33.00	265.50	28.67
Prealbumin (mg/dl)	20 – 40	26.76	3.53	27.19	3.12	26.76	2.77
HDL (mg/dl)	40 – 60	58.29	13.58	57.29	12.28	61.00 ^{a,b}	13.31
LDL (mg/dl)	70 – 150	74.00	22.89	71.35	20.84	83.07 ^{a,b}	22.58
Total cholesterol (mg/dl)	110 – 200	147.86	26.74	149.71	27.68	154.57 ^a	26.80
Folic acid (ng/ml)	4.2 – 19.9	8.14	1.17	7.73	2.57	7.62	2.36
Homocysteine (μ mol/l)	5 – 12	11.64	2.65	13.92 ^a	2.39	13.14 ^a	1.96

HDL, high-density lipoprotein cholesterol; LDL, low-density lipoprotein cholesterol.

^a Statistically significant differences ($P < 0.05$) Week 0 vs. Week 8 and Week 16.

^b Statistically significant differences ($P < 0.05$) Week 8 vs. Week 16.



can affect plasma levels of Hcy and folic acid, so it was important to avoid alterations that might compromise the data this study was designed to seek.

Conclusions

Our study appears to be the first to use careful controls for participants' training load and nutritional and biochemical status before, during and after the professional sports season. Our results suggest that high-performance athletes such as handball players may require preventive dietary supplementation with folic acid to curtail the effects of a sharp increase in blood Hcy concentrations. This increase may be associated with a sudden increase in the risk of CVD as a result of the high training load accumulated in successive training sessions during the professional competition season.

Abbreviations

Hcy: Homocysteine; PA: Physical activity; RDA: Recommended daily allowance; RHR: Residual heart rate; RPE: Rate of perceived exertion; SD: Standard deviation.

Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

Authors' contributions

All the authors contributed to and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Education (grant number AP2009-3701) and by FIS Project PI07/1228 from the Carlos III Health Institute. The authors thank K. Shashok for translating the manuscript into English and for advice on technical editing.

Author details

¹Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Granada, Granada 18071, Spain. ²Department of Physical Education and Sports, Faculty of Sports Sciences, University of Granada, Granada 18071, Spain.

Received: 11 January 2012 Accepted: 31 December 2012

Published: 21 February 2013

References

1. Woolf K, Manore MM: **B-vitamins and exercise: does exercise alter requirements?** *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2006, **16**(5):453–484.
2. Herrmann M, Obeid R, Scharhag J, Kindermann W, Herrmann W: **Altered vitamin B12 status in recreational endurance athletes.** *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2005, **15**:433–441.
3. Hayward R, Ruangthai R, Karnilaw P, Chicco A, Strange R, McCarty H, Westerlind KC: **Attenuation of homocysteine-induced endothelial dysfunction by exercise training.** *Pathophysiology* 2003, **9**:207–214.
4. Joubert LM, Manore MM: **The role of physical activity level and B-vitamin status on blood homocysteine levels.** *Med Sci Sports Exerc* 2008, **40**:1923–1931.
5. König D, Bissé E, Deibert P, Müller HM, Wieland H, Berg A: **Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B12.** *Ann Nutr Metab* 2003, **47**:114–118.
6. Gaume V, Mougou F, Simon-Rigaud ML, Simon-Rigaud ML, N'Guyen UN, Callier J, Kantelip JP, Berthelot A: **Physical training decreases total plasma homocysteine and cysteine in middle-aged subjects.** *Ann Nutr Metab* 2005, **49**:125–131.
7. Lun V, Erdman KA, Reimer RA: **Evaluation of nutritional intake in Canadian high-performance athletes.** *Clin J Sport Med* 2009, **19**(5):405–411.
8. Cook S, Hess OM: **Homocysteine and B vitamins.** *Handb Exp Pharmacol* 2005, **170**:325–338.
9. Cotlarciuc I, Andrew T, Dew T, Clement G, Gill R, Surdulescu G, Sherwood R, et al: **The basis of differential responses to folic acid supplementation.** *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011, **4**(2):99–109.
10. McCully KS: **Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention.** *Am J Clin Nutr* 2007, **86**:1563S–1568S.
11. McNulty H, Pentieva K, Hoey L, Ward M: **Homocysteine, B-vitamins and CVD.** *P Nutr Soc* 2008, **67**(2):232–237.
12. Rousseau AS, Robin S, Roussel AM, Ducros V, Margaritis I: **Plasma homocysteine is related to folate intake but not training status.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005, **15**:125–133.
13. Murakami H, Iemitsu M, Sanada K, Gando Y, Ohmori Y, Kawakami R, Sasaki S, Tabata I, Miyachi M: **Associations among objectively measured physical activity, fasting plasma homocysteine concentration, and MTHFR C677T genotype.** *Eur J Appl Physiol* 2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21451940> (accessed 5 July 2011).
14. Venta R, Cruz E, Valcárcel G, Terrados N: **Plasma vitamins, amino acids, and renal function in postexercise hyperhomocysteinemia.** *Med Sci Sports Exerc* 2009, **41**:1645–1651.
15. Borrione P, Rizzo M, Spaccamiglio A, Salvo RA, Dovio A, Termine A, Parisi A, Fagnani F, Angeli A, Pigozzi F: **Sport-related hyperhomocysteinemia: a putative marker of muscular demand to be noted for cardiovascular risk.** *Br J Sports Med* 2008, **42**:894–900.
16. Gelecek N, Teoman N, Ozdirenc M, Pinar L, Akan P, Bediz C, et al: **Influences of acute and chronic aerobic exercise on the plasma homocysteine level.** *Ann Nutr Metab* 2007, **51**(1):53–58.

17. Unt E, Zilmer K, Mägi A, Kullisaar T, Kairane C, Zilmer M: **Homocysteine status in former top-level male athletes: possible effect of physical activity and physical fitness.** *Scand J Med Sci Sports* 2008, **18**:360–366.
18. Joubert LM, Manore MM: **Exercise, nutrition, and homocysteine.** *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2006, **16**:341–361.
19. Chrysoshoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zeimbekis A, Zampelas A, Papademetriou L, Masoura C, Stefanadis C: **The associations between smoking, physical activity, dietary habits and plasma homocysteine levels in cardiovascular disease-free people: the “ATTICA” study.** *Vasc Med* 2004, **9**:117–123.
20. Fokkema MR, Weijer JM, Dijck-Brouwer DA, van Doormaal JJ, Muskiet FA: **Influence of vitamin-optimized plasma homocysteine cutoff values on the prevalence of hyperhomocysteinemia in healthy adults.** *Clin Chem* 2001, **47**(6):1001–1007.
21. Dankner R, Geulayov G, Farber N, Novikov I, Segev S, Sela BA: **Cardiorespiratory fitness and plasma homocysteine levels in adult males and females.** *Isr Med Assoc J* 2009, **11**:78–82.
22. Ruiz JR, Hurtig-Wennlöf A, Ortega FB, Patterson E, Nilsson TK, Castillo MJ, Sjöström M: **Homocysteine levels in children and adolescents are associated with the methylenetetrahydrofolate Reductase 677C > T genotype, but not with physical activity, fitness or fatness: the European youth heart study.** *Br J Nutr* 2007, **97**:255–262.
23. Sotgja S, Carru C, Caria MA, Tadolini B, Deiana L, Zinellu A: **Acute variations in homocysteine levels are related to creatine changes induced by physical activity.** *Clin Nutr* 2007, **26**:444–449.
24. Holway FE, Spriet LL: **Sport-specific nutrition: practical strategies for team sports.** *J Sports Sci* 2011, **29**(Suppl 1):S115–125.
25. Sauberlich H: *Laboratory tests for the assessment of nutritional status.* Boca Raton: FL: CRC Press; 1999.
26. Mataix J, Rodríguez G, Planells E: **Nutrición y alimentación humana.** In *Información para la práctica nutricional. Volume 2.* 2nd edition. Edited by Mataix J. Barcelona: Ergon; 2009:689–744.
27. Mataix J, Collado F: *Nutriber[®] software.* FUNIBER-Fundación Universitaria Iberoamericana; 2006. <http://www.funiber.org> (accessed July 2011).
28. Rodríguez NR, Di Marco NM, Langley S: **American college of sports medicine position stand. Nutrition and athletic performance.** *Med Sci Sports Exerc* 2009, **41**:709–31.
29. Pendergast DR, Meksawan K, Limprasertkul A, Fisher NM: **Influence of exercise on nutritional requirements.** *Eur J Appl Physiol* 2011, **111**:379–90.
30. Cuadrado J: *Analysis of the influence of training intensity on variables of internal load in team sports.* PhD Thesis. University of Granada, Physical Education and Sport; 2010.
31. Papapanagiotou A, Gissis I, Papadopoulos C, Souglis A, Bogdanis GC, Giosos I, Sotiropoulos A: **Changes in homocysteine and 8-iso-PGF (2a) levels in football and hockey players after a match.** *Res Sports Med* 2011, **19**:118–128.
32. Herrmann M, Schorr H, Obeid R, Scharhag J, Urhausen A, Kindermann W, Germany W: **Homocysteine increases during endurance exercise.** *Clin Chem Lab Med* 2003, **41**:1518–1524.
33. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG: **A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.** *JAMA* 1995, **274**:1049–1057.

doi:10.1186/1550-2783-10-10

Cite this article as: Molina-López et al.: Effect of folic acid supplementation on homocysteine concentration and association with training in handball players. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2013 **10**:10.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Capítulo 7

Estudio de Suplementación en Cinc

7. ESTUDIO DE SUPLEMENTACIÓN EN Zn.

A continuación se describen todos los resultados, pendientes de publicación, obtenidos de la experiencia en la que se suplementó a los deportistas con Zn. La muestra se monitorizó en el punto inicial y tras dos meses de suplementación, mediante valoraciones antropométrica, de ingesta, bioquímica, y, finalmente, de expresión génica. El presente apartado muestra los resultados correspondientes al análisis comparativo realizado en la intervención mediante suplementación con Zn.

7.1. Valoración Antropométrica.

En la tabla X se pueden observar las características antropométricas registradas para los individuos pertenecientes al estudio. A lo largo de la intervención, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre CI y CS para ninguno de los parámetros estudiados a excepción del somatotipo endomórfico, en el que se registro un descenso estadísticamente significativo ($p=0.034$) tras la suplementación con Zn respecto al control inicial.

	Muestra Total	CI	CS	
	Media (SD)	Media (SD)	Media (SD)	p
Edad (años)	24.8 ± 3.68	-	-	-
Altura (cm)	1.89 ± 0.04	-	-	-
Peso (kg)	93.2 ± 11.2	92.5 ± 11.1	93.9 ± 11.7	.785
IMC (kg/m ²)	26.1 ± 2.84	25.9 ± 2.75	26.4 ± 3.03	.735
Compartimentos				
Grasa (%) (Siri)	14.1 ± 2.10	14.8 ± 2.17	13.4 ± 1.91	.121
Graso (kg)	13.2 ± 3.03	13.8 ± 3.06	12.7 ± 3.04	.255
Óseo (kg)	7.59 ± 0.33	7.57 ± 0.34	7.60 ± 0.32	.671
Residual (kg)	22.5 ± 2.70	22.3 ± 2.68	22.6 ± 2.82	.785
Muscular (kg)	49.9 ± 6.08	48.9 ± 6.02	50.9 ± 6.22	.470
Somatotipo				
Endomorfia	4.28 ± 1.38	4.91 ± 1.38	3.70 ± 1.15	.034
Mesomorfia	4.28 ± 0.94	4.23 ± 1.02	4.32 ± 0.90	.894
Ectomorfia	2.03 ± 0.88	2.11 ± 0.85	1.97 ± 0.96	.791

DE = Desviación Estándar; P25, P50, P75 = Percentiles 25, 50 y 75.* = Porcentaje graso estimando a través de impedancia bioeléctrica.

Tabla X. Resultados de parámetros antropométricos sesgado por puntos de medición.

7.2. Valoración de ingesta de macronutrientes y Zn.

Los resultados sobre la ingesta de macronutrientes y Zn vienen mostrados en la tabla XI. Estos resultados fueron comparados con las recomendaciones actuales establecidas de energía y macronutrientes en deportistas por diversos organismos.^{7,8}

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la ingesta de macronutrientes entre los dos controles realizados. La ingesta de Zn fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en el CS respecto al CI consecuencia de la intervención con Zn.

	CI		CS		p	IR
	Media ± DE	% IR	Media ± DE	% IR		
Energía (kcal/día)	3508.8 ± 483.1	97.5	3453.9 ± 277.7	96.1	.594	3597.5
Proteínas (g/día)	157.5 ± 30.6	142.2-100.4	141.7 ± 19.8	129.7-91.6	.112	1.2-1.7 g·kg ⁻¹
CHO (g/día)	406.7 ± 45.4	73.3-44.0	430.9 ± 48.7	78.3-47.00	.180	6-10 g·kg ⁻¹
Lípidos (g/día)	141.3 ± 28.7	176.9-101.1	137.1 ± 26.3	171.9-98.2	.595	20 - 35 %
Zinc (mg/día)	14.0 ± 1.22	93.16	17.7 ± 1.79	118.2	.000	15

DE = Desviación Estándar; IR = Ingesta de Referencia; P = Diferencias estadísticamente significativas.

Tabla XI. Ingesta de energía, macronutrientes y Zn comparando el control inicial con el control suplementado.

7.3. Valoración bioquímica.

En este apartado vamos a describir los resultados obtenidos en parámetros clínico-nutricionales y de Zn en muestras de plasma y células sanguíneas.

7.3.1. Parámetros clínico-nutricionales.

Los valores obtenidos correspondientes a los parámetros bioquímicos clínicos analizados se muestran en la tabla XII. En general, se observa como la totalidad de la

muestra se encontró dentro de los márgenes establecidos para población adulta sana, tanto en el CI como en el CS.

	CI Media (SD)	CS Media (SD)	Valor Referencia
Glucosa (mg/dL)	70.8 ± 11.0	62.2 ± 9.67	70-110
Urea (mg/dL)	42.2 ± 9.25	35.4 ± 7.04	10-50
Creatinina (mg/dL)	1.17 ± 0.21	1.01 ± 0.13	0.7-1.2
Ácido Úrico (mg/dL)	6.15 ± 1.36	5.78 ± 1.20	3.4-7
Colesterol Total (mg/dL)	155.5 ± 28.6	140.9 ± 36.5	<200
Triglicéridos (mg/dL)	117.5 ± 47.7	128.6 ± 67.7	<150
HDL (mg/dL)	51.1 ± 8.02	50.9 ± 15.1	>35
LDL (mg/dL)	85.7 ± 24.2	74.8 ± 25.5	<100
GOT (U/L)	32.6 ± 7.41	27.9 ± 8.17	1-40
GPT (U/L)	27.9 ± 10.9	24.5 ± 14.7	1-41
GGT (U/L)	21.5 ± 8.20	21.4 ± 10.6	5-60
Alfa-Antitripsina	118.2 ± 14.8	134.9 ± 21.5	90-200
Albúmina (g/dL)	4.94 ± 0.19	4.83 ± 0.15	3.5-5.2
Prealbúmina (mg/dL)	28.9 ± 5.09	29.0 ± 5.15	20-40
Transferrina (mg/dL)	269.6 ± 29.1	266.8 ± 23.2	200-360
Fosfatasa alcalina (U/L)	88.4 ± 13.3	76.4 ± 12.9	40-130
Hemoglobina (g/dL)	15.5 ± 0.51	15.4 ± 0.84	13-17
Hematocrito (%)	44.4 ± 1.41	44.2 ± 2.02	40-50
Mg Suero (mg/dL)	2.34 ± 0.13	2.20 ± 0.10	1.7-2.6
Cu Suero (µg/dL)	63.9 ± 7.20	93.4 ± 20.6	45-157
Fe Suero (µg/dL)	78.0 ± 9.43	83.4 ± 15.3	59-158
Ca Suero (mg/dL)	9.76 ± 0.18	9.29 ± 0.25	8.6-10.2
P Suero (mg/dL)	4.31 ± 0.41	3.78 ± 0.39	2.5-4.5
Superóxido Dismutasa (U/mL)	171.4 ± 1.84	157.9 ± 35.5	164-240
PAO (µmol/L)	1426.19 ± 242.62	1263.19 ± 288.33	21.9-4378

DE = Desviación Estándar.

Tabla XII. Valores bioquímicos en el CI y CS respecto a los valores de referencia.

7.3.2. Resultados de Zn en plasma y células sanguíneas.

Los resultados obtenidos de Zn, se han expresado en mg/dL tanto en plasma y en células sanguíneas. A continuación, se pueden observar los resultados medios obtenidos del Zn para los dos controles realizados (CI y CS).

Los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros de Zn, mostraron diferencias estadísticamente significativas para los valores plasmáticos de Zn ($p < 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas en el caso del Zn en células sanguíneas durante la intervención.

	Muestra Total	CI	CS	
	Media (SD)	Media (SD)	Media (SD)	p
Zn Plasma (mg/dL)	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.17 ± 0.08	.028
Zn Células sanguíneas (mg/dL)	1.40 ± 0.40	1.53 ± 0.60	1.26 ± 0.20	.469

DE = Desviación Estándar.

Tabla XIII. Valores de Zn en plasma y en células sanguíneas en el CI y CS.

En el apartado de discusión se expresan los valores predictivos de sujetos deficientes en Zn tanto en el CI como en CS.

7.3.3. Evaluación Hematológica.

En la tabla XIV, podemos observar los valores resultantes en el hemograma realizado a los deportistas, tanto el hemograma completo como la fórmula leucocitaria. Se puede observar valores normales para todos los parámetros analizados tanto en el CI como en el CS.

	CI Media (SD)	CS Media (SD)	Valor Referencia
Hematíes 10 ⁶ / μ l	5.10 \pm 0.20	5.11 \pm 0.25	4.5-5.5
Plaquetas 10 ³ / μ l	273.6 \pm 64.8	267.0 \pm 46.6	150-410
Leucocitos 10 ³ / μ l	6.76 \pm 1.18	6.71 \pm 1.33	4-10
Neutrófilos %	56.1 \pm 9.13	57.5 \pm 8.61	40-80
Linfocitos %	32.3 \pm 7.87	29.9 \pm 8.03	20-40
Monocitos %	7.21 \pm 1.28	6.59 \pm 1.22	2-10
Eosinófilos %	2.71 \pm 1.34	3.44 \pm 1.40	1-5
Basófilos %	0.42 \pm 0.13	0.50 \pm 0.14	0-2
Inmunoglobulina G	928.0 \pm 148.2	898.5 \pm 159.5	700-1600
Inmunoglobulina A	228.0 \pm 97.5	217.6 \pm 89.9	70-400
Inmunoglobulina M	100.7 \pm 38.6	102.9 \pm 40.4	40-230
C3 complemento	114.9 \pm 14.2	116.9 \pm 12.6	90-180
C4 complemento	20.6 \pm 3.33	22.7 \pm 3.99	16-38

DE = Desviación Estándar.

Tabla XIV. Valores hematológicos en CI y CS, y sus valores de referencia.

7.3.4. Evaluación de la Expresión Génica.

Los resultados obtenidos en el estudio de expresión génica correspondiente a los transportadores de Zn se muestran en el siguiente apartado.

7.3.4.1. Pureza e integridad del ARN.

La tabla que se muestra a continuación (Tabla XV), contiene los resultados obtenidos en los dos controles, referentes al análisis de pureza e integridad del ARN observado tras la extracción de los tubos PAXgene™ RNA tubes para sangre total, empleando la técnica de extracción de ARN PAXgene™ Blood RNA Kit.

Característica	CI	CS
	Media \pm DE (Mín-Máx)	Media \pm DE (Mín-Máx)
RNA (ng/ μ l)	101.1 \pm 28.4 (67.6 - 142.1)	143.6 \pm 36.3 (100.1 - 208.9)

CI = Control Inicial; CS = Control Suplementado; DE = Desviación Estándar; Mín = Mínimo; Máx = Máximo.

Tabla XV. Resultados de la cuantificación del RNA en la muestra de sangre en el CI y CS.

Los resultados correspondientes a la integridad del ARN mediante el análisis con Agilent Bioanalyzer se muestran en la tabla XVI.

Característica	CI	CS
	Media \pm DE	Media \pm DE
RNA (RIN)	8.80 \pm 0.29	9.18 \pm 0.27

DE = Desviación Estándar

Tabla XVI. Valores medios de integridad del ARN en la muestra total.

7.3.4.2. Expresión de los transportadores de Zn.

En el apartado correspondiente al análisis de expresión de la muestra total, se ha descrito cómo se realiza la expresión y cómo se obtiene el valor final. A continuación se muestran los resultados Δ Ct obtenidos sobre la expresión de los genes correspondientes a los distintos transportadores (Tabla XVII).

		Muestra Total	CI	CS	
		Media (SD)	Media (SD)	Media (SD)	p
ZnT 1	SLC30A1	6.84 ± 1.53	7.51 ± 1.92	6.42 ± 1.11	.178
ZnT 2	SLC30A2	12.7 ± 3.47	14.4 ± 4.10	11.4 ± 1.11	.671
ZnT 3	SLC30A3	13.8 ± 1.61	14.5 ± 1.82	13.2 ± 1.22	.241
ZnT 4	SLC30A4	8.41 ± 0.42	8.26 ± 0.37	8.57 ± 0.43	.232
ZnT 5	SLC30A5	6.31 ± 1.48	6.93 ± 1.91	5.74 ± 0.60	.104
ZnT 6	SLC30A6	5.83 ± 0.42	5.65 ± 0.32	5.98 ± 0.45	.166
ZnT 7	SLC30A7	5.38 ± 0.40	5.36 ± 0.28	5.35 ± 0.51	.970
ZnT 8	SLC30A8	12.7 ± 1.96	13.7 ± 2.83	11.8 ± 1.38	.160
ZnT 9	SLC30A9	6.56 ± 1.00	6.99 ± 1.33	6.19 ± 0.38	.192
ZnT 10	SLC30A10	14.1 ± 1.96	14.4 ± 2.83	13.8 ± 0.82	.806
ZIP 1	SLC39A1	5.36 ± 0.48	5.41 ± 0.68	5.33 ± 0.27	.562
ZIP 2	SLC39A2	14.9 ± 1.71	14.4 ± 1.91	15.4 ± 1.46	.295
ZIP 3	SLC39A3	6.31 ± 0.86	6.75 ± 0.41	5.92 ± 0.99	.003
ZIP 4	SLC39A4	6.51 ± 0.70	6.76 ± 0.57	6.28 ± 0.76	.092
ZIP 5	SLC39A5	11.2 ± 3.20	13.0 ± 3.24	9.53 ± 2.20	.002
ZIP 6	SLC39A6	7.84 ± 2.29	8.76 ± 2.98	7.01 ± 0.99	.205
ZIP 7	SLC39A7	7.97 ± 0.50	8.15 ± 0.58	7.80 ± 0.39	.197
ZIP 8	SLC39A8	7.14 ± 2.11	7.22 ± 1.45	7.06 ± 2.64	.310
ZIP 9	SLC39A9	5.05 ± 0.88	5.03 ± 0.73	5.06 ± 1.02	.822
ZIP 10	SLC39A10	6.21 ± 0.84	6.59 ± 1.05	5.91 ± 0.46	.125
ZIP 11	SLC39A11	8.45 ± 1.37	9.40 ± 0.85	7.61 ± 1.20	.054
ZIP 12	SLC39A12	15.7 ± 1.27	15.5 ± 1.60	16.0 ± 0.96	.516
ZIP 13	SLC39A13	7.06 ± 0.76	7.51 ± 0.64	6.44 ± 0.41	.006
ZIP 14	SLC39A14	8.85 ± 0.97	9.57 ± 0.89	8.19 ± 0.43	.001

DE = Desviación Estándar.

Tabla XVII. Valores de ΔCt en las muestras de sangre en el CI y CS.

Los resultados correspondiente al análisis comparativo sobre la expresión de genes en relación a los transportadores de Zn, mostró un aumento significativo en la expresión de los genes ZIP3 ($p < 0.01$), ZIP 5 ($p < 0.01$), ZIP13 ($p < 0.01$) y ZIP14 ($p < 0.001$) en el CS respecto al CI. Los transportadores ZIP4 y ZIP11 rozaron la significación estadística ($p = 0.092$ y $p = 0.054$ respectivamente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el resto de transportadores analizados.

Las siguientes figuras (Figura 19 y 20) clasifican los resultados obtenidos sobre la expresión de los transportadores de Zn de mayor a menor grado de expresión. Se muestra la expresión para el CI y CS.

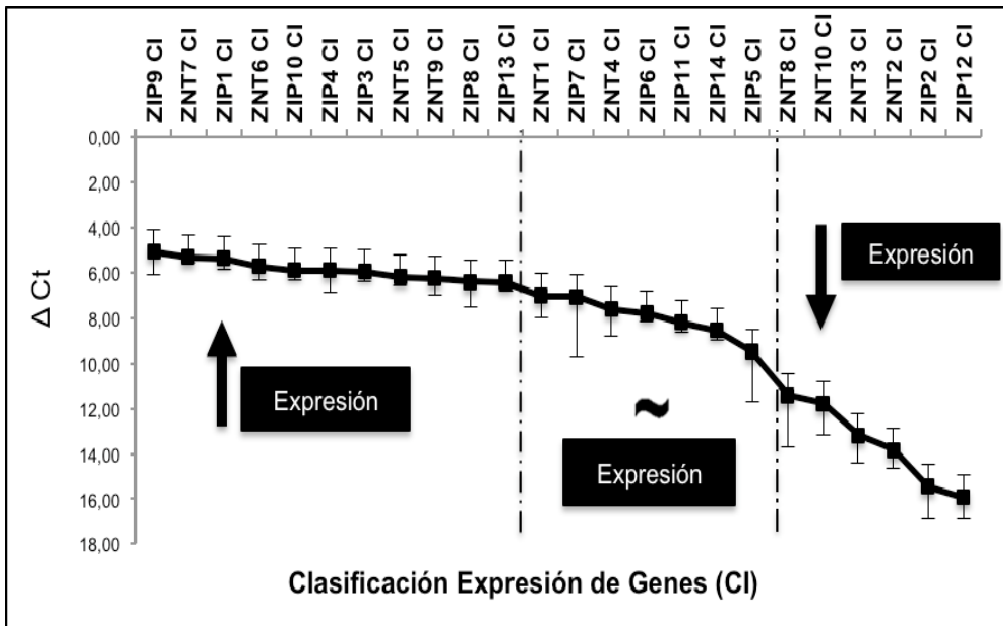


Figura 19. Clasificación de los transportadores de Zn en función del grado de expresión en la muestra total (mayor a la izquierda; menor a la derecha) según los valores ΔC_t en el CI.

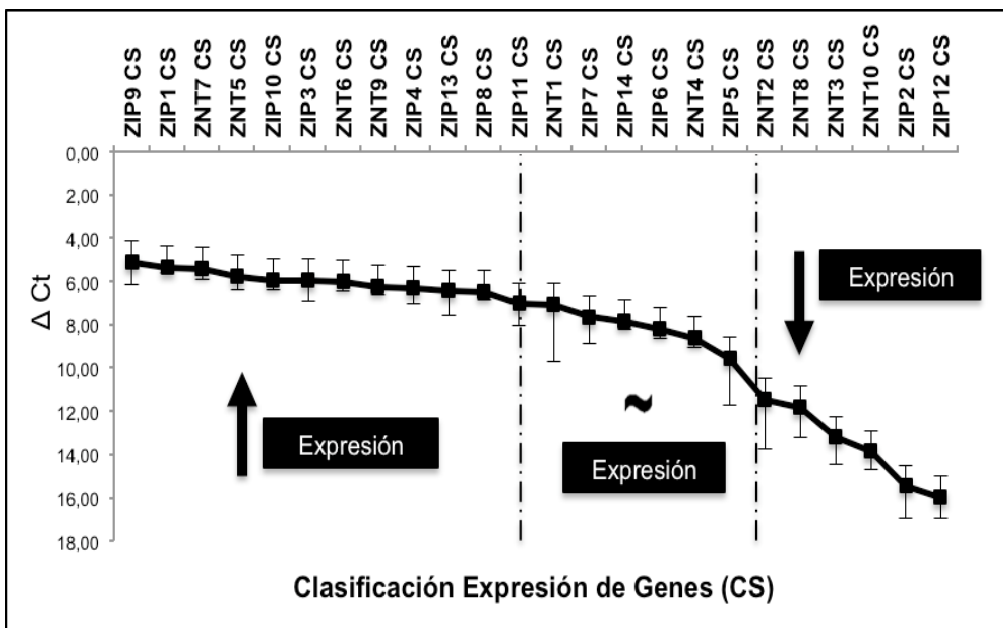


Figura 20. Clasificación de los transportadores de Zn en función del grado de expresión en la muestra total (mayor a la izquierda; menor a la derecha) según los valores ΔC_t en el CS.

7.3.5. Estudio de correlación del Zn con otros parámetros.

El presente apartado muestra los resultados del estudio de asociación entre los parámetros estudiados tras el análisis bivalente de Pearson tanto en el CI como en el CS.

La tabla XVIII muestra correlaciones encontradas entre los parámetros relacionados con el Zn y el resto de parámetros. Entre los resultados obtenidos, podemos destacar las correlaciones encontradas entre la ingesta de Zn y los transportadores ZIP13 ($r = 0.62$; $p < 0.05$) y ZIP14 ($r = 0.69$; $p < 0.05$). Igualmente, los valores en plasma de Zn está correlacionado con el transportador ZIP 11 ($r = 0.82$; $p < 0.01$). No se encontró asociación significativa entre los valores de Zn en células sanguíneas y otros parámetros. En el CS, destaca la correlación encontrada entre los niveles de Zn en células sanguíneas con el transportador ZnT 7 ($r = 0.61$; $p < 0.05$).

	Parámetros relacionados con el Zn			
	CI		CS	
Ingesta Zn	ZIP 13 $r = 0.62^*$	ZIP 14 $r = 0.69^*$	-	-
Zn (Plasma)	ZIP11 $r = 0.82^{**}$	-	Hematíes $r = 0.64^*$	-
Zn (Células)	-	-	ZNT7 $r = 0.61^*$	-
SOD	Plaquetas $r = 0.69^*$	-	-	-

$p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$

Tabla XVIII. Estudio de correlación bivalente entre los parámetros relacionados con el Zn.

A continuación se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de correlación (Tabla XIX) entre los distintos transportadores de Zn.

	Transportadores de Zn			
	CI		CS	
ZnT1	-	-	ZIP3 $r = 0.62^*$	-
ZnT4	ZnT5 $r = 0.64^*$	-	-	-
ZnT5	ZnT4 $r = 0.64^*$	-	ZnT6 $r = 0.78^{**}$	ZIP3 $r = 0.83^{**}$
	-	-	ZIP6 $r = 0.85^{**}$	-
ZnT6	-	-	ZnT5 $r = 0.78^{**}$	ZIP3 $r = 0.66^*$
	-	-	ZIP6 $r = 0.93^{**}$	-
ZnT7	ZIP3 $r = -0.67^*$	ZIP5 $r = -0.62^*$	-	-
ZIP3	ZnT7 $r = -0.67^*$	ZIP5 $r = 0.69^*$	ZnT1 $r = 0.62^*$	ZnT5 $r = 0.83^{**}$
	-	-	ZnT6 $r = 0.66^*$	ZIP5 $r = 0.67^*$
	-	-	ZIP6 $r = 0.72^*$	-
ZIP4	-	-	ZIP5 $r = 0.73^{**}$	ZIP9 $r = 0.68^*$
ZIP5	ZnT7 $r = -0.62^*$	ZIP3 $r = 0.69^*$	ZIP3 $r = 0.67^*$	ZIP4 $r = 0.73^{**}$
	-	-	ZIP8 $r = 0.61^*$	-
	ZIP8 $r = 0.65^*$	-	-	-
ZIP6	-	-	ZnT 5 $r = 0.85^{**}$	ZnT 6 $r = 0.93^{**}$
	-	-	ZnT 9 $r = 0.86^*$	ZIP12 $r = -0.88^*$
ZIP7	-	-	ZnT 2 $r = -0.76^*$	ZnT 10 $r = 0.82^*$
	-	-	ZIP 2 $r = -0.72^*$	-
ZIP 8	ZIP 5 $r = 0.65^*$	-	ZnT 1 $r = 0.66^*$	ZIP 5 $r = 0.61^*$
ZIP9	ZIP10 $r = 0.79^{**}$	-	ZIP 4 $r = 0.68^*$	-
ZIP10	ZIP9 $r = 0.79^{**}$	-	-	-
ZIP14	-	-	ZIP 9 $r = 0.67^*$	-

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Tabla XIX. Estudio de correlación bivalente entre los transportadores de Zn.

Capítulo 8

Discusión de los Resultados

8. DISCUSIÓN.

El presente trabajo forma parte de un proyecto general que trata de estudiar el estatus de distintas vitaminas y minerales y sus requerimientos, en deportistas de élite. Para ello, se ha realizado una evaluación del estatus nutricional inicial y posteriormente, una vez conocida la situación de cada uno de los micronutrientes en el individuo, abordamos de manera aislada cada micronutriente con la finalidad de evaluar la respuesta ante una suplementación. El objetivo final es recoger información sobre las necesidades de micronutrientes en este deporte, evitando posibles deficiencias.

En referencia a los resultados de ingesta, es de gran dificultad observar correlaciones con los valores bioquímicos, ya que existen múltiples factores que dificultan valorar el estado real de los sujetos, como por ejemplo el día de la toma de la muestra biológica, la ingesta previa realizada a corto y medio plazo, el estado de salud general y otras condiciones relacionados con el estilo de vida, así como de otros factores que afecten al equilibrio de los nutrientes a nivel orgánico, como la cantidad de ejercicio realizado.

Respecto a los parámetros bioquímicos es sabido que todas las medidas biológicas conllevan cierto error cuya identificación es fundamental en la interpretación de los resultados. La valoración bioquímica como se menciona en el apartado de antecedentes, puede verse afectada por la distribución compartimental del Zn a través de los distintos tejidos en respuesta al ejercicio, puede alterar los valores normales.

Con el estudio realizado sobre los transportadores de Zn, queremos tratar de determinar si la intervención realizada tiene como resultado un cambio en la expresión de los distintos transportadores en respuesta a la intervención.

8.1. Valoración Antropométrica.

Los resultados obtenidos en la valoración antropométrica, mostraron valores normales en referencia al porcentaje graso de los deportistas. Cenk y col.,²⁰⁴ y Gorostiaga y col.²⁰⁵ encontraron valores antropométricos similares en jugadores de la balonmano de alto nivel los obtenidos en nuestro estudio

En este contexto, el somatotipo es uno de los parámetros más aceptables y completos para ofrecer información completa sobre el perfil antropométrico de los deportistas, combinando la masa grasa, masa muscular, así como la linealidad de corporal.³⁸ Existen estudios que han analizado el somatotipo en deportes de equipo como el baloncesto²⁰⁶ o el balonmano.²⁰⁷

La siguiente somatocarta muestra los resultados obtenidos en los dos controles realizados. La disminución significativa obtenida en el componente endomórfico de los deportistas, tuvo como resultado una disminución en el porcentaje de grasa corporal aunque no significativo. La fuerza y la potencia en este tipo de deportistas unido a un porcentaje graso, relativamente bajo, es característico de deportes como el baloncesto, voleibol, balonmano.

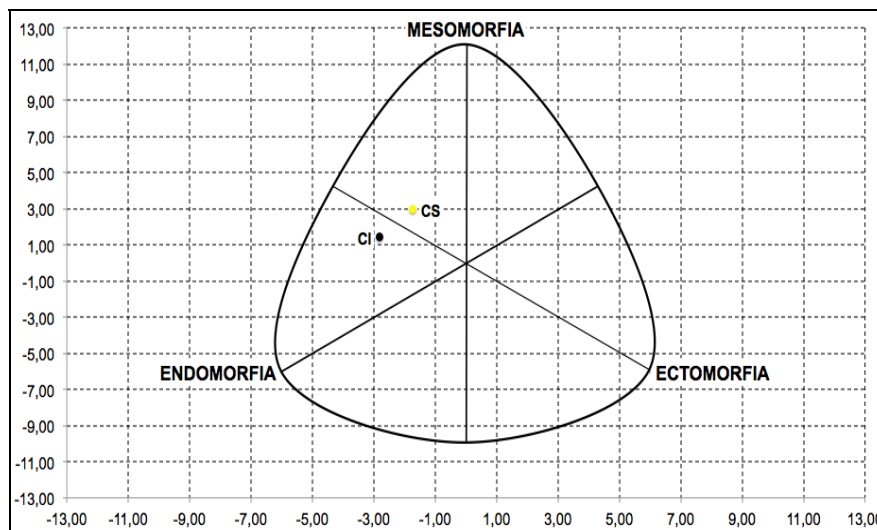


Figura 21. Somatotipo medio resultante en el CI y CS.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Bayios y col.³⁶ se muestra cómo nuestros resultados se sitúan dentro de los de la zona de dispersión referente al somatotipo identificado en jugadores de balonmano.

A lo largo del periodo competitivo, existen fluctuaciones a nivel antropométrico, que hacen que se produzca un aumento y disminución del rendimiento como consecuencia de ello. Aunque las mediciones antropométricas es el método más utilizado en la literatura, los estudios examinan la validez y fiabilidad de las mediciones. Hay que acentuar que todas las mediciones antropométricas fueron

realizadas según el protocolo ISAK,³⁹ cumpliendo criterios en los que no debía existir un error superior al 5% en los pliegues y al 1% para el resto de parámetros antropométricos.

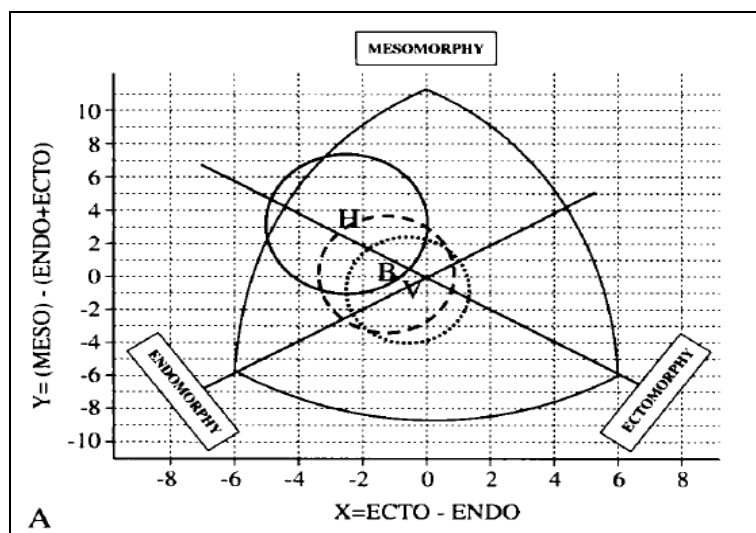


Figura 22. Dispersión del somatotipo en diferentes deportes de equipo;³⁶ H = Balonmano; B = Baloncesto; V = Voleibol.

8.2. Valoración de ingesta de macronutrientes y Zn.

La metodología empleada en la recogida de datos de ingesta nos aporta datos de consumo de alimentos. Los trabajos que existen referentes al análisis de ingesta en poblaciones, generalmente se realizan con recogida de datos por recordatorio de consumo de alimentos durante las 24-48 horas anteriores, lo que aporta información de ingesta de nutrientes a muy corto plazo, haciéndolo menos “real” en cuanto a reservas de Zn en células sanguíneas, por ejemplo. En nuestro caso se hizo este cuestionario retrospectivo evaluando un total de 72h. En un estudio previo publicado por nuestro grupo,²⁰⁸ en el que evaluamos la ingesta explicamos la elección 72 horas para evaluar la ingesta.²⁰⁹

Se sabe que el estudio de la ingesta de un grupo de individuos en términos de consumo de alimentos y nutrientes, no aporta elementos definitivos sobre el estado nutricional de los mismos. Existen una serie de mecanismos físicos, bioquímicos y fisiológicos que determinan la concentración de nutrientes en el alimento que se ingiere, así como en la absorción de los mismos, que está a su vez influida por la

presencia de otros nutrientes, metabolitos o antimetabolitos, al igual que su utilización, almacenamiento y excreción.

Los atletas necesitan consumir suficiente energía para mantener peso adecuado y preservar una composición corporal equilibrada.^{7,8} Una ingesta inadecuada de energía en relación al gasto de energía compromete el rendimiento y la obtención de beneficios en el entrenamiento. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, muestran una ingesta de energía y CHO por debajo del 100% de la RDA para cada uno. La ingesta de Zn, se situó por debajo del 100% del la RDA para este mineral en población sana, en el CI. La suplementación con Zn aumentó significativamente la ingesta de este mineral, alcanzando el 100% de la RDA en el CS.

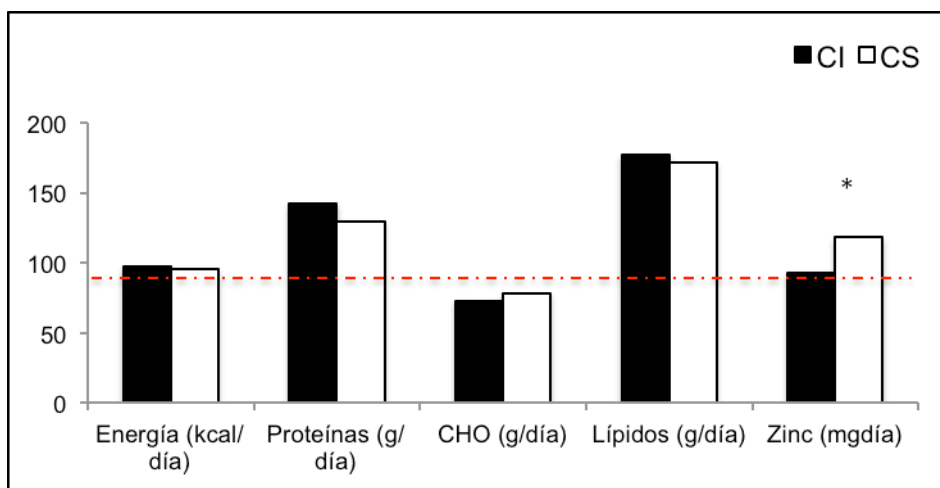


Figura 23. Adecuación de ingesta de macronutrientes y Zn en el CI y CS.

Holway y Spriet,²⁶ en su revisión realizada en deportes de equipo, obtiene un porcentaje de la ingesta de CHO respecto al total de energía ingerida inferior a las recomendaciones que las ADA y el ACSM realizan,^{7,8} mientras que las ingestas grasa y la de proteínas fueron superior a la óptima. Estos resultados concuerdan con los nuestros ya que la ingesta de CHO se acercó a 50% de la energía total, en comparación con el 16.21 y el 18 % para la proteína y 36.53 y 35.93% de grasa (Figura 24).

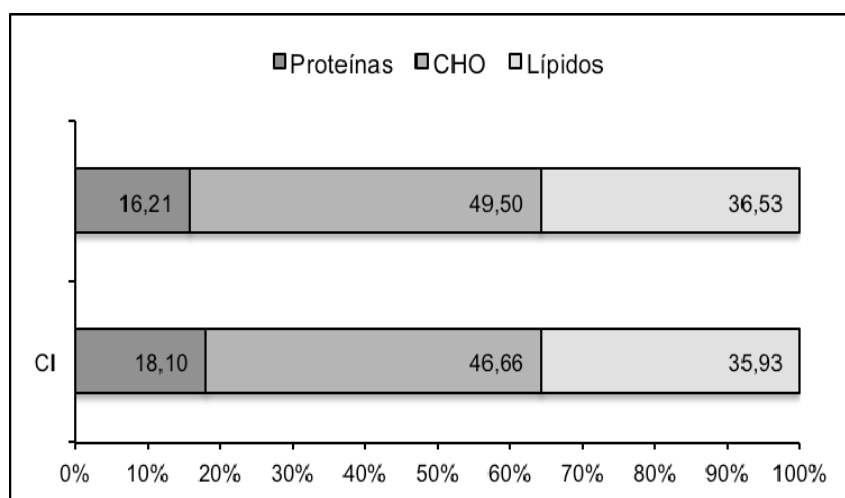


Figura 24. Adecuación de ingesta de macronutrientes en función de la energía consumida en el CI y CS.

De la totalidad de la muestra, el 50% y el 46% de los sujetos se situaron por debajo del 75% de la RDA propuesta por el ADA y el ACSM para la ingesta de CHO en deportistas.^{7,8} Estos resultados han sido ya descritos previamente en publicaciones anteriores donde esta misma población presentaba una ingesta de CHO deficitaria.²⁰⁸

En nuestro estudio, no se encontró que existieran sujetos con ingesta por debajo del 75% de la RDA para el resto de macronutrientes o para el Zn, teniendo en cuenta que en el caso del Zn la comparación la realizamos con valores de referencia en población sana.¹⁸

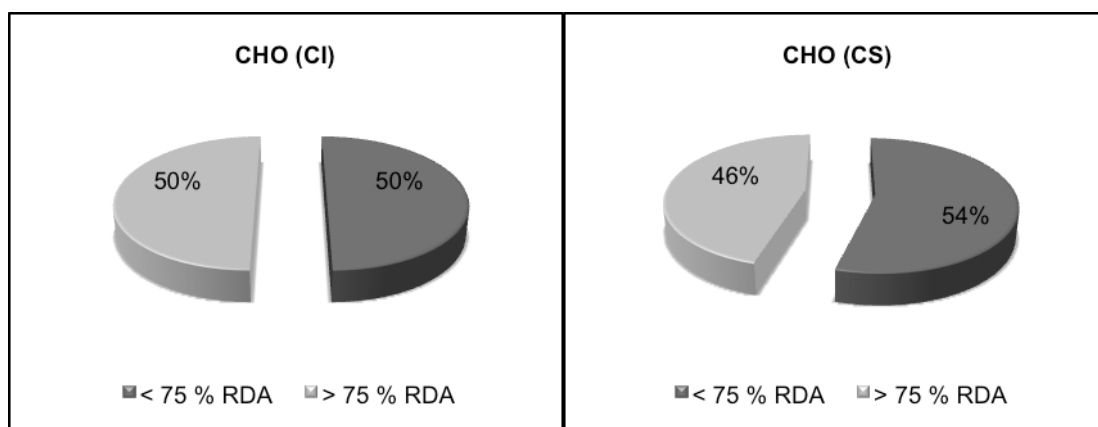


Figura 25. Porcentaje de sujetos con ingesta deficiente de CHO en el CI y CS.

Las principales causas de la deficiencia de Zn en deportistas son inadecuados los hábitos alimentarios y las pérdidas excesivas a través del sudor.⁶² Estudios en los que se determinaron la ingesta de Zn en atletas además de analizar el estatus de Zn en plasma y células, observaron que a pesar de ingerir Zn en cantidades adecuadas respecto a la ingesta dietética de referencia, presentaban una deficiencia de Zn en plasma y eritrocitos.²¹⁰

Es importante señalar para evaluar la ingesta dietética las ingestas recomendadas utilizadas fueron para la población deportista, en el caso de los macronutrientes, y para población adulta sana, en el caso del Zn.¹⁸ Debido a que las ingestas dietéticas de referencia para el Zn no se basa en la ingesta en deportistas, estas recomendaciones pueden no ser suficientes para satisfacer las necesidades de este grupo. Aunque las recomendaciones en macronutrientes ha sido bien establecidas,⁷ poco se sabe acerca de las necesidades de vitaminas y minerales.

8.3. Valoración bioquímica.

Para determinar el estado individual de Zn en poblaciones, generalmente se emplea su concentración en plasma a pesar de ser conocida que este elemento traza se encuentra principalmente dentro de la célula.⁵¹ El contenido de Zn en plasma está homeostáticamente regulado y se ve afectado por factores como el ritmo diurno, el estrés, infección, el hambre, los niveles de proteína de plasma, que hacen que la valoración bioquímica de los niveles plasmáticos de Zn no sean considerados como un fiel reflejo del estado de Zn.

8.3.1. Parámetros clínico-nutricionales.

Los valores obtenidos correspondientes a los parámetros bioquímicos clínicos analizados en la tabla 13, mostró valores normales dentro de los márgenes establecidos para población adulta sana, tanto en el CI como en el CS.

8.3.2. Zn en plasma y células sanguíneas

Las valores de Zn en plasma más ampliamente extendidos como referencia son 75-125 µg/dL (0.07-0.12 mg/dL).²¹¹ Teniendo en cuenta estos valores, podemos observar que en nuestro estudio existió un 33% de sujetos con estatus deficiente de este mineral. La siguiente gráfica muestra los valores medios presentes en cada control con respecto al rango de referencia propuesto por Prasad.²¹¹

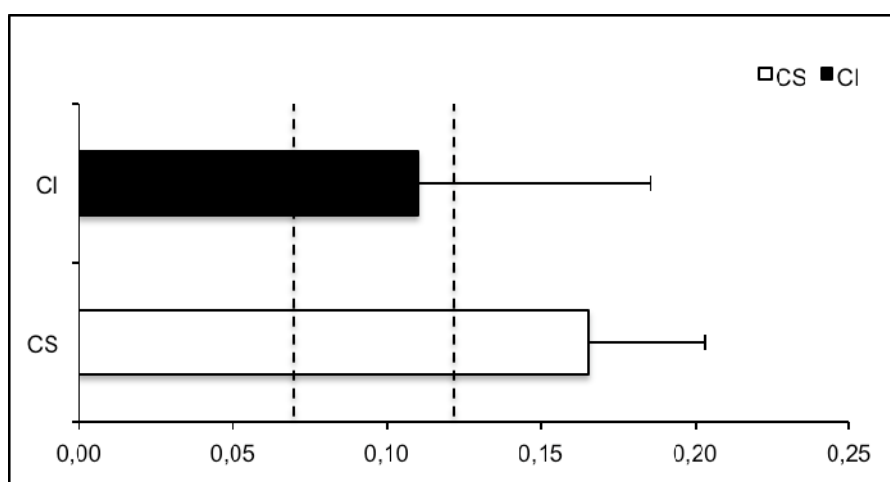


Figura 26. Contenido de Zn en plasma de Zn en CI y CS.

El ejercicio puede tener un efecto directo sobre los niveles bioquímicos de Zn. A nivel plasmático se ha descrito un aumento de los valores de Zn como resultado de su liberación desde músculo al fluido extracelular consecuencia del daño muscular producido durante el ejercicio.²¹² Córdoba y Álvarez⁶¹, informaron que la concentración de Zn muscular disminuyó como consecuencia de una baja concentración de Zn plasmático en atletas. Como el Zn interviene en la estructura de numerosas enzimas metabólicas, una deficiencia severa de Zn podría tener un impacto desfavorable en las funciones musculares. Por tanto, un bajo nivel de Zn muscular en consecuencia podría reducir la capacidad de resistencia.⁶²

En nuestro estudio, realizamos las extracciones de sangre tras 12 horas posteriores al ejercicio. No tenemos como objetivo evaluar la respuesta inmediatamente después del ejercicio, sino evaluar los valores en reposo ante continuas sesiones de entrenamiento y competición para ver si el estatus real (ya estabilizado compartimentalmente) es deficiente o se sitúa dentro de la normalidad.

Esto viene confirmado por un estudio realizado por Baltaci y col.¹⁴² donde se observan fluctuaciones en los valores plasmáticos de Zn a distintos tiempos después del ejercicio, siendo necesario esperar a que se produzca la redistribución compartimental.

A largo plazo, se ha informado que en corredores los niveles plasmáticos de Zn en reposo, suelen ser más bajos en comparación con los controles sedentarios (revisado⁶¹). Esto podría indicar la existencia de un estado deficitario en Zn no asociada a manifestaciones clínicas, debido a una ingesta de Zn inadecuada en la dieta. Esta afirmación puede confirmar nuestros resultados, ya que el ejercicio a largo plazo que realizan nuestros jugadores durante la temporada, puede provocar su deficiencia a nivel plasmático.

Como se mencionó en el apartado de resultados, el 33.33% de los sujetos presentaron valores deficientes de Zn en el CI, alcanzando valores normales en los niveles de Zn el 100% de los sujetos tras la suplementación (Figura 27). Esto podría indicarnos cómo la suplementación ha ayudado a corregir estos valores deficientes en plasma. Giolo y col.²¹⁰ encontraron bajos niveles de Zn en deportistas, indicando una posible deficiencia de Zn de origen nutricional, sugiriendo la necesidad de llevar a cabo estudios de suplementación en deportistas previamente diagnosticados deficientes en Zn.

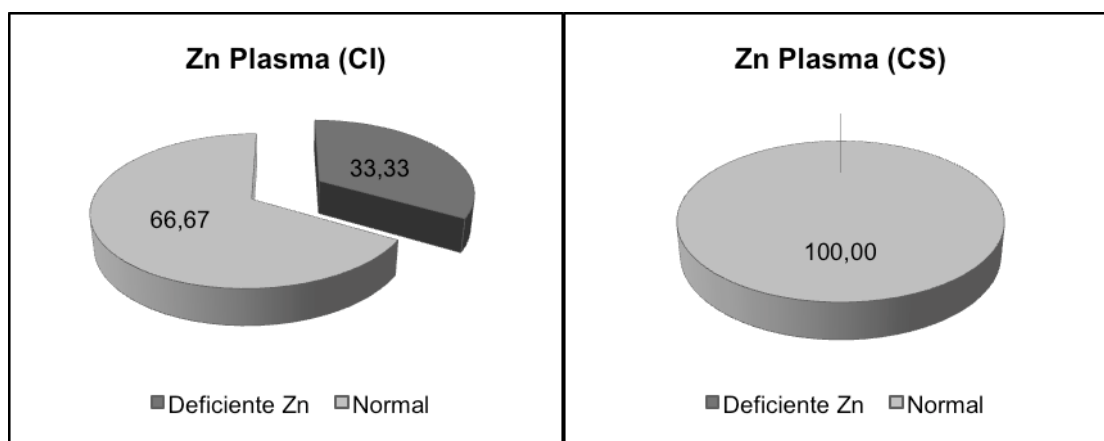


Figura 27. Porcentaje de sujetos con deficiencia de Zn en plasma en CI y CS.

Se ha descrito que el ejercicio intenso puede aumentar las pérdidas de Zn como consecuencia de un aumento en la sudoración, un aumento de la degradación de proteínas musculares en atletas que entrenan de forma continua, y mediante

pérdidas urinarias (revisado⁶¹). En estos casos, es aconsejable, previa evaluación del estatus, una suplementación con Zn que normalice los niveles de este mineral.

La figura 28 muestra los valores de Zn en células sanguíneas correspondientes a la suma del contenido de Zn repartido en cada uno de los compartimentos celulares sanguíneos: eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

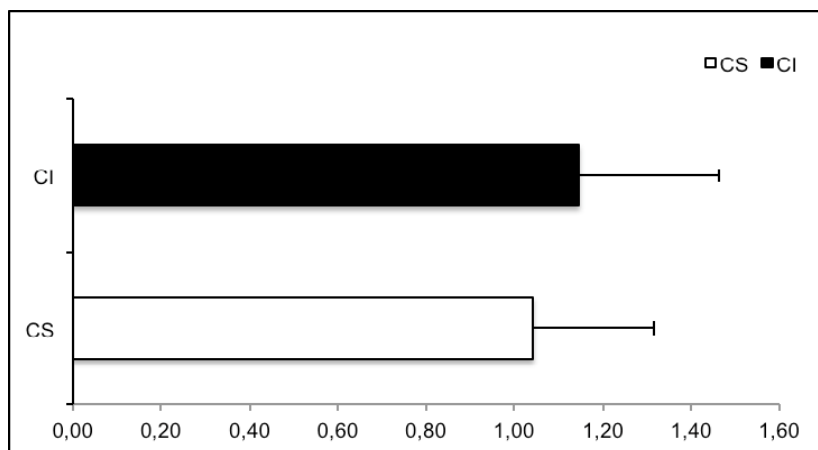


Figura 28. Contenido de Zn en células sanguíneas de Zn en CI y CS.

En la figura 29, observamos la distribución de Zn por cada compartimento sanguíneo, pudiendo observar que en el CI el 93.2% del Zn se encuentra en las células sanguíneas y un 6.71% en plasma. Estos valores cambian en caso del CS, de manera que el 88,4% del Zn se encuentra células sanguíneas mientras que en plasma llega a un 11,6% en el punto final.

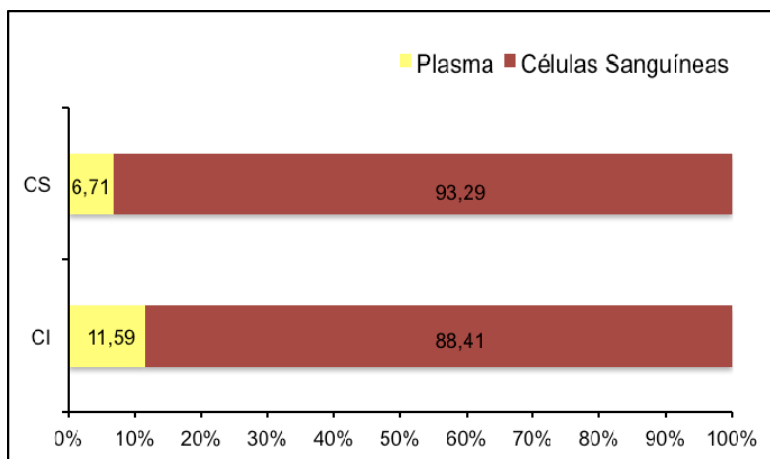


Figura 29. Porcentaje de Zn en los diferentes compartimentos sanguíneos.

8.3.3. Evaluación Hematológica.

Según los resultados obtenidos expresados en la tabla 15 del apartado de resultados, correspondiente al hemograma y fórmula leucocitaria, podemos observar que en general los deportistas muestran valores medios normales para todos los parámetros tanto en el CI como en el CS.

8.3.4. Expresión génica de los transportadores de Zn.

El análisis de la expresión génica realizado, forma parte de un estudio novedoso realizado en población deportista. En la actualidad, no existen estudios que analicen la expresión de los transportadores de Zn en esta clase de colectivo. Como se ha comentado en el apartado de antecedentes del presente trabajo, los transportadores analizados han sido los relacionados con el Zn (SLC30 y SLC39). En nuestro estudio, el análisis de estos transportadores de Zn nos sirvió para determinar cuál de los 24 transportadores conocidos en la actualidad, se encuentra en tejido sanguíneo humano. Hasta el momento, no hay evidencia exacta sobre la distribución de estos transportadores en sangre en población general o en deportistas.

Inicialmente, nuestra hipótesis plantea que los jugadores de élite presentan ingestas de micronutrientes inadecuadas, que derivan en situaciones de deficiencia y de bajos niveles de antioxidantes, alterando el estatus del resto de micronutrientes y su distribución compartimental, además de empeorar el rendimiento y la calidad de

vida del deportista de élite. Nuestra intervención viene justificada por el hecho de que los transportadores puedan influir sobre la redistribución en tejidos desequilibrando el estatus de este mineral. Además, debido a que los valores de Zn plasmático y celular pueden verse afectados en procesos de inflamación e infección aguda, u otros factores, se podría desencadenar una fluctuación tal de los niveles, que no reflejara los depósitos tisulares reales. El estudio de transportadores de Zn, por tanto, podría reflejar el estatus de este mineral en sangre en situaciones concretas.

Los resultados obtenidos del estudio comparativo en la evolución de expresión de transportadores antes y después de la suplementación con Zn, se muestran en el heat map (Figura 30). En rojo se muestran las mayores expresiones de transportadores, observándose que la intensidad de color va disminuyendo hasta llegar al negro, donde se considera que el gen probablemente no se expresa.

En el heat map se observa cómo en el CI, los transportadores que se expresaron menos o no se expresaron fueron ZnT2, ZnT3, ZnT8, ZnT10, ZIP2, ZIP 5 y ZIP 12, mientras que ZnT7, ZIP1 y ZIP9 fueron los transportadores que más se expresaron. En el CS, los genes que se expresaron menos o no se expresaron fueron ZnT3, ZnT10, ZIP2 y ZIP 12, mientras que ZnT7, ZIP1 y ZIP9 fueron los transportadores que más se expresaron.

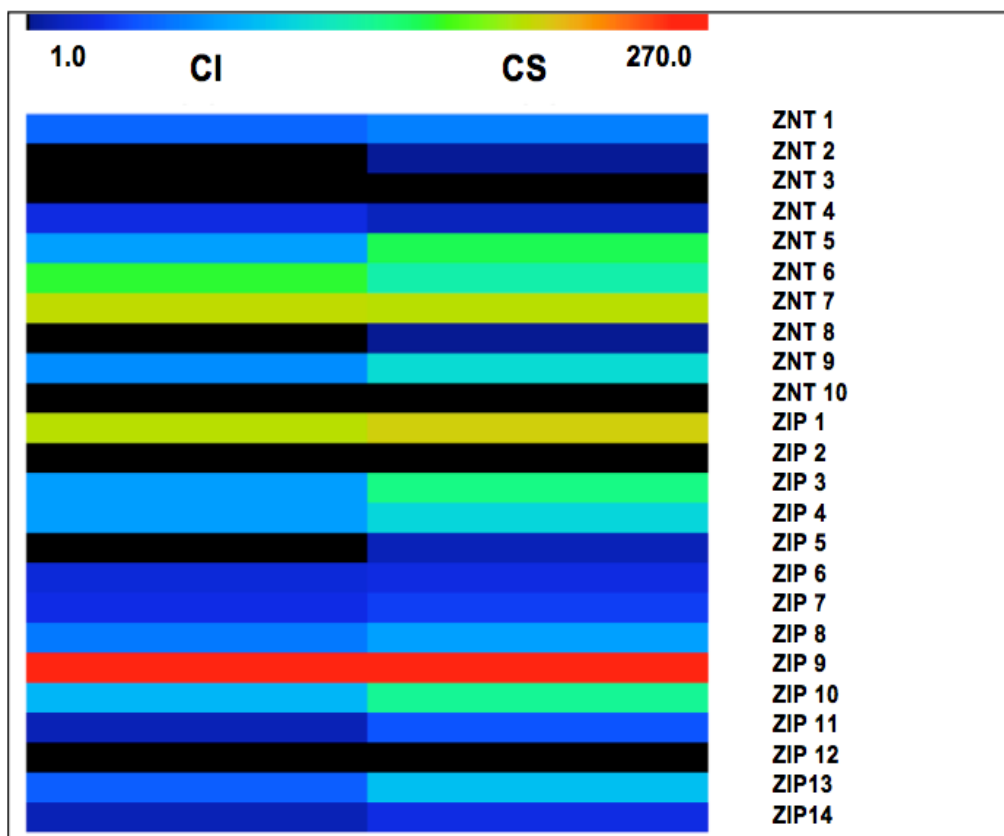


Figura 30. Heat map en el CI (en la columna de la izquierda) y CS (en la columna de la derecha).

En un estudio realizado en ratas por Song y col.²¹³ se observa una falta de expresión de los transportadores ZnT3 y ZIP2. Debido a la localización mayoritaria del transportador ZNT3 (cerebro y los testículos),²¹⁴ ello justifica la ausencia de expresión obtenida de este transportador en nuestro estudio. Con respecto al transportador ZIP12, observamos que no se obtuvo expresión de este gen en el heat map. No hay otra estructura, función o información disponible sobre el transportador ZIP12, al igual que con el transportador ZnT10, del que se sabe juega un papel importante en la homeostasis de Zn durante el desarrollo fetal.¹⁵³ Según la literatura, nuestros resultados afirman lo encontrado por otros autores en referencia al transportador ZIP2, en los que se describe una expresión muy baja, estando muy limitada a determinados tejidos como próstata, útero, epitelio cervical, nervio óptico (revisado¹⁵⁵).

En general, ZnT2 no se expresa por igual en los todos los tejidos. Su expresión está restringida a los tejidos con requerimientos únicos en Zn, como el intestino delgado, riñón, la retina, la placenta, el páncreas, la glándula mamaria, los testículos, la vesícula seminal y la próstata.¹⁵³ El descenso de este transportador se ha asociado

a la ingesta de Zn, encontrando que en ratas deficientes en dicho mineral, disminuye su expresión. En nuestro estudio de suplementación, no encontramos cambios significativos en la expresión de ZnT2.²¹³

El transportador ZnT7, desempeña un rol crucial en absorción del Zn en el tracto gastrointestinal,¹⁵⁸ además de mantener la homeostasis celular del Zn y poder participar en la regulación de la composición corporal.¹⁵³ Hay evidencias de que ZnT7 se encuentra en las células sanguíneas.¹⁸⁹ La alta expresión encontrada en nuestro estudio, puede sugerir, que debido a la suplementación, este transportador se pudo ver incrementado. Sin embargo, no existieron cambios significativos tras la suplementación. Quizás, la amplia variedad de tejidos en los que se encuentra este transportador,^{154,155,168} hicieron que su expresión fuera mayor a la de otros transportadores.

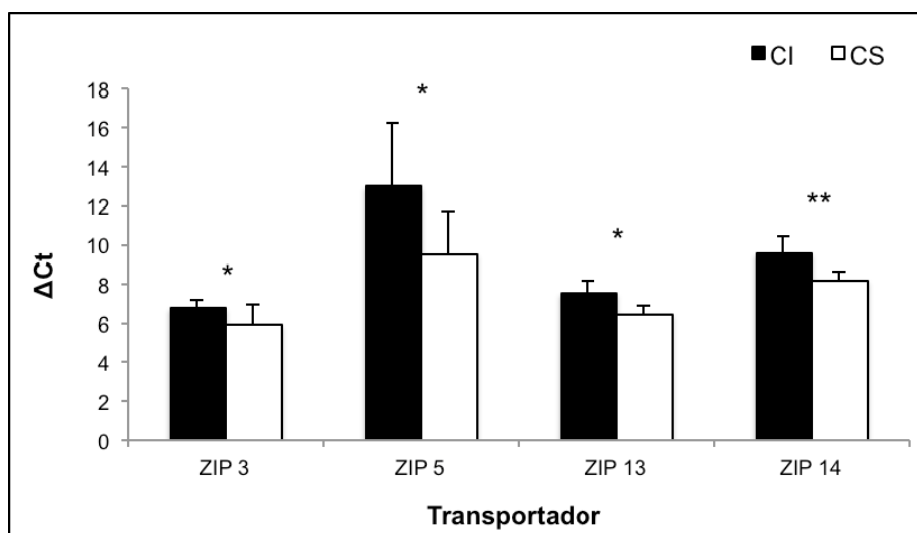
La homeostasis de Zn en las células depende del transporte de Zn en ambas direcciones a través de la membrana plasmática, así como tanto dentro como fuera de los diversos compartimentos vesiculares. La familia SLC39 incluye proteínas que facilitan el transporte de Zn en la dirección opuesta a la familia SLC30. Por ejemplo, los transportadores ZIP1 y ZIP2 facilitan la absorción de Zn dentro de la célula entrando en competencia con la salida de Zn a través del transportador ZnT1.¹⁵⁴ En nuestro estudio, observamos que el transportador ZnT1 está bajo expresado. Por otro lado, el transportador ZIP2 no se expresó en ningún caso. Existe un estudio que demuestra que en las células mononucleares de la sangre periférica la expresión del Zip 2 se incrementa.¹⁵⁵

En referencia a la familia de transportadores SLC39, observamos como el ZIP1, se encontró altamente expresado. Este transportador se encuentra expresado en varios tejidos,^{176,177} estando poco expresado bajo concentraciones aumentadas de Zn. En nuestro estudio ocurre justo lo contrario, ya que un tercio de los deportistas presentaron niveles deficientes de Zn en plasma.¹⁷⁸ Se ha descrito que este transportador puede ser utilizado como biomarcador del estatus de Zn en humanos.¹⁷⁸

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, mostraron como los transportadores ZIP3, ZIP5, ZIP13 y ZIP14 aumentaron significativamente su expresión tras la intervención con Zn (Figura 31). El transportador ZIP3, ha sido previamente localizado en células sanguíneas y además, tal y como se describe en la literatura, ante situaciones de deficiencia tiende a sobre-expresarse al igual que ocurre también con el ZIP5.¹⁵³ El hecho de que estos transportadores no disminuyan su

expresión tras el CS, nos podría indicar que no se han alcanzado aún tras la suplementación, los niveles óptimos para la demanda de este mineral en los deportistas estudiados.

El transportador ZIP14, se ha encontrado asociado a citoquinas inflamatorias IL₆ y TNF- α .¹⁹⁶ Lang et col.,¹⁸⁰ igualmente, demuestran que los niveles de ZIP14 aumentan con inflamación aguda, por lo que los resultados obtenidos en nuestro estudio, pueden sugerir, que debido a los procesos inflamatorios producidos por la actividad intensa continuada y a largo plazo, podrían desencadenar un aumento en la expresión de este transportador.



* p < 0.05; ** p < 0.001

Figura 31: Expresión de transportadores de Zn en el CI y CS.

La relación encontrada entre el transportador ZIP13 tanto con la baja ingesta, como con los mayores valores plasmáticos de Zn, nos hace pensar en la situación particular en la que se activa la expresión de este transportador en situación de deficiencia de Zn, viéndose sobre-expresado en los individuos que menores ingestas presentaban así como en los que mostraron niveles mayores del mineral en plasma.

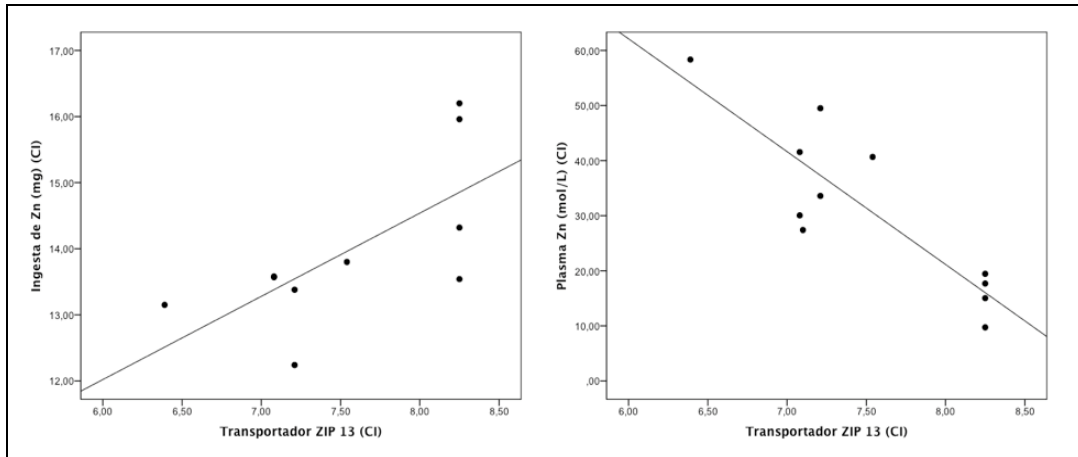


Figura 32. Asociación entre el transportador ZIP13 y la ingesta de Zn y los valores plasmáticos en CI.

La relación encontrada entre el transportador ZIP14 y los valores de Zn en células sanguíneas, indica que un aumento en el contenido de Zn celular, tiene como resultado un descenso en la expresión de este transportador.

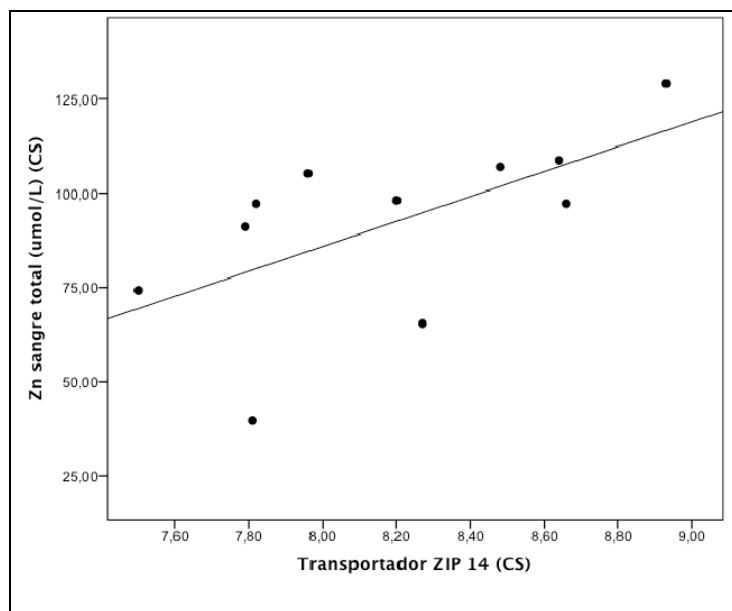


Figura 33. Asociación entre el transportador ZIP14 y los valores de Zn en células sanguíneas en CS.

Existieron dos transportadores (ZIP4 y ZIP11) que aunque aumentaron la expresión durante el periodo CS, no llegaron a cambiar de manera significativamente diferentes (Figura 34) ($p = 0.054$ y $p = 0.092$, respectivamente). El transportador ZIP4,

se sabe que desempeña un rol importante en la absorción intestinal y en la homeostasis del Zn en seres humanos.^{182,183}

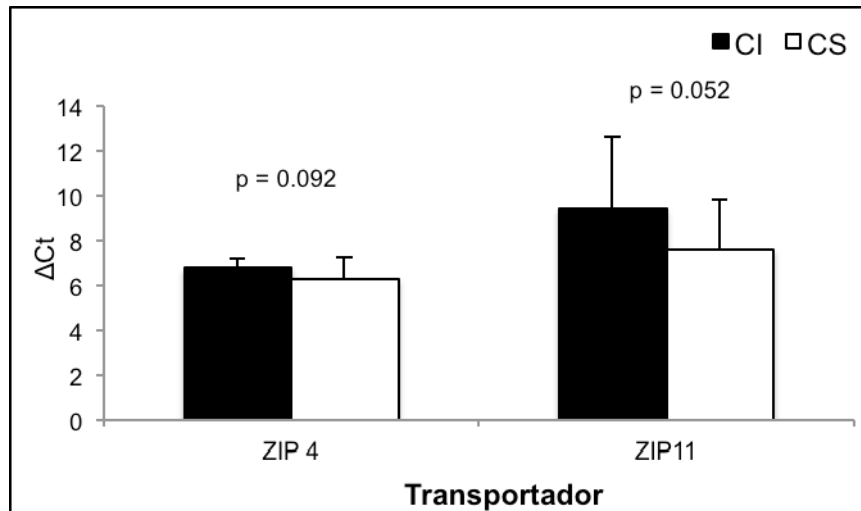


Figura 34: Expresión de transportadores de Zn ZIP4 y ZIP11 en el CI y CS.

En la literatura existe poca información sobre el transportador ZIP 9. Ciertos autores indican que en la literatura, encontrándose altamente expresado en nuestro estudio.¹⁵³

El transportador ZIP10, mostró estar correlacionado positivamente con los niveles de Zn en células sanguíneas en el CI. Esto indica que los sujetos que tuvieron mayores valores de Zn en células sanguíneas, tuvieron una menor expresión del transportador ZIP10. En estatus deficiente de Zn se sabe que este transportador tiende a sobre-expresarse, sin embargo en este caso los valores de Zn en células sanguíneas y la expresión de este transportador, no podría confirmar los datos descritos en la literatura.¹⁵³

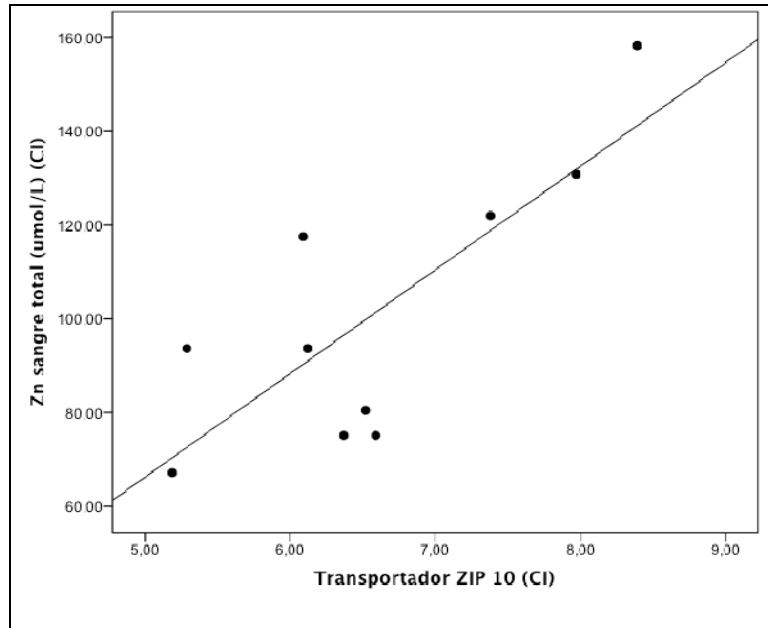


Figura 35. Asociación entre el transportador ZIP10 y los valores de Zn en células sanguíneas en CS.

En la figura 36, podemos ver que en resumen tras la suplementación con Zn, la expresión relativa de los transportadores ZnT4, ZIP2 y ZIP12 disminuyó. Existieron varios transportadores (ZnT7, ZIP1, ZIP9) que se mantuvieron sin cambios en su expresión, cuando sin embargo, el resto de los transportadores se sobre-expresaron.

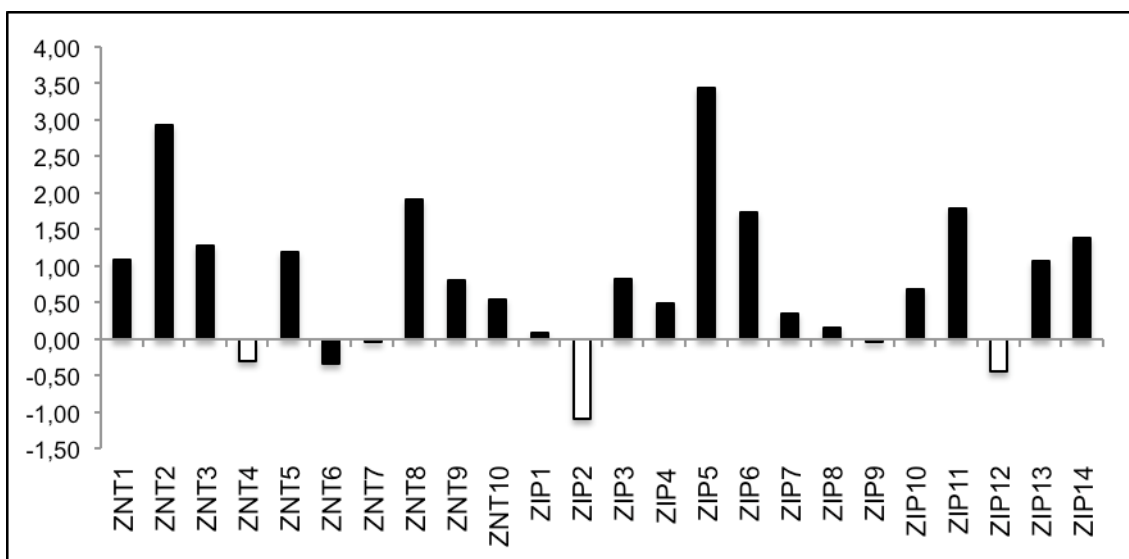


Figura 36. Expresión relativa de los transportadores en el CI y CS.

8.3.5. Estudio de correlación entre la expresión de los transportadores de Zn.

Las proteínas ZIP4 y ZIP5 son homólogos en un 30%.²¹⁵ En nuestro estudio, pudo observarse una correlación entre estos dos transportadores en el CS, quedando reflejada una estrecha relación entre ambos justo después de la intervención.

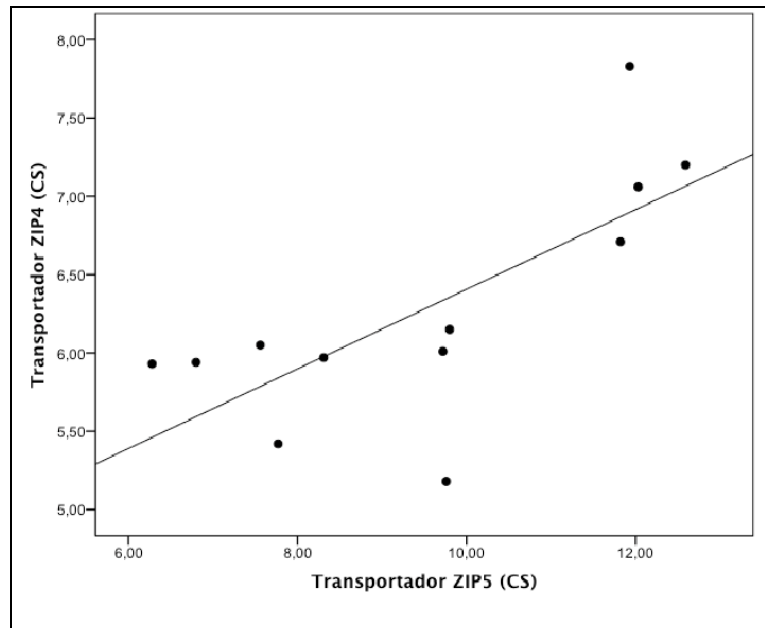


Figura 37. Asociación entre los transportadores ZIP4 y ZIP5 en CS.

Los transportadores ZIP3 y ZIP5, se encontraron asociados negativamente con el transportador ZnT7 en el CI. Esto podría justificar la relación directa entre la alta expresión del transportador ZnT7 en el CI, con la baja expresión de ZIP3 y ZIP5. Sin embargo, tras la suplementación con Zn la expresión del transportador ZnT7 no varió, mientras que en cambio los transportadores ZIP3 y ZIP5 aumentaron significativamente su expresión. No podemos confirmar una relación opuesta en cuanto a la expresión de estos transportadores.

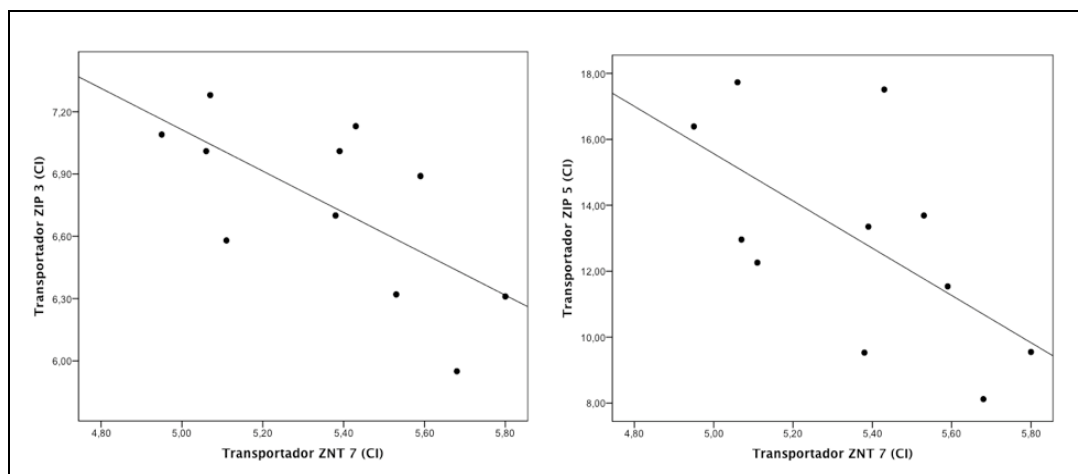


Figura 38. Asociación entre los transportadores ZnT7 y los transportadores ZIP3 y ZIP5 en CI.

Estos dos transportadores, el ZIP3 y ZIP5, se correlacionaron positivamente en ambos controles, indicando que el aumento en la expresión de uno, está relacionado con el aumento de expresión del otro.

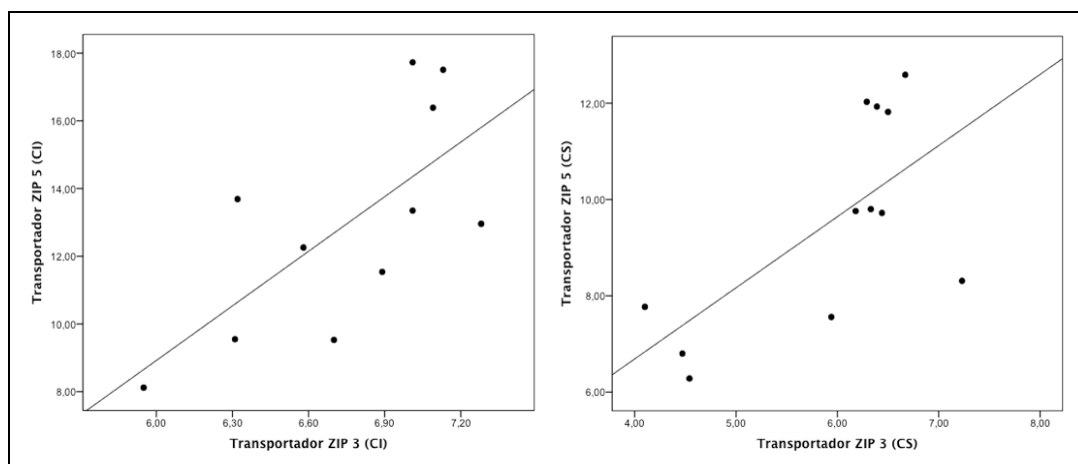


Figura 39. Asociación entre los transportadores ZIP3 y ZIP5 en CI y CS.

Esto quiere decir que tanto antes como después de la suplementación, ambos se expresaron de igual manera, aunque tal y como se puede ver en la figura 40, los cambios de la expresión del transportador ZIP5 fue mayor a la del transportador ZIP3.

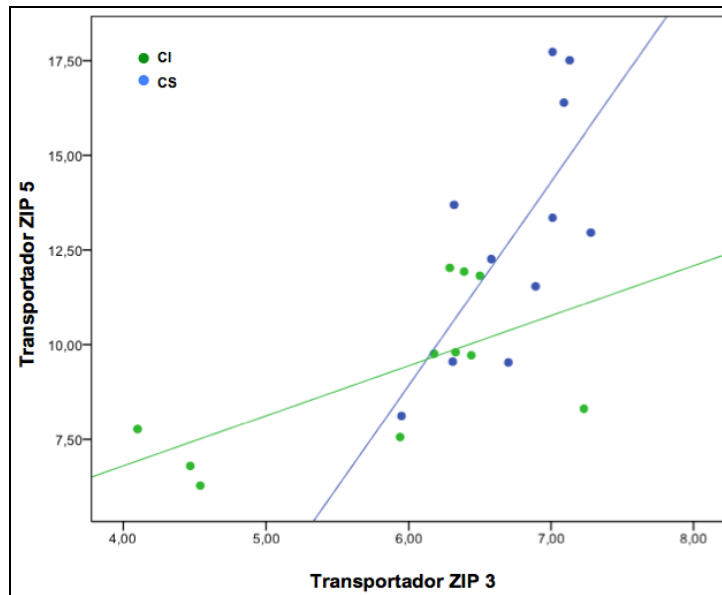


Figura 40. Asociación entre los transportadores ZIP5 y ZIP3 en CI y CS.

ZnT5 y ZnT6 regulan la absorción de Zn en la dieta. Interactúa con ZnT6 para formar un complejo que puede transportar el Zn en la vía secretora.¹⁶⁴ Hay evidencias de que los transportadores ZnT5 y ZnT6 se encuentran en las células sanguíneas.¹⁸⁹ En nuestro estudio, encontramos como tras la suplementación con Zn, existió una correlación entre los transportadores ZnT5 y ZnT6 ($r = 0.78$ $p < 0.001$), sin embargo no se encontraron correlaciones con parámetros de ingesta o plasma, o células sanguíneas. Debido a la abundancia de tejidos en los que se encuentran,¹⁶³ la variación en la expresión es más fácil de detectar, observando una tendencia a un aumento significativo tras la intervención.

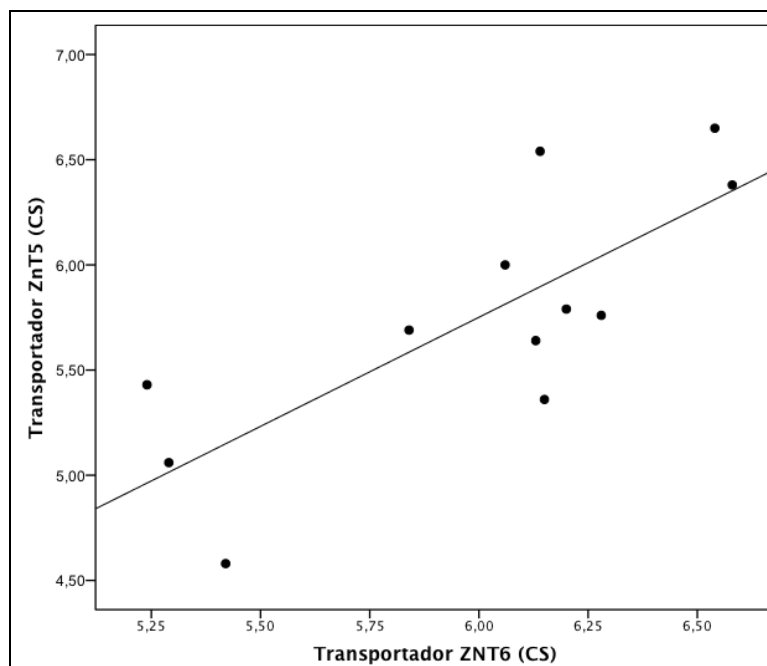


Figura 41. Asociaciones entre los transportadores ZnT5 y ZnT6 en CS.

Como resumen, podemos afirmar que la intervención mediante suplementación con Zn en los deportistas que forman parte del estudio, ha producido efectos significativos en la expresión génica de la mayoría de los transportadores de Zn presentes en las membranas celulares, promoviendo la movilización de este mineral hacia todos los compartimentos y favoreciendo su redistribución tisular para cubrir las demandas derivadas tanto del estatus deficiente del que parten los deportistas como del ejercicio de alta intensidad que realizan.

Capítulo 9

Conclusiones del Estudio

9. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO.

Respecto al programa de educación nutricional

De acuerdo con nuestros resultados, existe una tendencia a desequilibrios, por malos hábitos de consumo de alimentos, en la ingesta de nutrientes de los jugadores profesionales de balonmano estudiados. El programa de educación nutricional aplicado de manera continuada durante la competición con el fin de mejorar los hábitos de ingesta de alimentos, fue insuficiente para lograr un equilibrio, en cantidad y calidad, en el aporte de macro y micronutrientes, a pesar de la conducta disciplinada de esta población y el empleo de recomendaciones para población no deportista como referencia.

Respecto a la ingesta de nutrientes:

Según nuestros resultados, el 43%, 29 %, y el 33 % de los jugadores presentaba ingesta insuficiente de fólico, Mg y Zn inicial, respectivamente, lo que puede justificar la intervención realizada en nuestro estudio.

Respecto a la valoración bioquímica:

La suplementación con ácido fólico, según los resultados obtenidos, pudo prevenir los efectos de un aumento en las concentraciones de homocisteína en sangre, posiblemente asociado al aumento en el riesgo de alteración cardiovascular como resultado de la alta carga acumulada en las continuas sesiones de entrenamiento durante la temporada y la competición.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la suplementación con Mg tendió a preservar los cambios de este mineral durante el entrenamiento y la competición, y que durante la competición existió una asociación entre los niveles celulares de Mg y el Zn independientemente de la suplementación con Mg o la ingesta de Zn.

Nuestros resultados muestran que un tercio de los deportistas presentan deficiencia en Zn al inicio, alcanzando valores normales en los niveles de Zn el 100% de los sujetos tras la suplementación.

Respecto a la expresión génica:

Respuesta general de los Transportadores

En nuestro estudio los transportadores que presentan una expresión más elevada y constante en general, fueron ZNT7, el ZIP9, y el ZIP1, lo que puede confirmar la activación de procesos de regulación del Zn corporal durante el ejercicio intenso, independientemente de la suplementación realizada.

Efectos de la suplementación con Zn:

Los transportadores ZIP3, ZIP5, ZIP13 y ZIP14 aumentaron significativamente su expresión tras la intervención con Zn, posiblemente debido a la tendencia a sobre-expresión en situación deficiente, por lo que el hecho de que estos transportadores no disminuyan su expresión tras el periodo de intervención, nos podría indicar que no se han alcanzado aún los niveles óptimos para la demanda de este mineral en los deportistas estudiados.

Dado que los niveles de ZIP14 aumentan con la inflamación aguda, los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden sugerir, que debido a los procesos inflamatorios producidos por la actividad intensa continuada y a largo plazo, podrían desencadenar un aumento en la expresión de este transportador.

Correlación entre Transportadores con los niveles de Zn

La ingesta de Zn y los valores en células sanguíneas, se encontraron correlacionados positivamente con los transportadores ZIP11, ZIP13, ZIP14 al inicio del estudio, sugiriendo que una ingesta deficiente o unos valores bajos de Zn en células sanguíneas se asocian a unos valores de expresión más elevados, mientras que a mayores niveles de ingesta y de Zn en células sanguíneas, menores niveles de

expresión, lo que confirma el posible papel de este transportador como biomarcador del estatus de Zn en humanos.

Como resumen, podemos afirmar que la intervención mediante suplementación con Zn en los deportistas que forman parte del estudio, ha producido efectos significativos en la expresión génica de la mayoría de los transportadores de Zn presentes en las membranas celulares, promoviendo la movilización de este mineral hacia los compartimentos y favoreciendo su redistribución tisular para cubrir las demandas derivadas tanto del estatus deficiente del que parten los deportistas como del ejercicio de alta intensidad que realizan.

Conclusión final

Nuestra hipótesis plantea que los jugadores de élite presentan ingestas de micronutrientes inadecuadas, que derivan en situaciones de deficiencia y de bajos niveles de antioxidantes, alterando el estatus del resto de micronutrientes y su distribución compartimental, lo que empeoraría el rendimiento y la calidad de vida del deportista de élite.

El estudio de transportadores en el que se intervino con Zn viene justificado por su posible influencia sobre la redistribución en tejidos, desequilibrando el estatus de este mineral. Además, debido a que los valores de Zn plasmático y celular pueden verse afectados en procesos de inflamación e infección aguda, u otros factores, se podría desencadenar una fluctuación tal de los niveles, que no reflejara los depósitos tisulares reales. El estudio de transportadores de Zn, por tanto, podría reflejar el estatus de este mineral en sangre en situaciones concretas.

Es importante un ajuste de las recomendaciones de micronutrientes existentes en deportistas, estableciendo las cantidades precisas de minerales y vitaminas, dada su implicación en mecanismos básicos del equilibrio orgánico, aproximando dichos niveles a los requerimientos reales para la situación tan especial que representa el atleta élite, y monitorizando los niveles plasmáticos como posibles variables predictoras de alteraciones causadas por una deficiencia de las mismas.

Chapter 9 (English version)

Conclusions of the Study

9.1. CONCLUSIONS OF THE STUDY.

Regarding Nutrition Education Program

According to our results, there is a tendency to imbalances by bad food habits and therefore nutrient intake of the professional handball players studied. The nutrition education program continuously applied during the competition in order to improve food intake habits, was insufficient to balance quantity and quality in the provision of macro- and micronutrients, even know disciplined behavior from this population example and the use of a non-athlete population recommendations for reference.

Regarding nutrient intake:

According to our results, 43%, 29%, and 33% of the players had inadequate intake of folic acid, Mg and Zn, respectively, which may justify the intervention of our study.

Regarding biochemical assessment:

Folic acid supplementation, according to the results obtained, could prevent the effects of an increase in blood homocysteine concentrations, possibly associated with increased risk of cardiovascular disorders as a result of the high charge accumulated in ongoing training sessions during competition. Our results showed that one third of the athletes are initially deficient in Zn, reaching normal values in Zn levels for 100% of the subjects after supplementation.

Regarding gene expression:

In our study, the transporters that have a constant high expression were generally ZNT7, ZIP9, and ZIP1, which can confirm the activation of processes regulating body Zn during intense exercise, regardless of supplementation given.

Effects of supplementation with Zn:

Transporters ZIP3, ZIP5, ZIP14 ZIP13 have significantly increased their expression after intervention with Zn, possibly due to the tendency to over-expression in deficient status, so the fact that these transporters do not decrease its expression after the intervention period indicates not yet reached optimal levels of demand for this mineral in the athletes studied. Since ZIP14 levels increase with acute inflammation, the results obtained in our study may suggest that these processes are produced by continuous intense and long-term activity, provoking an increase in expression of this transporter.

Correlation between Transporters and Zn levels

Zn intake and blood cell values were found positively correlated with ZIP11 transporters, ZIP13, ZIP14, at baseline, suggesting that a deficient intake or low values of Zn in blood cells are associated with higher expression values, whereas at higher levels of Zn intake and in blood cells, lower expression levels, which confirms the potential role of this transporter status as a biomarker of human Zn.

In summary, the intervention by Zn supplementation in athletes studied, produced significant effects on gene expression of most Zn transporters present in the cell membranes to promote the mobilization of the mineral into the compartments and favoring tissue redistribution to cover claims arising from both the initial deficient status of athletes, and high-intensity exercise.

Final Conclusion

Our hypothesis is that elite players have inadequate intakes of micronutrients, which derived in situations of deficiency and low levels of antioxidants, alters status of other micronutrients and compartmental distribution, worsening the performance and quality of life. Furthermore, because the values of plasma Zn and cellular processes may be affected in acute inflammation and infection, or other factors, it could trigger a fluctuation at such levels that did not reflect actual tissue deposits. Study of Zn transporters thus may reflect the status of this mineral in blood in specific situations.

It is important to adjust the recommendations of micronutrient in athletes, establishing the precise intake amounts of minerals and vitamins, given their involvement in basic mechanisms of organic balance, approaching these levels to the actual requirements for the special situation that represents the elite athlete, and monitoring plasma levels as possible predictors of disorders caused by a deficient status.

Capítulo 10

Referencias bibliográficas

1. Ruiz, F. *et al.* Nutritional intake in soccer players of different ages. *J. Sports Sci.* 23, 235–242 (2005).
2. Hawley, J. A., Tipton, K. D. & Millard-Stafford, M. L. Promoting training adaptations through nutritional interventions. *J. Sports Sci.* 24, 709–721 (2006).
3. Farajian, P., Kavouras, S. A., Yannakoulia, M. & Sidossis, L. S. Dietary intake and nutritional practices of elite Greek aquatic athletes. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 14, 574–585 (2004).
4. Chen, J. D. *et al.* Nutritional problems and measures in elite and amateur athletes. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 1084–1089 (1989).
5. Brotherhood, J. R. Nutrition and sports performance. *Sports Med. Auckl. NZ* 1, 350–389 (1984).
6. Short, S. H. & Short, W. R. Four-year study of university athletes' dietary intake. *J. Am. Diet. Assoc.* 82, 632–645 (1983).
7. Rodriguez, N. R., Di Marco, N. M. & Langley, S. American College of Sports Medicine position stand. Nutrition and athletic performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 41, 709–731 (2009).
8. Rodriguez, N. R., DiMarco, N. M. & Langley, S. Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *J. Am. Diet. Assoc.* 109, 509–527 (2009).
9. Iglesias-Gutiérrez, E. *et al.* Food habits and nutritional status assessment of adolescent soccer players. A necessary and accurate approach. *Can. J. Appl. Physiol. Rev. Can. Physiol. Appliquée* 30, 18–32 (2005).
10. Pendergast, D. R., Meksawan, K., Limprasertkul, A. & Fisher, N. M. Influence of exercise on nutritional requirements. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 379–390 (2011).
11. Groussard, C., Machefer, G., Rannou, F. & Gratas-Delamarche, A. Évaluation de l'apport en vitamines antioxydantes chez des sportifs. *Sci. Sports* 19, 193–195 (2004).
12. Williams, C. Carbohydrate intake and recovery from exercise. *Sci. Sports* 19, 239–244 (2004).

13. Peters, E. M. Nutritional aspects in ultra-endurance exercise. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6, 427–434 (2003).
14. Ray, T. R. & Fowler, R. M. Current Issues in Sports Nutrition in Athletes. *J. Sept. 2004* 97, 863–866 (2004).
15. Grandjean, A. C. Macronutrient intake of US athletes compared with the general population and recommendations made for athletes. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 1070–1076 (1989).
16. Phillips, S. M. Dietary protein for athletes: from requirements to metabolic advantage. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31, 647–654 (2006).
17. Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A. A., Poos, M. & Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J. Am. Diet. Assoc.* 102, 1621–1630 (2002).
18. Mataix, J. *Alimentación y Nutrición Humana. Situaciones Fisiológicas y Patológicas*. 2, (Ergon, 2009).
19. Tong, T. K., Lin, H., Lippi, G., Nie, J. & Tian, Y. Serum Oxidant and Antioxidant Status in Adolescents Undergoing Professional Endurance Sports Training. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, (2012).
20. Willmore, J. & Costill, D. *Physiology of sport and exercise*. (Paidotribo, 2007).
21. Romijn, J. A. *et al.* Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 265, E380–E391 (1993).
22. Brouns, F. *Necesidades nutricionales de los atletas*. (Editorial Paidotribo, 2001).
23. Lukaski, H. C. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. *Nutrition* 20, 632–644 (2004).
24. Lukaski, H. C. Magnesium, Zinc, and Chromium Nutrition and Athletic Performance. *Can. J. Appl. Physiol.* 26, S13–S22 (2001).
25. Campbell, B. & Spano, M. in *Sport Exerc. Nutr.* (Human Kinetics, 2011).

26. Holway, F. E. & Spriet, L. L. Sport-specific nutrition: Practical strategies for team sports. *J. Sports Sci.* (2011). doi:10.1080/02640414.2011.605459
27. Gabbett, T., King, T. & Jenkins, D. Applied physiology of rugby league. *Sports Med. Auckl. NZ* 38, 119–138 (2008).
28. Reilly, T. & Borrie, A. Physiology Applied to Field Hockey. *Sports Med.* 14, 10–26 (1992).
29. Póvoas, S. C. *et al.* Physical and physiological demands of elite team handball. *J. Strength Cond. Res.* 26, 3365–3375 (2012).
30. Burke, L. *Practical sports nutrition.* (Human Kinetics, 2007).
31. Duthie, G., Pyne, D. & Hooper, S. Applied physiology and game analysis of rugby union. *Sports Med. Auckl. NZ* 33, 973–991 (2003).
32. Nevill, A., Holder, R. & Watts, A. The changing shape of ‘successful’ professional footballers. *J. Sports Sci.* 27, 419–426 (2009).
33. Yamamoto, J. B., Yamamoto, B. E., Yamamoto, P. P. & Yamamoto, L. G. Epidemiology of college athlete sizes, 1950s to current. *Res. Sports Med. Print* 16, 111–127 (2008).
34. Janezic, X., O’Conor, C., Bazán, N. & Gancedo, M. in *Man. LAFyS Nutr. Deporte* (2005).
35. Wilmore, J. Body composition in sport and exercise: directions for future research. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1983 15, 21–31 (1983).
36. Bayios, I. A., Bergeles, N. K., Apostolidis, N. G., Noutsos, K. S. & Koskolou, M. D. Anthropometric, body composition and somatotype differences of Greek elite female basketball, volleyball and handball players. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 46, 271–80 (2006).
37. Martín-Matillas, M. *et al.* Anthropometric, body composition and somatotype characteristics of elite female volleyball players from the highest Spanish league. *J. Sports Sci.* 0, 1–12 (2013).

38. Carter, J. E. L. & Heath, B. H. Somatotyping: Development and applications. *Camb. Univ. Press* (1990).
39. Marfell-Jones, M., Olds, T., Stewart, A. & Carter, L. *International standards for anthropometric assessment*. (ISAK, 2006).
40. Esparza, F. *Manual de Cineantropometría*. (GREC. Federación Española de Medicina Deportiva (FEMEDE), 1993).
41. Habashi, F. *Discovering the Eighth Metal. A History of Zinc*. (1998).
42. Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A. & Spiliopoulou, C. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch. Toxicol.* 80, 1–9 (2006).
43. Van Rij, A., Hall, M., Dohm, G., Bray, J. & Pories, W. Changes in zinc metabolism following exercise in human subjects. *Biol Trace Element Res* 10, 99–106 (1986).
44. Baltaci, A. K. *et al.* The effects of exercise and zinc deficiency on some elements in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 134, 79–83 (2010).
45. Baltaci, A. K. *et al.* Effects of zinc deficiency and supplementation on some hematologic parameters of rats performing acute swimming exercise. *Acta Physiol. Hung.* 90, 125–132 (2003).
46. Andrews, N. C. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341, 1986–1995 (1999).
47. Cuervo, M. *et al.* [Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization]. *Nutr. Hosp. Organo Of. Soc. Española Nutr. Parenter. Enter.* 24, 384–414 (2009).
48. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Consumo Alimentario en España 1990*. II, (1991).
49. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) *et al.* International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr. Bull.* 25, S99–203 (2004).

50. Barberá, R. & Farré, R. Biodisponibilidad de los elementos traza. *Rev Esp Cienc Tecnol Alim* 34, 381–399 (1992).
51. Cámara, F. & Amaro, M. A. Nutritional aspect of zinc availability. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54, 143–151 (2003).
52. National Research Council. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc.* Institute of Medicine/Food and Nutrition Board. (National Academy Press, 2001).
53. Chiplonkar, S. A. & Agte, V. V. Predicting bioavailable zinc from lower phytate forms, folic acid and their interactions with zinc in vegetarian meals. *J. Am. Coll. Nutr.* 25, 26–33 (2006).
54. Prasad, A. S. & Kucuk, O. Zinc in cancer prevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21, 291–295 (2002).
55. Prasad, A. S. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp. Gerontol.* 43, 370–377 (2008).
56. Rabbani, P. I., Prasad, A. S., Tsai, R., Harland, B. F. & Fox, M. R. Dietary model for production of experimental zinc deficiency in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 1514–1525 (1987).
57. Linder, M. *Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos.* (EUNSA, 1988).
58. Sauberlich, H. Laboratory tests for the assessment of nutritional status. *Boca Raton FL CRC Press* (1999).
59. Grandío Zequeira, O., Alfonso Novo, L., Amador García, M. & Sánchez Peralta, L. Efecto de la suplementación con zinc en la recuperación nutricional. *Rev. Cuba. Pediatría* 67, 0–0 (1995).
60. Lukaski, H. C. Micronutrients (magnesium, zinc, and copper): are mineral supplements needed for athletes? *Int. J. Sport Nutr.* 5 Suppl, S74–83 (1995).
61. Cordova, A. & Alvarez-Mon, M. Behaviour of zinc in physical exercise: a special reference to immunity and fatigue. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19, 439–445 (1995).

62. Córdova, A. & Navas, F. J. Effect of training on zinc metabolism: changes in serum and sweat zinc concentrations in sportsmen. *Ann. Nutr. Metab.* 42, 274–282 (1998).
63. Gleeson, M., Nieman, D. C. & Pedersen, B. K. Exercise, nutrition and immune function. *J. Sports Sci.* 22, 115–125 (2004).
64. *Mineral Requirements for Military Personnel: Levels Needed for Cognitive and Physical Performance During Garrison Training.* at <http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=11610>
65. Brun, J. F. *et al.* Serum zinc in highly trained adolescent gymnasts. *Biol. Trace Elem. Res.* 47, 273–278 (1995).
66. Khaled, S. *et al.* Serum zinc and blood rheology in sportsmen (football players). *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 17, 47–58 (1997).
67. Sandstead, H. H. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 621S–624S (1995).
68. Roney, N., Smith, C., Williams, M., Osier, M. & Paikoff, S. *Toxicological profile for zinc U.S.* (2005).
69. Winichagoon, P. Limitations and resolutions for dietary assessment of micronutrient intakes. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 Suppl 1, 296–298 (2008).
70. Kido, T. *et al.* Selenium, zinc, copper and cadmium concentration in livers and kidneys of people exposed to environmental cadmium. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 2, 101–104 (1988).
71. Sandstead, H. H. Trace metals in human nutrition. *Curr. Concepts Nutr.* 13, 37–46 (1984).
72. Lee, H. H., Prasad, A. S., Brewer, G. J. & Owyang, C. Zinc absorption in human small intestine. *Am. J. Physiol.* 256, G87–91 (1989).
73. Cousins, R. J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238–309 (1985).

74. Koizumi, N., Inoue, Y., Ninomiya, R., Fujita, D. & Tsukamoto, T. Relationship of cadmium accumulation to zinc or copper concentration in horse liver and kidney. *Environ. Res.* 49, 104–114 (1989).
75. Bremner, I. & Beattie, J. H. Metallothionein and the trace minerals. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 63–83 (1990).
76. Fairweather-Tait, S. J., Harvey, L. J. & Ford, D. Does ageing affect zinc homeostasis and dietary requirements? *Exp. Gerontol.* 43, 382–388 (2008).
77. Noakes, T. D. Effect of exercise on serum enzyme activities in humans. *Sports Med. Auckl. NZ* 4, 245–267 (1987).
78. Barceloux, D. G. Zinc. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 279–292 (1999).
79. Rink, L. & Haase, H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 28, 1–4 (2007).
80. Peake, J. M., Gerrard, D. F. & Griffin, J. F. T. Plasma Zinc and Immune Markers in Runners in Response to a Moderate Increase in Training Volume. *Int. J. Sports Med.* 24, 212–216 (2003).
81. Ma, Z. J. & Yamaguchi, M. Role of endogenous zinc in the enhancement of bone protein synthesis associated with bone growth of newborn rats. *J. Bone Miner. Metab.* 19, 38–44 (2001).
82. Ohno, H. *et al.* Exercise-induced changes in blood zinc and related proteins in humans. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 58, 1453–1458 (1985).
83. Lukaski, H. C., Bolonchuk, W. W., Klevay, L. M., Milne, D. B. & Sandstead, H. H. Changes in plasma zinc content after exercise in men fed a low-zinc diet. *Am. J. Physiol.* 247, E88–93 (1984).
84. Cordova, A., Gimenez, M. & Escanero, J. F. Effect of swimming to exhaustion, at low temperatures, on serum Zn, Cu, Mg and Ca in rats. *Physiol. Behav.* 48, 595–598 (1990).
85. Campbell, W. W. & Anderson, R. A. Effects of aerobic exercise and training on the trace minerals chromium, zinc and copper. *Sports Med. Auckl. NZ* 4, 9–18 (1987).

86. Volpe, S. L., Lowe, N. M., Woodhouse, L. R. & King, J. C. Effect of maximal exercise on the short-term kinetics of zinc metabolism in sedentary men. *Br. J. Sports Med.* 41, 156–161 (2007).
87. Mundie, T. G. & Hare, B. Effects of resistance exercise on plasma, erythrocyte, and urine Zn. *Biol. Trace Elem. Res.* 79, 23–28 (2001).
88. Wade, C. & Freund, B. in 3, 207–245 (Gisolfi, Lamb DR, 1990).
89. Van Loan, M. d., Sutherland, B., Lowe, N. m., Turnlund, J. r. & King, J. c. The effects of zinc depletion on peak force and total work of knee and shoulder extensor and flexor muscles. / Effets de la diminution de zinc sur la force maximale et la quantite de travail totale fournie par les muscles extenseurs et flechisseurs du genou et de l'epaule. *Int. J. Sport Nutr.* 9, 125–135 (1999).
90. Shils, M. & Young, V. *Zinc and copper. Modern nutrition in health and disease.* (Lea & Febiger, 1988).
91. Lowe, N. M., Woodhouse, L. R. & King, J. C. A comparison of the short-term kinetics of zinc metabolism in women during fasting and following a breakfast meal. *Br. J. Nutr.* 80, 363–370 (1998).
92. Eide, D. J. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 796–800 (2004).
93. Hambidge, K. M., Miller, L. V., Westcott, J. E., Sheng, X. & Krebs, N. F. Zinc bioavailability and homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1478S–1483S (2010).
94. Sanchez, S. & Rovira, R. Importancia del cinc en la alimentación. *Nutr. Clin.* 61–70 (1985).
95. Rubio, C. *et al.* [Zinc: an essential oligoelement]. *Nutr. Hosp.* 22, 101–107 (2007).
96. DeRuisseau, K. c., Cheuvront, S. n., Haymes, E. m. & Sharp, R. g. Sweat iron and zinc losses during prolonged exercise. / Pertes de zinc et de fer a travers la sueur lors d'un exercice prolonge. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 12, 428–437 (2002).

97. Milne, D. B., Canfield, W. K., Mahalko, J. R. & Sandstead, H. H. Effect of dietary zinc on whole body surface loss of zinc: impact on estimation of zinc retention by balance method. *Am. J. Clin. Nutr.* 38, 181–186 (1983).
98. O'Dell, B. L. Role of zinc in plasma membrane function. *J. Nutr.* 130, 1432S–6S (2000).
99. Ho, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J. Nutr. Biochem.* 15, 572–578 (2004).
100. Maret, W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Exp. Gerontol.* 43, 363–369 (2008).
101. Armendáriz, C. R., Gironés, C. R., Marrero, S. A., Torre, A. H. de la & Weller, D. G. Zn, Mn, Cu, Se, Cr: nutrición y suplementación. *Aliment. Rev. Tecnol. E Hig. Los Aliment.* 37–44 (2004).
102. Vallee, B. L. & Falchuk, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73, 79–118 (1993).
103. Ott, E. S. & Shay, N. F. Zinc deficiency reduces leptin gene expression and leptin secretion in rat adipocytes. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* 226, 841–846 (2001).
104. Ji, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. New York N* 222, 283–292 (1999).
105. Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutr. Burbank Los Angeles Cty. Calif* 18, 872–879 (2002).
106. Ozturk, A. *et al.* Effects of zinc deficiency and supplementation on malondialdehyde and glutathione levels in blood and tissues of rats performing swimming exercise. *Biol. Trace Elem. Res.* 94, 157–166 (2003).
107. Micheletti, A., Rossi, R. & Rufini, S. Zinc status in athletes: relation to diet and exercise. / Niveau du zinc chez l'athlete en relation avec l'alimentation et l'exercice pratique. *Sports Med.* 31, 577–582 (2001).
108. Kedziora-Kornatowska, K. *et al.* Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects. *J. Pineal Res.* 42, 153–158 (2007).

109. Torres-Domínguez, A. Zinc: Relación con el estrés oxidativo y la diabetes. *Bioquímica* 34, 190–196 (2009).
110. Carlsohn, A., Rohn, S., Mayer, F. & Schweigert, F. J. Physical activity, antioxidant status, and protein modification in adolescent athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 42, 1131–1139 (2010).
111. Morales-Alamo, D. & Calbet, J. A. L. Free radicals and sprint exercise in humans. *Free Radic. Res.* (2013). doi:10.3109/10715762.2013.825043
112. Jackson, M. J. Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 2285–2291 (2005).
113. Scheele, C., Nielsen, S. & Pedersen, B. K. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 20, 95–99 (2009).
114. Rousseau, A.-S., Margaritis, I., Arnaud, J., Faure, H. & Roussel, A.-M. Physical activity alters antioxidant status in exercising elderly subjects. *J. Nutr. Biochem.* 17, 463–470 (2006).
115. Ji, L. L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 82–92 (2002).
116. Dékány, M. *et al.* Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports. *Int. J. Sports Med.* 27, 112–116 (2006).
117. Criswell, D. *et al.* High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25, 1135–1140 (1993).
118. Marsh, S. A., Laursen, P. B. & Coombes, J. S. Effects of antioxidant supplementation and exercise training on erythrocyte antioxidant enzymes. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Für Vitam.- Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* 76, 324–331 (2006).
119. Zembron-Lacny, A., Ostapiuk, J., Slowinska-Lisowska, M., Witkowski, K. & Szyszka, K. Pro-antioxidant ratio in healthy men exposed to muscle-damaging resistance exercise. *J. Physiol. Biochem.* 64, 27–35 (2008).

120. König, D., Weinstock, C., Keul, J., Northoff, H. & Berg, A. Zinc, iron, and magnesium status in athletes--influence on the regulation of exercise-induced stress and immune function. *Exerc. Immunol. Rev.* 4, 2–21 (1998).
121. Hammermueller, J. D., Bray, T. M. & Bettger, W. J. Effect of zinc and copper deficiency on microsomal NADPH-dependent active oxygen generation in rat lung and liver. *J. Nutr.* 117, 894–901 (1987).
122. Hinton, P. S., Sanford, T. C., Davidson, M. M., Yakushko, O. F. & Beck, N. C. Nutrient intakes and dietary behaviors of male and female collegiate athletes. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 14, 389–405 (2004).
123. Noor, R., Mittal, S. & Iqbal, J. Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 8, RA210–215 (2002).
124. Nieman, D. C. Exercise Immunology: Nutritional Countermeasures. *Can. J. Appl. Physiol.* 26, S45–S55 (2001).
125. Speich, M., Pineau, A. & Ballereau, F. Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clin. Chim. Acta* 312, 1–11 (2001).
126. Nieman, D. C. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on systemic immunity. *Immunol. Cell Biol.* 78, 496–501 (2000).
127. Mackinnon, L. T. *Advances in Exercise Immunology*. (Human Kinetics 1, 1999).
128. Volpe, S. L. Minerals as ergogenic aids. *Curr. Sports Med. Rep.* 7, 224–229 (2008).
129. Fraker, P. J., DePasquale-Jardieu, P., Zwickl, C. M. & Luecke, R. W. Regeneration of T-cell helper function in zinc-deficient adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5660–5664 (1978).
130. Cunningham-Rundles, S. *et al.* Physiological and pharmacological effects of zinc on immune response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 587, 113–122 (1990).

131. Nieman, D. C. Exercise, infection, and immunity. *Int. J. Sports Med.* 15 Suppl 3, S131–141 (1994).
132. Prasad, A. S. Zinc: mechanisms of host defense. *J. Nutr.* 137, 1345–1349 (2007).
133. Honda, R., Tsuritani, I., Ishizaki, M. & Yamada, Y. Zinc and copper levels in ribs of cadmium-exposed persons with special reference to osteomalacia. *Environ. Res.* 75, 41–48 (1997).
134. Gibney, M., Elia, M., Ljungqvist, O. & Dowsett, J. *Nutrición clínica.* (Acribia, 2004).
135. Gunshin, H. *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482–488 (1997).
136. Fischer Walker, C., Kordas, K., Stoltzfus, R. J. & Black, R. E. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 5–12 (2005).
137. Meadows, N. J., Grainger, S. L., Ruse, W., Keeling, P. W. & Thompson, R. P. Oral iron and the bioavailability of zinc. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* 287, 1013–1014 (1983).
138. McDonald, R. & Keen, C. L. Iron, zinc and magnesium nutrition and athletic performance. *Sports Med. Auckl. NZ* 5, 171–184 (1988).
139. Casado, A., de la Torre, R. & López-Fernández, M. E. Copper/zinc superoxide dismutase activity in newborns & young people in Spain. *Indian J. Med. Res.* 125, 655–660 (2007).
140. Mesejo Arizmendi, A. *Nutrición Clínica y Dietética.* (Generalitat Valenciana, 2000).
141. Lukaski, H. C. Magnesium, zinc, and chromium nutrition and physical activity. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 585S–93S (2000).
142. Baltaci, A. K., Uzun, A., Kilic, M. & Mogulkoc, R. Effects of Acute Swimming Exercise on Some Elements in Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 127, 148–153 (2009).
143. Cinar, V., Nizamlioglu, M., Mogulkoc, R. & Baltaci, A. K. Effects of magnesium supplementation on blood parameters of athletes at rest and after exercise. *Biol. Trace Elem. Res.* 115, 205–212 (2007).

144. Cinar, V., Polat, Y., Baltaci, A. K. & Mogulkoc, R. Effects of Magnesium Supplementation on Testosterone Levels of Athletes and Sedentary Subjects at Rest and after Exhaustion. *Biol. Trace Elem. Res.* 140, 18–23 (2011).
145. Oliveira, D. C. X., Rossano Procida, I. & Borges-Silva, C. Effect of Training Judo in the Competition Period on the Plasmatic Levels of Leptin and Pro-inflammatory Cytokines in High-Performance Male Athletes. *Biol. Trace Elem. Res.* 135, 345–354 (2009).
146. Fischer, P. W., Giroux, A. & L'Abbé, M. R. Effect of zinc supplementation on copper status in adult man. *Am. J. Clin. Nutr.* 40, 743–746 (1984).
147. Haymes, E. M. Vitamin and mineral supplementation to athletes. *Int. J. Sport Nutr.* 1, 146–169 (1991).
148. Maxwell, C. & Volpe, S. L. Effect of zinc supplementation on thyroid hormone function. A case study of two college females. *Ann. Nutr. Metab.* 51, 188–194 (2007).
149. Kilic, M. Effect of fatiguing bicycle exercise on thyroid hormone and testosterone levels in sedentary males supplemented with oral zinc. *Neuro Endocrinol. Lett.* 28, 681–685 (2007).
150. Krotkiewski, M., Gudmundsson, M., Backström, P. & Mandroukas, K. Zinc and muscle strength and endurance. *Acta Physiol. Scand.* 116, 309–311 (1982).
151. Eide, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1763, 711–722 (2006).
152. Cragg, R. A. *et al.* Homeostatic regulation of zinc transporters in the human small intestine by dietary zinc supplementation. *Gut* 54, 469–478 (2005).
153. Lichten, L. A. & Cousins, R. J. Mammalian Zinc Transporters: Nutritional and Physiologic Regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 153–176 (2009).
154. Palmiter, R. D. & Huang, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 744–751 (2004).

155. Liuzzi, J. P. & Cousins, R. J. Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 151–172 (2004).
156. Liuzzi, J. P., Blanchard, R. K. & Cousins, R. J. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J. Nutr.* 131, 46–52 (2001).
157. Cousins, R. J., Liuzzi, J. P. & Lichten, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* 281, 24085–24089 (2006).
158. Yu, Y. Y., Kirschke, C. P. & Huang, L. Immunohistochemical analysis of ZnT1, 4, 5, 6, and 7 in the mouse gastrointestinal tract. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 55, 223–234 (2007).
159. McMahon, R. J. & Cousins, R. J. Mammalian zinc transporters. *J. Nutr.* 128, 667–670 (1998).
160. Nakano, A., Nakano, H., Hanada, K., Nomura, K. & Uitto, J. ZNT4 gene is not responsible for acrodermatitis enteropathica in Japanese families. *Hum. Genet.* 110, 201–202 (2002).
161. Huang, L. & Gitschier, J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat. Genet.* 17, 292–297 (1997).
162. Lönnerdal, B. Trace element transport in the mammary gland. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 165–177 (2007).
163. Kambe, T. *et al.* Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 277, 19049–19055 (2002).
164. Ellis, C. D., Macdiarmid, C. W. & Eide, D. J. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 280, 28811–28818 (2005).
165. Suzuki, T. *et al.* Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J. Biol. Chem.* 280, 30956–30962 (2005).

166. Li, M. *et al.* Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18636–18641 (2007).
167. Huang, L., Kirschke, C. P. & Gitschier, J. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J. Biol. Chem.* 277, 26389–26395 (2002).
168. Kirschke, C. P. & Huang, L. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 278, 4096–4102 (2003).
169. Huang, L., Yu, Y. Y., Kirschke, C. P., Gertz, E. R. & Lloyd, K. K. C. Znt7 (Slc30a7)-deficient mice display reduced body zinc status and body fat accumulation. *J. Biol. Chem.* 282, 37053–37063 (2007).
170. Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A. & Seve, M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53, 2330–2337 (2004).
171. Hu, C. *et al.* PPAR γ , KCNJ11, CDKAL1, CDKN2A-CDKN2B, IDE-KIF11-HHEX, IGF2BP2 and SLC30A8 are associated with type 2 diabetes in a Chinese population. *PloS One* 4, e7643 (2009).
172. Chistiakov, D. A. & Voronova, N. V. Zn(2+)-transporter-8: a dual role in diabetes. *BioFactors Oxf. Engl.* 35, 356–363 (2009).
173. Sim, D. L. & Chow, V. T. The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics* 59, 224–233 (1999).
174. Eng, B. H., Guerinot, M. L., Eide, D. & Saier, M. H., Jr. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* 166, 1–7 (1998).
175. Gaither, L. A. & Eide, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biomaterials Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 14, 251–270 (2001).
176. Gaither, L. A. & Eide, D. J. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 276, 22258–22264 (2001).

177. Lioumi, M. *et al.* Isolation and characterization of human and mouse ZIRTL, a member of the IRT1 family of transporters, mapping within the epidermal differentiation complex. *Genomics* 62, 272–280 (1999).
178. Andree, K. B. *et al.* Investigation of lymphocyte gene expression for use as biomarkers for zinc status in humans. *J. Nutr.* 134, 1716–1723 (2004).
179. Desouki, M. M., Geradts, J., Milon, B., Franklin, R. B. & Costello, L. C. hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. *Mol. Cancer* 6, 37 (2007).
180. Lang, C. *et al.* Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L577–584 (2007).
181. Dufner-Beattie, J., Langmade, S. J., Wang, F., Eide, D. & Andrews, G. K. Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J. Biol. Chem.* 278, 50142–50150 (2003).
182. Dufner-Beattie, J. *et al.* The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *J. Biol. Chem.* 278, 33474–33481 (2003).
183. Kim, B.-E. *et al.* Zn²⁺-stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 4523–4530 (2004).
184. Mao, X., Kim, B.-E., Wang, F., Eide, D. J. & Petris, M. J. A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 282, 6992–7000 (2007).
185. Wang, K., Zhou, B., Kuo, Y.-M., Zemansky, J. & Gitschier, J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 66–73 (2002).
186. Wang, F., Kim, B.-E., Petris, M. J. & Eide, D. J. The mammalian Zip5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells. *J. Biol. Chem.* 279, 51433–51441 (2004).

187. Taylor, K. M., Hiscox, S. & Nicholson, R. I. Zinc transporter LIV-1: a link between cellular development and cancer progression. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 15, 461–463 (2004).
188. Taylor, K. M. A distinct role in breast cancer for two LIV-1 family zinc transporters. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1247–1251 (2008).
189. Hogstrand, C., Kille, P., Nicholson, R. I. & Taylor, K. M. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends Mol. Med.* 15, 101–111 (2009).
190. Taylor, K. M. *et al.* ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer Cells. *Endocrinology* 149, 4912–4920 (2008).
191. Ryu, M.-S., Lichten, L. A., Liuzzi, J. P. & Cousins, R. J. Zinc transporters ZnT1 (Slc30a1), Zip8 (Slc39a8), and Zip10 (Slc39a10) in mouse red blood cells are differentially regulated during erythroid development and by dietary zinc deficiency. *J. Nutr.* 138, 2076–2083 (2008).
192. Besecker, B. *et al.* The human zinc transporter SLC39A8 (Zip8) is critical in zinc-mediated cytoprotection in lung epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L1127–1136 (2008).
193. Matsuura, W. *et al.* SLC39A9 (ZIP9) regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1142–1148 (2009).
194. Kagara, N., Tanaka, N., Noguchi, S. & Hirano, T. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 98, 692–697 (2007).
195. Fukada, T. *et al.* The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* 3, e3642 (2008).
196. Liuzzi, J. P. *et al.* Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6843–6848 (2005).

197. Sim, D. L. C., Yeo, W. M. & Chow, V. T. K. The novel human HUEL (C4orf1) protein shares homology with the DNA-binding domain of the XPA DNA repair protein and displays nuclear translocation in a cell cycle-dependent manner. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 487–504 (2002).
198. Fukada, T., Yamasaki, S., Nishida, K., Murakami, M. & Hirano, T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 1123–1134 (2011).
199. Stewart, A. & Sutton, L. *Body Composition in Sport, Exercise and Health.* (Routledge, 2012).
200. Bompa, T. *Periodización. Teoría y Metodología del Entrenamiento.* (Hispano Europea, 2007).
201. Mataix, J. & García Díz, L. *Nutriber.* (FUNIBER- Fundación Universitaria Iberoamericana, 2005).
202. Hammerle-Fickinger, A. *et al.* Validation of extraction methods for total RNA and miRNA from bovine blood prior to quantitative gene expression analyses. *Biotechnol. Lett.* 32, 35–44 (2010).
203. Weber, D. G. *et al.* Assessment of mRNA and microRNA stabilization in peripheral human blood for multicenter studies and biobanks. *Biomark. Insights* 5, 95 (2010).
204. Cenk, G. A. *et al.* Anthropometric Features and Balance Among Elite Handball Players. *Ovidius Univ. Ann. Ser. Phys. Educ. SportScience Mov. Heal.* 12, 132–135 (2012).
205. Gorostiaga, E. M., Granados, C., Ibañez, J., González-Badillo, J. J. & Izquierdo, M. Effects of an Entire Season on Physical Fitness Changes in Elite Male Handball Players: *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, 357–366 (2006).
206. Carter, J. E. L., Ackland, T. R., Kerr, D. A. & Stapff, A. B. Somatotype and size of elite female basketball players. *J. Sports Sci.* 23, 1057–1063 (2005).
207. Sibila, M. & Pori, P. Position-related differences in selected morphological body characteristics of top-level handball players. *Coll. Antropol.* 33, 1079–1086 (2009).

208. Molina-López, J. *et al.* Implementation Of A Nutrition Education Program In A Handball Team; Consequences On Nutritional Status. *Nutr. Hosp.* 28, 1065–1076 (2013).
209. Jeacocke, N. A. & Burke, L. M. Methods to standardize dietary intake before performance testing. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 20, 87–103 (2010).
210. Giolo De Carvalho, F. *et al.* Evidence of zinc deficiency in competitive swimmers. *Nutrition* 28, 1127–1131 (2012).
211. Prasad, A. S. Clinical manifestations of zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 5, 341–363 (1985).
212. Karlsson, J., Diamant, B. & Saltin, B. Lactate dehydrogenase activity in muscle after prolonged severe exercise in man. *J. Appl. Physiol.* 25, 88–91 (1968).
213. Song, Y., Elias, V., Wong, C. P., Scrimgeour, A. G. & Ho, E. Zinc transporter expression profiles in the rat prostate following alterations in dietary zinc. *Biometals* 23, 51–58 (2010).
214. Conklin, D. S., Culbertson, M. R. & Kung, C. Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 244, 303–311 (1994).
215. Wang, F. *et al.* Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. *Hum. Mol. Genet.* 13, 563–571 (2004).