



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD**

**“Efecto de la suplementación de isoleucina, prolina y
glicina en el crecimiento y densidad ósea de huesos
largos en crías de ratas Wistar con restricción
proteica”**

**Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Biomédicas y de la Salud**

PRESENTA:

L.N Maria Vianey Abelar Rosas

Director(a) de Tesis:

Dra. Guadalupe López Rodríguez

San Agustín Tlaxiaca Hgo., México., marzo 2023



24/03/2023

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial de la TESIS del programa educativo de posgrado titulada "Efecto de la suplementación de isoleucina, prolina y glicina en el crecimiento y densidad ósea de huesos de ratas Wistar con restricción proteica", realizada por la sustentante **María Vianey Abelar Rosas** con número de cuenta 239160 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

"Amor, Orden y Progreso"

Pachuca, Hidalgo a 24 de marzo de 2023

El Comité Tutorial


 Guadalupe López Rodríguez
 Directora


 Marcos Marcelo Galván García
 Miembro del comité


 Diana Patricia Olivo Ramírez
 Miembro del comité


 Luis Delgado Olivares
 Miembro del comité


 Daniel Sánchez Gutiérrez
 Miembro del comité



Cirujito ex-Hacienda La Cripepón s/n Carretera
 Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaco, Hidalgo,
 México. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4306, 2361, 4346, 4310
 medicina@uaeh.edu.mx



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 772047, número de CVU 840068.

Para la realización del proyecto de investigación de esta tesis se recibió financiamiento de: SEP-PRODEP Convocatoria Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2016, clave UAEH-CA-86. SEP-PRODEP Convocatoria de Apoyo a la Incorporación de NPTC, convenio 511-6/17-8021

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) por la oportunidad de realizar este proyecto en el Laboratorio de Nutrición Molecular en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa).

Agradezco al Bioterio del ICSa por la capacitación en el manejo y cuidado de los animales de laboratorio, así también el espacio asignado para el desarrollo de la parte experimental del proyecto.

Agradecimientos

Agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Guadalupe López Rodríguez, por una vez más permitirme trabajar a su lado, por siempre confiar en mí, por motivarme a concluir este proyecto a pesar de tantos altibajos y, sobre todo, por jamás dejarme sola. Gracias infinitas por su tiempo y esfuerzo, su paciencia, consejos, apoyo moral y profesional, por sus enseñanzas y conocimiento compartido conmigo. Este trabajo es gracias a usted y a nuestro esfuerzo del día a día, con todo mi cariño, admiración y respeto.

Agradezco también a cada uno de mis revisores de tesis por su tiempo, consejos y aportaciones para la mejora de este proyecto, también por compartir sus conocimientos conmigo, gracias.

Agradezco a mis padres, Eva y Gabriel por todo su apoyo, amor y esfuerzo, gracias a ustedes he logrado alcanzar un grado más en mi formación académica, espero se sientan orgullosos de su hija, gracias papás, los amo.

Gracias a mi hijo Hansel, gracias mi amor por ser el sostén de mi día a día, por ser esa personita que me motiva a salir adelante y luchar por tu bienestar. Eres mi vida entera, mi adoración y la persona que más amo en el mundo, espero que cuando puedas leer estas líneas, te sientas orgullo de tu mamá, te amo infinitamente.

Agradezco a mis abuelos por todo su amor y apoyo incondicional que me han brindado, gracias abuela Margarita por su cariño y siempre estar, gracias mamá Eliboria por todo su amor, se que desde el cielo cuidará de mí, siempre en mi corazón mami,

Agradezco a mi novio, Jorge, gracias amor por tu tiempo compartido, por tu amor y apoyo que siempre me has brindado, por mostrarme un panorama distinto de la vida, por tus consejos, enseñanzas, por motivarme hacer una mujer distinta, por darme el valor para realizar cosas que jamás pensé, gracias por estar en las buenas y en las malas y sobre todo por no dejarme sola, te amo infinitamente.

Agradezco a cada una de las personas que me han brindado su apoyo, amigos, familia, conocidos, etc. Gracias.

Por último, agradezco a Dios por darme la fortaleza, paciencia y sabiduría para poder concluir este proyecto, agradezco infinitamente cada lección y todas las bendiciones que me has dado a lo largo de mi vida.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 GENERALIDADES	5
1.1.1 Crecimiento en mamíferos.....	5
1.1.2 Crecimiento intrauterino en mamíferos	5
1.1.3 Nutrientes esenciales en el crecimiento.....	6
1.1.4 Crecimiento y densidad del tejido óseo.....	7
2.1.5 Mecanismo molecular del crecimiento óseo	8
2.1.6 Efecto de la proteína en el tejido óseo	9
2.1.7 Aminoácidos esenciales en el tejido óseo.....	10
2.1.8 Isoleucina en el tejido óseo	11
2.1.9 Aminoácidos no esenciales en el tejido óseo.....	12
2.1.10 Prolina y glicina en el tejido óseo.....	12
2.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	13
2.2.1 Retraso del crecimiento.....	13
2.2.2 Prevalencia del retraso en el crecimiento.....	14
2.2.3 Trastornos del crecimiento lineal y densidad ósea por déficit de proteínas.....	15
2.2.4 Trastornos del crecimiento lineal y densidad ósea por déficit de aminoácidos esenciales.....	16
2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO	20
6.2 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN.....	20
6.2.1 Criterios de inclusión y exclusión	20
6.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA Y MUESTREO	21
6.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES	21
6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	23
6.6 MÉTODOS	24
6.6.1 Animales de experimentación.....	24
6.6.2 Condiciones de alojamiento	24

6.6.3 Dietas.....	24
6.6.4 Apareamiento	27
6.6.5 Gestación y lactancia	27
6.6.6 Registro de peso	28
6.6.7 Sacrificio.....	29
6.6.8 Medición de albúmina y hemoglobina.....	29
6.6.9 Disección de huesos largos	30
6.6.10 Extracción de incisivos inferiores	32
6.6.11 Determinación de densidad ósea con radiografía simple.....	32
6.7 ASPECTOS ÉTICOS	33
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	46
8.1 CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA PREGESTACIONAL CON RESTRICCIÓN PROTEICA EN RATAS WISTAR.	46
8.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y PESO CORPORAL CON SUPLEMENTACIÓN DE ISOLEUCINA, PROLINA Y GLICINA EN CRÍAS CON RESTRICCIÓN PROTEICA.	47
8.3 INCREMENTO EN EL CRECIMIENTO ÓSEO EN CRÍAS CON RESTRICCIÓN PROTEICA SUPLEMENTADAS CON ISOLEUCINA, PROLINA Y GLICINA.	48
8.4 DENSIDAD ÓSEA EN CRÍAS CON RESTRICCIÓN PROTEICA SUPLEMENTADAS CON ISOLEUCINA, PROLINA Y GLICINA.....	50
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
REFERENCIAS	55
ANEXOS	65
ANEXO 1. DICTAMEN DE APROBACIÓN CICUAL	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental del estudio.	23
Figura 2 Imagen de huesos de pata delantera derecha de roedor. Imagen tomada de: Atlas Sketal System (66).....	31
Figura 3. Imagen de huesos de pata trasera derecha de roedor. Imagen tomada de: Atlas Sketal System (66).....	31
Figura 4. Extracción de incisivos inferiores de rata Wistar. Imagen tomada de Koshwanto, 2019 (67).	32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición operacional de variables.	21
Tabla 2. Composición de nutrientes en la dieta AIN-93G y AIN-93M para roedores	26
Tabla 3. Formulaciones de la dieta administrada durante el periodo de restricción proteica (AIN-93M), gestación y lactancia (AIN-93G) a ratas hembra Wistar	28
Tabla 5. Hemoglobina al inicio de la gestación y termino de lactancia en ratas hembra Wistar con restricción proteica.....	35
Tabla 6. Indicadores proteicos al termino de la gestación y lactancia en ratas hembra Wistar con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.....	35
Tabla 7. Ingesta energética y ganancia de peso durante la gestación en ratas hembra Wistar con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.....	36
Tabla 8. Peso e indicadores proteicos al día 21 de vida en crías nacidas de ratas hembra Wistar suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.....	37
Tabla 9. Longitud (cm) de incisivo y huesos largos de patas delanteras y traseras de crías nacidas de ratas Wistar suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.	38
Tabla 10. Peso (mg) de incisivo y huesos largos de patas delanteras y traseras de crías nacidas de ratas Wistar suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.	39
Tabla 11. Densidad ósea total (g/cm ²) de incisivo y huesos largos de patas delanteras y traseras de crías nacidas de ratas Wistar suplementadas con isoleucina, prolina y glicina. .	40

ABREVIATURAS

AIN-93G	Dieta estándar para roedores en gestación y lactancia
AIN-93M	Dieta estándar para roedores
DO	Densidad ósea
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
GBP	Grupo bajo en proteína
GBP-IP	Grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina-prolina
GBP-IPG	Grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina-prolina-glicina
GBP-ISO	Grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina
GH	Hormona del crecimiento
GNR	The Global Nutrition Report 2021
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina-I
IPP	Tripéptido isoleucina-prolina-prolina
OMS	Organización Mundial de la Salud
RO	Radiopacidad ósea
2RD	2 veces el requerimiento diario

RESUMEN

Introducción. Una alimentación limitada en nutrientes, principalmente proteínas y aminoácidos esenciales, desencadena trastornos en el crecimiento óseo desde edades tempranas de la vida (retraso del crecimiento) y en etapa adulta (osteoporosis y fracturas).

Objetivo. Evaluar el efecto de la suplementación con isoleucina, prolina y glicina durante la gestación y la lactancia en el crecimiento y la radiopacidad ósea en los huesos largos de crías de ratas Wistar con restricción proteica. **Metodología.** En este estudio experimental se evaluaron crías de ratas Wistar, quienes a sus madres se le sometió a dieta baja en proteínas (65% del requerimiento) durante la gestación y lactancia; los grupos de estudio incluyeron ratas con dieta baja en proteínas (GBP), GBP suplementadas con 2 veces su requerimiento diario (2RD) de isoleucina (GBP-ISO), GBP con 2RD de prolina y GBP con 2RD de glicina; además de un grupo control (100% del requerimiento proteico). En las crías de las madres suplementadas y del grupo control (22 días de vida) se midió albúmina, hemoglobina y proteínas totales en suero o sangre; se realizaron mediciones de longitud y peso de los huesos largos y dientes incisivos, así como determinación de la densidad ósea (DO) por rayos X. Se aceptó como significativo un valor $p > 0.05$, y los datos se procesaron con software estadístico SPSS 21.0. **Resultados.** El peso y longitud promedio de los huesos largos en crías macho y hembras fue mayor para el grupo control y grupos GBP-ISO, GBP-IP y GBP-IPG en comparación con el GBP ($p < 0.05$); las hembras registraron una mayor DO de los huesos húmero y radio en los GBP, GBP-ISO y GBP-IPG en relación con el grupo control ($p < 0.05$); en tibia las hembras de los grupos GBP-ISO y GBP-IP obtuvieron promedios de DO menores, en comparación con el GBP ($p < 0.05$). El grupo control registró un promedio de DO en el incisivo izquierdo de las crías macho menor en comparación con el promedio obtenido por los grupos GBP y GBP-ISO ($p < 0.05$). **Conclusión.** La suplementación con isoleucina, prolina y glicina en ratas Wistar con restricción proteica durante la gestación y lactancia favorece el crecimiento y DO de huesos largos (húmero, radio, tibia) e incisivo de sus crías a los 22 días de vida.

Palabras clave: glicina, isoleucina, prolina, radiopacidad ósea, restricción del crecimiento, restricción proteica,

ABSTRACT

Introduction. A diet limited in nutrients, mainly proteins and essential amino acids, triggers bone growth disorder from early ages of life (growth retardation) and in adulthood (osteoporosis and fractures). **Objective.** To evaluate the effects of supplementation with isoleucine, proline and glycine during pregnancy and lactation on growth and bone density in the long bones of protein-restriction offsprings of female rats Wistar. **Methodology.** In this experimental study, offsprings of female rats Wistar were evaluated, whose mothers were subjected to a low-protein diet (65% of the requirement) during pregnancy and lactation; study groups included rats on a low-protein diet (GBP), GBP supplemented with 2 times their daily requirement (2RD) for isoleucine (GBP-ISO), GBP with 2RD of proline and GBP with 2RD of glycine; in addition to a control group (100% of the protein requirement). In the offsprings of the supplemented mothers or the control (22 days old) albumin, hemoglobin and protein in serum or blood were measured; measurements of length and weight of the long bones and incisor, as well as determinations of the bone density (DO) by X-rays were made, the data was processed in SPSS version 21.0. **Results.** Mean weight and length of long bones in male and female offsprings were higher for the control group and GBP-ISO, GBP-IP, and GBP-IPG groups compared to the GBP ($p < 0.05$); the females registered a higher DO of the humerus and radius bone of the GBP, GBP-ISO and GBP-IPG groups in relation to the control group ($p < 0.05$); in tibia, the females of the GBP-ISO and GBP-IP groups obtained lower DO averages, compared to the GBP ($166.61 \pm 06.47 \text{ g/cm}^2$, $169.41 \pm 07.98 \text{ g/cm}^2$ vs $188.57 \pm 09.93 \text{ g/cm}^2$, respectively $p < 0.05$). The control group recorded a lower average DO in the left incisor of the male offsprings compared to the average obtained by the GBP and GBP-ISO groups ($p < 0.05$). **Conclusion.** The supplementation with isoleucine, proline and glycine in rats Wistar with protein restriction favors the growth and DO of long bones (humerus, radius, tibia) and incisor of borns offsprings of 22 days old.

Keywords: growth restriction, isoleucine, proline, glycine, protein restriction, bone density.

INTRODUCCIÓN

El retraso en el crecimiento sigue siendo el principal problema nutricional en los primeros años de vida, debido a las cifras elevadas que existen de este padecimiento en todo el mundo. Se estima que hay 149,2 millones de niños menores de 5 años en el mundo que presentan retraso en su crecimiento (1). La alimentación es un factor importante en la etiología de este problema nutricional. Una alimentación limitada en nutrientes, principalmente de proteínas y aminoácidos esenciales, desencadena trastornos en el crecimiento óseo desde edades tempranas de la vida (desnutrición y retraso en el crecimiento) y en etapa adulta (osteoporosis y riesgo a fracturas), por ellos es fundamental un consumo de proteínas adecuado para que los niños alcancen su máximo potencial de crecimiento y desarrollo (2, 3). Una ingesta adecuada de proteínas favorece la ganancia de peso y crecimiento lineal en poblaciones con estado nutricional deficiente (4).

El crecimiento óseo es uno de los procesos fisiológicos más importante en el ser humano, ya que es único dentro de los seres vivos (5). La matriz ósea conforma un 99% del hueso, del cual un 35% es matriz orgánica: donde el 90% son proteínas de colágeno tipo I (>95%) y colágeno tipo V (<5%), estos dos tipos de proteínas incluyen en su secuencia una gran cantidad de aminoácidos no esenciales (6). De ahí surge la importancia de un consumo adecuado de proteínas y aminoácidos esenciales en todas las etapas de crecimiento del ser humano, particularmente en la gestación y durante los primeros años de vida. Se ha descrito que existe asociación entre el retraso del crecimiento y bajos niveles circulantes de aminoácidos esenciales en niños de 12 a 59 meses de edad en zonas rurales de Malawi, en África (7). Además, estudios *in vitro* han evaluado el efecto de 3 tripéptidos: Valina/Prolina/Prolina (VPP), Leucina/Prolina/Valina (LPV) e Isoleucina/Prolina/Prolina (IPP) con la expresión de genes relacionados con la formación de células óseas, concluyendo que el tripéptido IPP favoreció de manera significativa la expresión de genes y la diferenciación celular, aumentando la formación de osteoblastos (8).

En el presente estudio se aborda la importancia de un crecimiento intrauterino adecuado desde una perspectiva nutricional, es decir, el impacto que tienen las proteínas en este proceso. Existen evidencia que asocia la ingesta adecuada de proteínas y algunos aminoácidos esenciales con un crecimiento adecuado, evitando trastornos de crecimiento

como desnutrición y retraso en el crecimiento. Para ello se desarrolló un modelo experimental, donde se evaluó el efecto de una suplementación de aminoácidos en la gestación y lactancia en el crecimiento óseo y DO de huesos largos de las crías de las hembras Wistar.

I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades

1.1.1 Crecimiento en mamíferos

El crecimiento es el proceso de incremento de la masa de un ser vivo que se produce por el aumento del número de células. Un crecimiento normal se expresa en términos de crecimiento lineal y de aumento de la masa corporal a través del tiempo (9). El crecimiento es la manifestación de la capacidad de síntesis de un organismo y de cada una de las células que lo integran, con un aumento en la relación ácido desoxirribonucleico/proteínas y, una reducción continua de la cantidad de citoplasma que integra a las células (10).

La tasa de crecimiento total es el resultado de factores genéticos, nutricionales y ambientales que pueden estar relacionados con la susceptibilidad a enfermedades en la etapa adulta, sin embargo, existe una variabilidad en el crecimiento humano no solo en el momento de los periodos críticos del patrón de crecimiento, sino también en la magnitud y la tasa de cambio, ocurriendo un cambio radical en la altura debido al cambio en las partes anatómicas que componen la altura total, por ejemplo la longitud de la columna, el fémur y/o la tibia que contribuyen de manera diferente al proceso total (11).

El crecimiento lineal inadecuado en los países en desarrollo ocurre desde el periodo prenatal hasta los dos años de vida, afectando el desarrollo neurológico y cerebral de los niños (12). Durante la infancia y la adolescencia la masa ósea aumenta rápidamente y a partir de entonces entra en un periodo de relativa estabilidad antes de comenzar una disminución relacionada con la edad a medida que se ingresa a la adultez (13).

1.1.2 Crecimiento intrauterino en mamíferos

El crecimiento lineal en humanos se divide en cuatro periodos principales: periodo prenatal, infancia, niñez y pubertad. El proceso inicia cuando se forma el cigoto y se implanta en el endometrio para recibir nutrientes esenciales a través de la pared del útero. El crecimiento intrauterino normal está regulado por factores maternos, fetales y placentarios, el comportamiento normal de estos tres factores permite al feto obtener un crecimiento en

longitud y peso adecuado(14). Un crecimiento intrauterino anormal está asociado a una mayor morbimortalidad perinatal y en la vida adulta con enfermedades metabólicas y cardiovasculares (15).

Durante el desarrollo intrauterino se adquieren de un 25 a 35% de la longitud total del ser humano, 3 a 6% del peso corporal, 50 a 60% del índice de masa corporal y entre un 40 y 80% de la diferenciación funcional (16). La nutrición materna es el factor más importante para permitir el crecimiento fetal óptimo, el crecimiento intrauterino depende principalmente de la función y de la masa placentaria, por lo cual el crecimiento de la placenta es tan importante o aún más que el crecimiento del producto; la placenta es un órgano regulador del crecimiento y de acuerdo al estado nutricional de la madre se permite el aporte de glucosa, aminoácidos y oxígeno que va a asegurar el establecimiento de un estado crónico de anabolismo fetal (17), tomando en cuenta que el incremento en el volumen de la placenta preceda de manera proporcional al crecimiento del producto, esto es importante debido a que entre mayor es la captación de aminoácidos por el producto, existe mayor capacidad de síntesis proteínica y mayor posibilidad de mantener una velocidad de crecimiento intrauterina adecuada (17, 18).

1.1.3 Nutrientes esenciales en el crecimiento

La nutrición implica un aporte de nutrientes y oxígeno, así como la utilización y adecuación metabólica para las necesidades de cada momento y eliminación de elementos no útiles para el funcionamiento orgánico (1). La asociación entre la nutrición y el crecimiento lineal óptimo, se deriva de la obtención adecuada de nutrientes, principalmente proteínas, lípidos e hidratos de carbono, sin embargo, las vitaminas y minerales también juegan un papel importante en el crecimiento (10). La carencia prolongada de aporte calórico suficiente (aun cuando se mantenga un equilibrio adecuado en la proporción de carbohidratos, lípidos y proteínas) disminuye el tejido graso y aumenta el consumo de proteínas tisulares, para finalmente ocasionar la detención del crecimiento (19). Sin embargo, es importante mencionar que la ingesta deficiente de uno o más nutrientes esenciales, produce la detención de crecimiento a corto plazo. Incluso la falta de un solo aminoácido esencial para ese momento del crecimiento, aunque la alimentación sea completa y balanceada por lo demás,

conduce a mayor limitación del crecimiento que una dieta carente de todos los aminoácidos esenciales (20).

Las causas más frecuentes de alteración nutricional, relacionadas con un crecimiento subóptimo son: ingreso económico bajo, malabsorción y utilización anormal de nutrientes, problemas de excreción y aporte insuficiente de oxígeno (10). Estudios tanto en animales como en seres humanos asocian la baja ingesta de proteína con el crecimiento de la masa ósea así como para su conservación y recambio en la edad adulta (21); sin embargo, en la actualidad una alimentación limitada en nutrientes, principalmente de proteínas y aminoácidos esenciales, desencadena trastornos en el crecimiento óseo desde edades tempranas de la vida (desnutrición y retraso en el crecimiento) y en etapa adulta (osteoporosis y riesgo a fracturas) en humanos y ratas (22). Existe evidencia que el aumento de la ingesta de alimentos ricos en proteínas de origen animal y otras fuentes, estimularon el aumento de peso y crecimiento lineal en poblaciones con estado nutricional deficiente o marginal, sin embargo, el mecanismo exacto por el cual las proteínas y aminoácidos modulan la actividad celular durante la formación ósea aún no está completamente dilucidado (23).

1.1.4 Crecimiento y densidad del tejido óseo

El crecimiento óseo constituye un proceso fisiológico único que en la naturaleza no tiene paralelo con el crecimiento de ningún otro tejido (24). El tejido óseo soporta el cuerpo, protege órganos, permite los movimientos y es el tejido con el mayor depósito de minerales, (25). El tejido óseo está formado por tres tipos de células: el osteoblasto productor de matriz, el tejido que reabsorbe el osteoclasto y el osteocito que representa el 90% de todas las células del esqueleto adulto (26).

El hueso está formado por minerales, principalmente en forma de hidroxiapatita de calcio, que se combina con colágeno tipo I y diferentes proteínas especializadas para dar lugar a la matriz ósea (27). Cabe destacar que a su vez el esqueleto está formado por dos tipos de tejido macroscópicamente diferentes que son el hueso trabecular o poroso (localizado principalmente a nivel de los cuerpos vertebrales y de la pelvis) y el hueso cortical o compacto (localizado principalmente en los huesos largos). El hueso trabecular representa el 20% del total de la masa ósea, además de presentar un metabolismo más elevado que el hueso

cortical; debido a esto es más susceptible a los cambios hormonales y terapéuticos. Mientras que el 80% del peso esquelético es aportado por el hueso cortical (28). La evidencia sugiere que esta disminución ocurre porque las células madre de la zona de descanso tienen una capacidad proliferativa finita que se agota gradualmente, en algunos mamíferos, incluidos los seres humanos el cartílago de la placa de crecimiento se reemplaza completamente por hueso en el momento de la maduración sexual, este suceso es denominado como fusión epifisaria y parece desencadenarse cuando la capacidad proliferativa de los condrocitos de la placa de crecimiento termina por agotarse (29, 30).

En la osteoporosis los huesos son más propensos a rupturas y en todos los individuos la pérdida de la masa ósea es un proceso que conlleva a su encogimiento tanto en el periodo de envejecimiento como en el periodo de menopausia para las mujeres, pues en esta etapa la pérdida ósea es aún mayor convirtiéndose en una etapa vulnerable para desarrollar osteoporosis (31, 32). La densidad mineral ósea por área y volumétrica, son los parámetros más utilizados para determinar la pérdida o ganancia de masa ósea para experimentos biológicos y diagnosticar enfermedades óseas para establecer la integridad del esqueleto y medir la cantidad de hueso (33). Las técnicas radiológicas simple es un método indirecto para evaluar la densidad mineral ósea a través de la radiopacidad de los huesos tras la exposición a los rayos X (34).

2.1.5 Mecanismo molecular del crecimiento óseo

La función hormonal es primordial en el crecimiento óseo, ya que este depende de distintas hormonas, por ejemplo: la PTH (hormona paratiroidea) producida en las glándulas paratiroideas, es la hormona hipercalcemiente y realiza su acción a 3 niveles: a) directamente sobre el hueso, estimulando osteoclastos y favoreciendo la resorción ósea, una acción ligada a la presencia de vitamina D; b) en el riñón, incrementando la reabsorción tubular distal de calcio y c) indirectamente sobre el intestino, estimulando la síntesis de 1-25 OH colecalciferol que, a su vez, aumenta la absorción de calcio (35). La hormona calcitonina, producida por las células C de la tiroides, actúa directamente sobre los receptores de osteoclastos, ya que se encarga de regular la concentración de calcio en la sangre. Existe evidencia que en situaciones en las que se produce un aumento en la secreción o en la

ausencia de las células C, la calcemia se mantiene en niveles normales y no hay alteraciones óseas (36).

El hueso actúa, en presencia de PTH, estimulando la diferenciación de los osteoclastos y, por lo tanto, la resorción ósea, posibilitando una mineralización adecuada (7). Sin embargo, la hormona de crecimiento (GH), es el principal regulador del crecimiento lineal, y posee importantes acciones metabólicas. La GH estimula en el hígado la producción del factor del crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I), que vincula a una de las seis proteínas transportadoras. Los IGF son un grupo de factores de crecimiento cuyos efectos están medidos por la acción de la GH, pero que también ejercen influencias anabólicas directas; estos factores ampliamente reconocidos por desempeñar un papel clave en los procesos que vinculan la ingesta y el crecimiento de la dieta, ejerciendo múltiples influencias sobre el hueso de ratas (37) y humanos (38), como lo son proliferación y diferenciación de condrocitos y la estimulación de la actividad de los osteoblastos, dado su potencial en la regulación de la formación y resorción, por lo que se ha sugerido que IGF-I puede ayudar a la meditación de los procesos de acoplamiento de la remodelación ósea, modulando directamente la influencia de la ingesta de nutrientes en el metabolismo óseo (39).

2.1.6 Efecto de la proteína en el tejido óseo

Las proteínas son moléculas estructuralmente complejas, en el organismo cumplen funciones fisiológicas múltiples y de amplio alcance, incluidas las estructurales (colágeno), contráctiles (miosina y actina), inmunes (anticuerpos) y reguladores (enzimas y hormonas) (40). Las proteínas son un nutriente esencial para el hueso, ya que su ingesta en la dieta regula el metabolismo óseo a través de dos aspectos: el aporte de aminoácidos y la transducción de señales; diversos aminoácidos obtenidos de los alimentos ricos en proteína, regulan la proteólisis y la síntesis de proteína, así como la vía de señalización de la hormona de crecimiento/hormona de crecimiento semejante a la insulina (41), modulando también el potencial genético para la adquisición de la masa ósea máxima (42). Existe evidencia que refiere que las proteínas pueden tener un impacto positivo y negativo en el crecimiento óseo, ya que la proteína representa aproximadamente la mitad del volumen de los huesos y alrededor del 33% de su masa, por lo que la resistencia del hueso dependerá de la integridad

de sus componentes proteicos (43). Es importante destacar que la matriz orgánica del hueso está formada por colágeno y proteínas no colágenas, de ahí la importancia de tener una ingesta de proteínas adecuada para que la acumulación de masa ósea durante la infancia y la adolescencia que favorezca el crecimiento y el mantenimiento de la salud ósea en la vejez (44).

Una alta ingesta de proteína en la dieta tiene impactos negativos en los huesos, esto debido a una mayor pérdida de calcio en el esqueleto para compensar un aumento en la carga ácida de los aminoácidos, a lo que se le ha denominado hipótesis de la ceniza ácida (44). Esta hipótesis supone que una mayor excreción de calcio, es resultado de la ingesta alta en proteínas en la dieta para proteger la integridad estructural del tejido óseo (45). Los componentes de proteínas, como los aminoácidos aislados, también actúan para regular el metabolismo óseo a través de una amplia gama de mecanismos, donde se resalta el efecto de las proteínas y aminoácidos en las acciones de hormonas y factores de crecimiento que regulan el metabolismo óseo (fuerza y funcionalidad) (3). El origen de las proteínas también es un factor importante, ya que algunos autores afirman que las proteínas de origen animal tienen mayor contenido de aminoácidos azufrados, por lo que su efecto en el organismo es ácido, mientras que las de origen vegetal (frutas y verduras) tienen una influencia alcalina. Por lo tanto, se ha propuesto que si la dieta es rica en proteínas animales y baja en vegetales induce a un estado de acidosis metabólica de bajo grado, que tiene como consecuencia la afectación del metabolismo óseo (26).

2.1.7 Aminoácidos esenciales en el tejido óseo

Los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por el organismo humano, así que deben ser proporcionados en la dieta, también se definen como aquellos que participan y regulan vías metabólicas clave para mejorar la salud, la supervivencia, el crecimiento, desarrollo, la lactancia y la reproducción de organismos. Estos aminoácidos se requieren para la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas, restricción del crecimiento intrauterino, infertilidad, disfunción intestinal o neurológica y enfermedades infecciosas (46).

El desarrollo del tejido óseo óptimo depende de las proteínas que contenga, el colágeno es la principal proteína, ya que forma parte de la matriz ósea, donde también se depositan calcio y

otros metales; por lo cual la construcción y el funcionamiento adecuado del hueso están relacionados con un colágeno saludable (47). En un estudio se mostró una asociación entre el retraso del crecimiento y bajos niveles circulantes de aminoácidos esenciales en niños de 12 a 59 meses de edad en zonas rurales de Malawi, (48) por lo tanto, la suplementación con ciertos aminoácidos asociados con estados nutricionales como el retraso en el crecimiento puede ser una estrategia efectiva. En los animales, los aminoácidos plasmáticos fluctúan según la ingesta nutricional, particularmente en respuesta al contenido de proteínas y la deficiencia de aminoácidos únicos (49, 50). En un estudio con ratas alimentadas a base de harina de maíz y suplementadas con aminoácidos se observó que los aminoácidos que limitan el crecimiento corporal fueron la lisina y el triptófano, siendo estos dos los principales limitantes en la dieta a base de maíz, otros aminoácidos esenciales como la valina, leucina, isoleucina y metionina mejoraron significativamente el crecimiento después de la suplementación con proteína de soja y lisina, lo que se correlacionó positivamente con la longitud corporal; por lo cual se concluye que la combinación de los aminoácidos evaluados en ese estudio (valina, isoleucina y metionina) es óptima para favorecer el crecimiento lineal en ratas (51).

2.1.8 Isoleucina en el tejido óseo

Los aminoácidos son un sustrato esencial para la síntesis de proteínas y moléculas de señalización para el metabolismo celular (52). La isoleucina es un aminoácido esencial de cadena ramificada que juega un papel importante en las funciones fisiológicas de todo el organismo, como el crecimiento, la inmunidad, el metabolismo de las proteínas, ácidos grasos y el transporte de la glucosa (53). Un estudio realizado *in vitro* de tres tripéptidos entre los cuales destaca el tripéptido IPP (Isoleucina-Prolina-Prolina) refiere que el IPP aumentó la proliferación celular y que algunos genes asociados con la diferenciación celular fueron regulados positivamente, lo que indica que el IPP regula la expresión génica, lo que favoreció la formación de osteoblastos y aumento en la masa ósea (8).

La lisina es un aminoácido esencial, una ingesta deficiente de este se asocia con estados de desnutrición y riesgo de fractura ósea (47). Las dietas a base de cereales como el maíz son un alimento básico e importante en los países de desarrollo, pero contienen proteínas de bajo

valor biológico; la lisina es generalmente en primer aminoácido limitante, seguido del triptófano; las deficiencias en la ingesta de lisina disminuyen la síntesis de proteínas y causan pérdida de peso en los lactantes y trastornos del crecimiento (54, 55).

2.1.9 Aminoácidos no esenciales en el tejido óseo

Los aminoácidos no esenciales regulan la respuesta inmune, producción de citocinas y anticuerpos, destrucción de patógenos, modulación de microbiota intestinal, prevención de algunas enfermedades, entre otras (46). Algunos aminoácidos como la arginina, glutamina y prolina son esenciales para realizar funciones del sistema inmune, esto a través de la síntesis de óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno, actividad antimicrobiana, la secreción de hormonas (insulina, hormona del crecimiento, prolactina y factor de crecimiento similar a la insulina-I) que regulan la actividad de células del sistema inmune y las vías de transducción de señales (56).

Los requerimientos de proteínas y aminoácidos aumentan durante la desnutrición crónica y los estados de enfermedades infecciosas agudas. En un estado inflamatorio, los aminoácidos no esenciales como la glutamina y la arginina se vuelven condicionalmente esenciales, por lo tanto, es importante proporcionar no solo proteínas que contengan tanto aminoácidos esenciales como no esenciales, para promover un crecimiento lineal óptimo así como una respuesta óptima en estados inflamatorios (57, 58).

2.1.10 Prolina y glicina en el tejido óseo

La prolina es un aminoácido no esencial pero muy importante en el metabolismo proteico, ya que constituye un tercio de los aminoácidos en las proteínas de colágeno que comprende un 30% aproximadamente de las proteínas totales (4). La prolina representa aproximadamente un 12% de las proteínas de la leche de los mamíferos, la abundancia de la prolina en la leche es consistente con un alto requerimiento de prolina para el crecimiento y desarrollo neonatal (59). Este aminoácido realiza funciones metabólicas y fisiológicas importantes como la regulación de la expresión genética y diferenciación celular, activación de la señalización de rapamicina mTOR para la síntesis de arginina, poliaminas y proteínas (incluyendo colágeno y elastina) (60).

La glicina es el aminoácido más pequeño de la naturaleza, pero es el constituyente principal de todos los tipos de colágeno en animales y elastina en animales, por lo que juega un papel importante en la nutrición y el metabolismo, por su participación en la síntesis de proteínas (colágeno y elastina) e inhibición de la entrada de calcio a través de la activación del canal controlado por glicina en la membrana celular (6).

La glicina y prolina son aminoácidos no esenciales que forman parte de las proteínas del colágeno tipo I y V, de la matriz ósea, estos aminoácidos representan aproximadamente un 57% de los aminoácidos totales (61). El colágeno óseo confiere muchas propiedades mecánicas del hueso, como la elasticidad, la resistencia a la flexión y dureza que contribuyen a la calidad del hueso, día con día se relaciona aún más la nutrición óptima, con la salud ósea y la desnutrición proteica con la incapacidad de alcanzar la masa ósea máxima durante el crecimiento, desarrollando un riesgo mayor de fracturas en etapas adultas (62). Un estudio refiere que la síntesis de colágeno óseo aumenta en respuesta a la alimentación, siendo predecible en osteoblastos en cultivo de tejidos, por lo que es posible estimular la síntesis de colágeno óseo por medio de aminoácidos y el factor IGF-1 (63). Es por ellos, que la provisión adecuada de glicina y prolina es esencial para la síntesis óptima de colágeno, el crecimiento óseo y la salud óptima de los animales, incluidos los ratones, ratas, cerdos y los seres humanos (4).

2.1 Antecedentes del problema

2.2.1 Retraso del crecimiento

El crecimiento lineal en humanos comenzó a describirse en 1950, en ese momento se descubrió el eje de la hormona del crecimiento (GH) factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), como el sistema central que regula el crecimiento infantil, al cual se le atribuyó la causalidad del retardo en el crecimiento (64). Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que el eje GH-IGF es solo uno de los muchos sistemas reguladores que controlan la condrogénesis en la placa del crecimiento; en consecuencia, el retardo en el crecimiento depende además de múltiples hormonas, factores paracrinos, moléculas de matriz extracelular y proteínas intracelulares que regulan los condrocitos de la placa de crecimiento (64). El retraso en el crecimiento es causado por la disfunción de la placa de

crecimiento que puede resultar de un defecto primario, es decir, un trastorno intrínseco de la placa de crecimiento, o un defecto secundario, en el que la placa de crecimiento se ve afectada por un trastorno en cualquier sitio del organismo (65).

La evidencia que existe en modelos animales indica que mecanismos sistémicos contribuyen a la desaceleración del crecimiento fisiológico. Lo cual parece ser una propiedad intrínseca de los órganos del crecimiento; no obstante, estos mecanismos pueden depender de una señal sistémica (65); la disminución de la ingesta de nutrientes en si no es responsable de la desaceleración del crecimiento, pero participa en la medición local, ya que la disponibilidad de nutrientes como las proteínas y energía regulan el crecimiento celular en parte a través de la vía de señalización de la rapamicina (mTOR) (66).

El crecimiento infantil es el mejor indicador del bienestar general de los niños y el retraso en el crecimiento es un reflejo preciso de las desigualdades sociales; es la forma más prevalente de desnutrición infantil; esto se refleja en millones de niños en todo el mundo que no solo no logran su potencial de crecimiento lineal debido a precarias condiciones de salud y nutrición, sino que también sufren el severo daño físico y cognitivo irreversible que acompaña el crecimiento atrofiado (67). El retraso en el crecimiento a menudo no se reconoce en las comunidades donde la talla baja es tan común que se considera normal. La dificultad para identificar visualmente a estos niños y la falta de evaluación rutinaria del crecimiento lineal en los servicios de salud explican por qué se ha tardado tanto en reconocer la magnitud de esta patología (68) e iniciar tratamientos oportunos para corregirla.

2.2.2 Prevalencia del retraso en el crecimiento

De acuerdo al *The Global Nutrition Report 2021* (GNP) el retraso en el crecimiento afecta a 149,2 millones de niños menores de 5 años, de los cuales un 20.5% son recién nacidos con bajo peso al nacer a nivel mundial (23); estimaciones indican que en el 2025 habrá 127 millones de niños menores de 5 años con retraso del crecimiento (69). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el 2016 menciona que 15 millones de niños menores de 5 años padecen desnutrición crónica (talla baja) (70). En 2012 en el estado de Hidalgo 12.9% de los niños menores de 5 años tenían talla baja, 2.7% bajo peso y 1.1% emaciación (71). El retraso del crecimiento es un resultado, en gran medida de una nutrición inadecuada

durante los primeros 1000 días de vida (gestación y los primeros dos años de vida), el bajo consumo de proteínas está relacionado con el retraso del crecimiento y es irreversible, por lo cual es fundamental para que los niños alcancen su máximo potencial físico de crecimiento (64).

2.2.3 Trastornos del crecimiento lineal y densidad ósea por déficit de proteínas

Uno de los principales trastornos del crecimiento es la desnutrición crónica, que se deriva del retardo en el crecimiento, atrofia la mucosa intestinal y pancreática, disminuyendo la producción de enzimas digestivas; sin embargo, no pierde la capacidad para catabolizar proteínas. Durante el “recambio” proteico el organismo no es capaz de retener nitrógeno, lo que disminuye la velocidad de síntesis proteica dos tercios en comparación con niños sanos (71); las repercusiones de la disminución de síntesis proteica están directamente relacionadas con la reducción preferencial de síntesis del tejido muscular, como respuesta de protección a la deficiencia dietética de aminoácidos esenciales, esta disminución de la retención de nitrógeno también se relaciona con la respuesta disminuida a las lesiones e infecciones (71).

Algunas investigaciones han demostrado que el hueso es un importante órgano endocrino, en el que interviene la leptina, insulina y osteocalcina, todos juegan un papel importante en el desarrollo óseo y metabólico; en un estudio realizado con dietas con diferentes requerimientos de proteínas han demostrado que el estado de nutrición de la madre, no solo afecta la disponibilidad de nutrientes del feto, sino que además predispone la maduración ósea del mismo (72). Estudios finlandeses muestran que el retraso de la maduración puede aumentar el riesgo de fractura de cadera a través de alteraciones en la acumulación de densidad ósea y crecimiento desproporcionado, demostrando que los bebés con retardo en el crecimiento son capaces de presentar recuperación de crecimiento acelerado cuando la ingesta proteica alcanza los requerimientos necesarios para la edad, siempre y cuando estos sean durante los primeros 1000 días de vida(73); los estudios hasta el momento concluyen que la dieta materna influye en la masa ósea a través de la programación de respuestas óseas en relación con la ingesta proteica (74).

2.2.4 Trastornos del crecimiento lineal y densidad ósea por déficit de aminoácidos esenciales

La deficiencia de nutrientes específicos afecta la respuesta de la fase aguda reduciendo la producción de citoquinas o modulando la respuesta de los tejidos efectores de tejido muscular y óseo; en respuesta a ello el organismo busca mecanismos para economizar nitrógeno; mediante la oxidación de aminoácidos esenciales o la disminución de la actividad del ciclo de la urea; los aminoácidos de cadena ramificada (ACR) presentan los descensos mayores, estudios refieren que la deficiencia de ACR como la leucina afecta la síntesis proteica en el músculo (71).

El estudio realizado en la zona rural de Malawi, muestra que los niños con retraso en el crecimiento tienen concentraciones séricas más bajas de los nueve aminoácidos (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina) (48). Por lo tanto, las bajas concentraciones séricas de aminoácidos encontradas en estos niños tienen el potencial de reprimir la síntesis de proteínas y lípidos a través de mTORC1 y así retrasar el crecimiento. Aunque se muestra una concentración baja en los nueve aminoácidos, debe destacarse que la leucina es un aminoácido clave para activar mTORC1, ya que fue el metabolito con mayor asociación en el crecimiento lineal (75).

Existe evidencia que la suplementación con aminoácidos esenciales como la leucina e isoleucina aumentan la ganancia de peso en cerdos lactantes, ya que favorecen la calidad de la leche materna (76), también se han descritos efectos en la ganancia de masa muscular en peces y gallinas, en estas últimas la calidad del huevo aumentó (77). Sin embargo, ninguno de los estudios menciona que el crecimiento óseo se haya visto favorecido con la suplementación, ya que no se realizaron pruebas para evaluar este parámetro.

2.2 Planteamiento del problema

El *The Global Nutrition Report 2021* (GNP) refiere que el retraso en el crecimiento afecta a 149,2 millones aproximadamente de niños menores de 5 años (23). Una alimentación limitada en aporte de macro y micronutrientes desde el inicio de la concepción, durante el embarazo y en los primeros años de vida, desencadena algunos trastornos del crecimiento lineal como desnutrición energético-proteica, kwashiorkor, marasmo y retraso en el crecimiento. Existe evidencia que una ingesta inadecuada de proteína afecta el crecimiento, ya que regula el metabolismo óseo y la vía de señalización de la GH/IGF-1 modulando también el potencial genético para la adquisición de la masa ósea, contribuyendo a la prevalencia del retraso en el crecimiento (41, 42). La matriz ósea conforma un 99% al hueso, del cual un 35% es matriz orgánica: un 90% son proteínas de colágeno tipo I (>95%) y colágeno tipo V (<5%), estos dos tipos de proteínas incluyen en su secuencia una gran cantidad de aminoácidos no esenciales como prolina (13.4%) y glicina (39.7%), y aminoácidos esenciales como la isoleucina (0.4%) el aminoácido minoritario (61). Un estudio realizado en zonas rurales del norte de África mostró una asociación entre el retraso en el crecimiento en niños menores de 5 años y los niveles circulantes en sangre de aminoácidos esenciales, entre los que destaca la isoleucina (48). El retraso de crecimiento incrementa el riesgo de complicaciones e infecciones diarreicas por *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*, además a los 2 años de vida obtuvieron 10 puntos menos en la prueba WISC-R (95% IC 2.4–17.5) en comparación con niños sanos (78); además de que incrementa el riesgo de osteoporosis y fractura en la edad adulta (62) .

Por ello se considera pertinente evaluar el efecto de la suplementación con isoleucina, prolina y glicina en el crecimiento y radiopacidad ósea de huesos largos y dientes en las crías de rata Wistar, quienes durante su gestación y lactancia tuvieron restricción de proteínas en sus madres; esto permitirá contar con evidencia científica para el diseño de formulaciones con aminoácidos a utilizar en organismos con estas condiciones.

JUSTIFICACIÓN

El crecimiento lineal inicia desde la concepción, es decir, un crecimiento intrauterino normal asegura una talla y peso adecuado, sin embargo, cuando el crecimiento intrauterino es limitado por el aporte de nutrientes esenciales, proteína y aminoácidos principalmente, se presentan trastornos del crecimiento óseo, siendo el retraso en el crecimiento en la infancia y la osteoporosis en adultos los principales problemas a atender en humanos. El consumo de proteínas de alto valor biológico es deseable en la prevención de estas patologías, sin embargo, existen condiciones que limitan su consumo y desencadenan la enfermedad. La identificación de los aminoácidos responsables del crecimiento y la densidad ósea permitirá diseñar formulaciones específicas que contribuyan en la prevención y tratamiento de patologías óseas. Es limitada la evidencia del efecto independiente de la isoleucina en el crecimiento óseo, aunque, se conoce que hay proteínas que utilizan a la isoleucina como cofactor para la síntesis de tejido óseo. Un proyecto previo realizado en el Laboratorio de Nutrición Molecular del ICSa-UAEH en el que se evaluó la suplementación de aminoácidos esenciales (histidina, isoleucina, leucina, lisina, treonina, triptófano y valina) con el crecimiento óseo en ratas Wistar, se obtuvo como resultado un crecimiento de huesos largos similar entre el grupo control y el grupo suplementado con isoleucina, aunque no fue posible la evaluación de la radiopacidad ósea, esto asociado a la evidencia previa que refiere que el tripéptido IPP aumenta la formación de osteoblastos por un efecto positivo en la masa y estructura ósea. Por lo que es pertinente que en este trabajo se evalué el efecto de la suplementación con isoleucina, prolina y glicina sobre la restricción de proteína materna y el periodo de gestación y lactancia.

Los resultados proveerían de evidencia científica sobre el efecto de la suplementación con isoleucina, glicina y prolina en el crecimiento óseo de crías de madres con restricción proteica, lo que potencialmente podría justificar una intervención o ensayo clínico en niños menores de 5 años con retraso en el crecimiento, para prevenir y disminuir los efectos de las deficiencias de aminoácidos esenciales y las complicaciones por fracturas y osteoporosis en la vida adulta.

HIPÓTESIS

La suplementación con isoleucina, prolina y glicina en las ratas hembra Wistar con restricción proteica tiene un efecto positivo en el crecimiento y radiopacidad ósea de incisivos y en los huesos largos de las patas delanteras y traseras de sus crías.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con isoleucina, prolina y glicina durante la gestación y la lactancia en el crecimiento y la densidad ósea de incisivos y huesos largos de crías de ratas Wistar con restricción proteica.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de hemoglobina en ratas hembra Wistar con restricción proteica al 65 % de su requerimiento diario, durante la gestación y lactancia asociado a la ingesta de una dieta suplementada con isoleucina, prolina y glicina.
2. Evaluar el peso final, niveles de hemoglobina y albúmina en crías de ratas hembra Wistar con restricción proteica al 65 % de su requerimiento diario de proteína que fueron suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.
3. Evaluar el peso y longitud de fémur, tibia, humero y olecranon de crías de ratas Wistar al día 22 de vida con restricción proteica al 65 % de su requerimiento diario de proteína suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.
4. Determinar la densidad ósea de fémur, tibia, humero y olecranon de crías de ratas Wistar con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina mediante una radiografía simple.

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo y diseño de estudio

Estudio de tipo experimental, longitudinal prospectivo.

6.2 Selección de la población

Las ratas hembra Wistar de 4 semanas de edad fueron asignadas de forma aleatoria a cada grupo de estudio, grupo control y grupo bajo en proteínas (GBP). Después de la depleción proteica, las hembras del GBP fueron asignadas aleatoriamente a los grupos de suplementación.

6.2.1 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- Ratras hembra Wistar de 4 semanas de edad vírgenes.
- Ratras Wistar libres de cualquier patógeno.
- Ratras Wistar macho adultos para el periodo de apareamiento.

Exclusión:

- Animales de laboratorio con algún proceso patológico agudo o crónico.
- Animales que no consuman la dieta con restricción proteica.
- Animales que no consuman la dieta suplementada con isoleucina, glicina o prolina.

Eliminación:

- Animales que presenten alteraciones en sistema nervioso o comportamientos atípicos por efecto de la restricción proteica.
- Crías que no sean alimentadas por sus madres.
- Animales que se coman a sus crías durante el periodo de gestación o lactancia.

6.3 Tamaño de la muestra y muestreo

Muestreo no probabilístico con 24 ratas Wistar (20 hembras y 4 machos) del Bioterio del ICSa; para esto se formaron 4 grupos de estudio con 4 ratas hembra cada uno y 1 macho por cada grupo (para el apareamiento de las hembras).

6.4 Definición de variables

Tabla 1. Definición operacional de variables del estudio

Variab les	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
DEPENDIENTES			
Hemoglobina	Concentración de hemoglobina en sangre.	Muestra capilar de la última porción de la cola de la rata madre cuantificada con un fotómetro portátil (HemoCue®).	g/dL
Albúmina	Concentración de albúmina en suero.	Muestra de suero cuantificada por método colorimétrico con un lector de placas BioTek®	g/dL
Proteínas totales	Concentración sérica de proteínas totales.	Muestra de suero cuantificada por método colorimétrico con un lector de placas BioTek®.	mg/dL
Ingesta de energía	Cantidad de energía y nutrientes ingeridos.	Ingesta de alimento en ratas madres medida con una báscula TANITA KD-160®.	g
Longitud ósea	Longitud en los huesos de patas delanteras y traseras.	Medición con un vernier Scala® para determinar la longitud entre la cabeza del húmero y el cóndilo del húmero y entre la cabeza del radio y la apófisis estiloides del radio.	mm
Densidad ósea	Medida de la imagen de radiopacidad en los huesos.	Estimulación de rayos X con sensor digital.	g/cm ²
Ganancia de peso	Cambio de peso semanal de ratas Wistar.	Registro de peso en balanza Triple Beam 700/800 series OHAUS®, con una precisión de 0.1 g.	g
INDEPENDIENTES			
Dieta AIN-93M	Dieta AIN-93M de mantenimiento para roedores.	Dieta para grupo control en periodo de acondicionamiento (14% proteína).	g

Dieta AIN-93M al 64%	Dieta AIN-93M al 64% del requerimiento diario de proteína.	Dieta AIN-93M al 9% de proteína para lograr un estado de depleción proteico previo a la gestación.	g
Dieta AIN-93G	Dieta AIN-93 G para periodo de gestación en roedores.	Dieta AIN-93G para grupo control en periodo de gestación y lactancia (19% proteína).	g
Dieta baja en proteínas	Dieta AIN-93G modificada en proteínas	Dieta AIN-93G modificada al 12% de proteína total, grupo bajo en proteína (GBP).	g
Dieta con isoleucina	Dieta AIN-93G modificada en proteínas	Con una dieta AIN-93G modificada al 12% de proteína total y suplementada con 2 veces el requerimiento de isoleucina (GBP-ISO)	g
Dieta con isoleucina y prolina	Dieta AIN-93G modificada en proteínas	Con una dieta AIN-93G modificada al 12% de proteína total y suplementada 2 veces el requerimiento de isoleucina y prolina (GBP-IP)	g
Dieta con isoleucina, prolina y glicina	Dieta AIN-93G modificada en proteínas	Dieta AIN-93G modificada al 12% de proteína total y suplementada 2 veces el requerimiento de isoleucina, prolina y glicina (GBP-IPG)	g

6.5 Diseño experimental

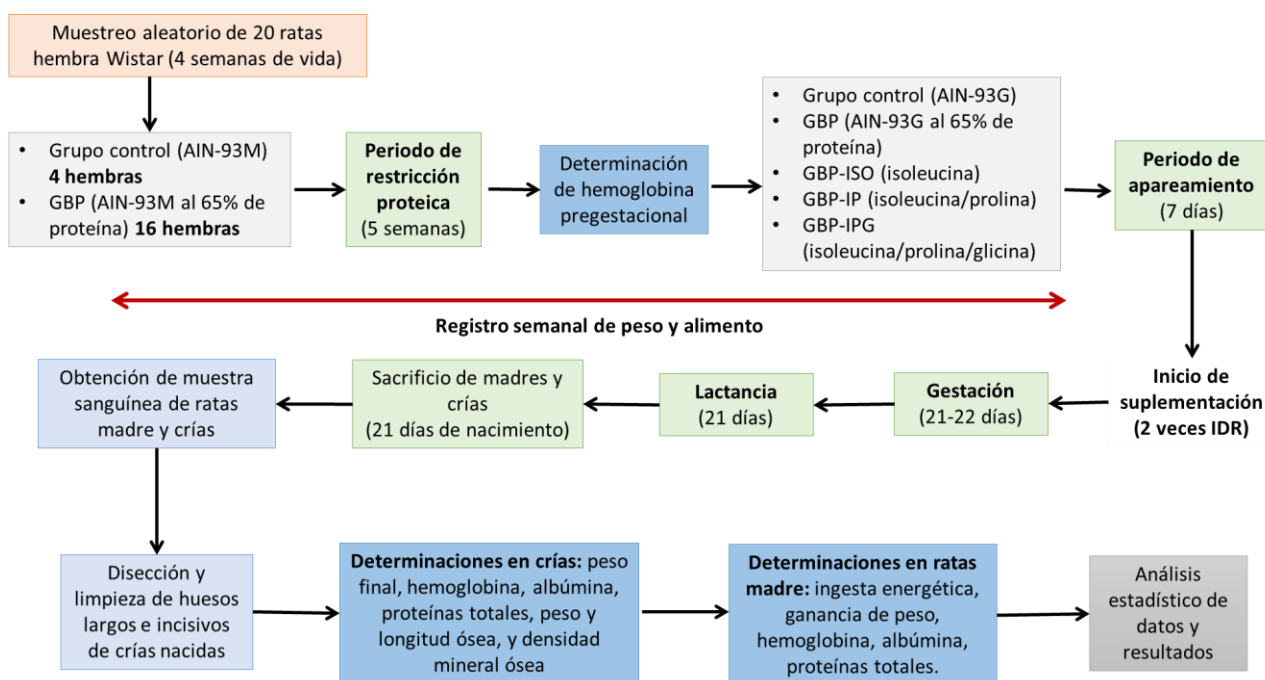


Figura 1. Diseño experimental del estudio

Se realizó un muestreo aleatorio de 20 ratas hembra Wistar de 4 semanas de vida, asignándolas a dos grupos de estudio: 1) grupo control (4 hembras) y 2) grupo bajo en proteína (GBP, 16 hembras); las cuales fueron alimentadas con una dieta AIN-93M estándar para el grupo control (14% de proteína/100 g de alimento) y al 65% del requerimiento de proteína para el GBP (9% de proteína/100 g de alimento). En el GBP se inició con el periodo de restricción proteica durante 5 semanas (con dieta baja en proteínas), al término de este periodo se cuantificó en las ratas la hemoglobina para verificar la depleción proteica. Las 16 hembras del GBP con depleción proteica se reasignaron a los 4 grupos de suplementación, con 4 hembras cada uno; GBP-ISO (dieta baja en proteínas con 2 veces el requerimiento de isoleucina), GBP-IP (dieta baja en proteínas con 2 veces el requerimiento de isoleucina y prolina) y GBP-IPG (dieta baja en proteínas con 2 veces el requerimiento de isoleucina, prolina y glicina), para el grupo control se conservaron las hembras asignadas desde el inicio a la Dieta normoproteica.

Posterior a la asignación de los grupos, inició el periodo de apareamiento que duro aproximadamente 7 días, los grupos de estudio consumieron durante todo el periodo de gestación y lactancia las dietas con isoleucina, prolina o glicina. Al día 22 de vida de las crías se realizó el sacrificio de estas y sus madres, para recolectar una muestra de sangre y posteriormente realizar la disección y limpieza de huesos largos de patas delanteras y traseras, así como los incisivos en las crías. En el suero o sangre total de las crías y de las madres se cuantificó la hemoglobina, albúmina y proteínas totales; los huesos se pesaron y se les midió la longitud y densidad ósea. Una vez registrados los datos de las determinaciones se realizó el análisis estadístico y la redacción y discusión de los resultados.

6.6 Métodos

6.6.1 Animales de experimentación

Las ratas Wistar se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) en el Instituto de Ciencias de la Salud. Se utilizaron inicialmente 20 ratas Wistar hembra de 4 semanas de vida y 4 machos adultos solo para el periodo de apareamiento.

6.6.2 Condiciones de alojamiento

Durante el periodo de experimentación los animales se alojaron en el bioterio ubicado en las instalaciones del ICSa-UAEH, en cajas de acrílico, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos de luz/obscuridad de 12/12 horas respectivamente. Durante todo el experimento el acceso al alimento fue controlado. En función de la etapa del protocolo experimental, los animales se alojaron en grupos de 4 animales (periodo de acondicionamiento) o de 2 animales (periodo de apareamiento: macho y hembra) en cajas de acrílico, en forma individual se mantuvieron a las madres para las etapas de gestación y lactancia.

6.6.3 Dietas

Las dietas utilizadas fueron la AIN-93M y la AIN-93G para roedores (79), con modificaciones para cada grupo de estudio, en la Tabla 2 se muestra la composición de

nutrientes de cada una de las dietas estándar. El alimento de las dietas se elaboró en el Laboratorio de Nutrición Molecular del ICSa-UAEH, tomando como referencia las dietas AIN-93M y AIN-93G, para las distintas formulaciones de cada grupo de estudio (Tabla 3). Una vez elaborado, el alimento se colocó en charolas para su secado a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó refrigeración en bolsas Ziploc® para su conservación.

Las hembras de 4 semanas de vida fueron expuestas durante 5 semanas a una restricción de proteína, alimentadas con la dieta AIN-93M al 9% de proteína, lo que representara el 65% de su requerimiento diario, para lograr un estado de depleción proteica antes de la gestación (PAG), las hembras control no fueron expuestas a esta depleción proteica, consumieron la dieta estándar AIN-93M, Tabla 3. Durante el apareamiento, gestación y lactancia (PGL) se colocó 1 hembra en cada caja, quién fue alimentada de acuerdo con el grupo de experimentación asignado:

1. Con una dieta AIN-93G (grupo control).
2. Con una dieta AIN-93G modificada al 9% de proteína total, grupo bajo en proteína (GBP).
3. Con una dieta AIN93G modificada al 9% de proteína total, suplementada con 2 veces el requerimiento de isoleucina (GBP-ISO).
4. Con una dieta AIN93G modificada al 9% de proteína total y suplementada con 2 veces el requerimiento de isoleucina y prolina (GBP-IP).
5. Con una dieta AIN93G modificada al 9% de proteína total y suplementada con 2 veces el requerimiento de isoleucina, prolina y glicina (GBP-IPG).

Las crías nacidas de las ratas del grupo 1 al 5 se alojaron con sus madres durante el periodo de lactancia. El día 22 de vida, las crías fueron separadas de sus madres para pesarlas y realizar el sacrificio, en estos animales se tomó una muestra sanguínea y se diseccionaron las patas delanteras y traseras.

Tabla 2. Composición de nutrientes en la dieta AIN-93G y AIN-93M para roedores

Nutriente	Dieta g/kg	
	AIN-93G	AIN-93M
Energía total (<i>kcal</i>)	3766.0	3601.0
Proteína (%)	19.3	14.1
HCO (%)	64.0	75.9
Grasas (%)	16.7	10.0
Humedad (g)	66.0	68.0
Grasa total (g)	70.0	40.0
Saturado (g)	10.8	6.2
Monoinsaturado (g)	16.3	9.3
Poliinsaturado (g)	40.5	23.1
Ácido Linoleico (g)	35.7	10.4
Ácido Linolénico (g)	4.8	2.7
Carbohidratos totales (g)	643.7	727.3
Carbohidratos complejos (g)	360.1	421.9
Azúcares simples (g)	236.1	257.9
Celulosa (g)	47.5	47.5
Proteína total (g)	178.6	125.8
Alanina (g)	4.6	3.3
Arginina (g)	6.4	4.5
Ácido aspártico (g)	12.2	8.0
Cisteína (g)	3.7	2.4
Ácido glutámico (g)	36.3	25.5
Glicina (g)	3.2	2.3
Histidina (g)	4.6	3.3
Isoleucina (g)	8.5	5.9
Leucina (g)	15.4	10.9
Lisina (g)	13.0	9.2
Metionina (g)	4.6	3.3
Fenilalanina (g)	8.8	6.2
Prolina (g)	20.5	14.3
Serina (g)	9.7	6.7
Treonina (g)	6.7	4.7
Triptófano (g)	2.1	1.6
Tirosina (g)	9.3	6.6
Valina (g)	10.0	7.0
Ceniza total (g)	41.7	38.9

Tabla tomada del artículo: Reeves, P. G. y colaboradores (79).

6.6.4 Apareamiento

Una vez concluido el periodo de depleción proteica con la dieta AIN-93M al 9% de proteína total, las hembras vírgenes fueron inducidas al apareamiento con machos adultos. Se colocaron de forma individual una hembra con un macho durante 7 días continuos. El apareamiento se confirmó por la presencia del tapón espermático en la vagina de la hembra. Esta confirmación delimitó el inicio de la gestación.

6.6.5 Gestación y lactancia

Desde el inicio y hasta el final de la gestación y, durante el periodo de lactancia, las hembras fueron alojadas individualmente en cajas de acrílico, teniendo un control de alimento y agua en función del grupo asignado aleatoriamente. La gestación tuvo una duración de aproximadamente 21-22 días. El día del parto se registró el número de crías en cada hembra de los 5 grupos de estudio. La lactancia se continuó durante los 21 días posteriores al nacimiento, al día 22 de vida las crías fueron destetadas y sacrificadas. El día del sacrificio se ajustó el número de crías por grupo asignado a 8 hembras y 8 machos.

Tabla 3. Formulaciones de la dieta administrada durante el periodo de restricción proteica (AIN-93M), gestación y lactancia (AIN-93G) en ratas hembra Wistar

Ingredientes	Control		GBP		GBP-ISO	GBP-IP	GBP-IPG
	PAG	PGL	PAG	PGL	PGL		
	g/kg dieta						
Almidón de maíz	466	398	516	518	518	518	518
Caseína	140	190	90	120	120	120	120
Dextrina	155	132	155	132	132	132	132
Sacarosa	100	100	100	100	100	100	100
Aceite de soja	40	70	40	70	70	70	70
Fibra	50	50	50	50	50	50	50
Mix de minerales	35	35	35	35	35	35	35
Mix de vitaminas	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	1.8	3	1.8	3	3	3	3
Bitartrato de colina	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Isoleucina	-	-	-	-	13.6	13.6	13.6
Prolina	-	-	-	-	-	20.4	20.4
Glicina	-	-	-	-	-	-	3.2

PAG= periodo antes de la gestación, PGL= periodo de gestación y lactancia, Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-ISO=grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP.IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina y prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, prolina y glicina. Tabla adaptada del artículo: Reeves, P.G. y colaboradores.

6.6.6 Registro de peso

Se registró el peso corporal de cada rata madre al inicio del proyecto y posteriormente cada 7 días hasta el final de la gestación, con la finalidad de observar cambios de peso de las ratas gestantes, para esta actividad se ocupó una balanza Triple Beam 700/800 series OHAUS®, Nueva Jersey, con una precisión de 0,1 g. Se registró el peso corporal de las ratas cría al final de la lactancia con la finalidad de observar diferencias de peso en los distintos grupos de estudio.

En cuanto a la ingesta de energía en las madres, se realizaron mediciones continuas (3 veces por semana) del consumo de alimento con una báscula TANITA KD-160®. Con base en estos consumos y en el aporte calórico por gramo de alimento para cada formulación, Tabla 3 y 4; se calculó la ingesta de energía semanal en Kilocorías ingeridas para cada grupo de

estudio, así como la ingesta total de energía durante el PAG y PGL, sumando las semanas correspondientes a cada uno de los periodos de estudio.

Tabla 4. Aporte calórico por gramo de alimento para cada grupo de estudio

	Kcal/g
Control (PAG)	3.95
Control (PGL)	3.96
GBP (PAG)	3.88
GBP (PGL)	3.92
GBP-ISO	4.01
GBP-IP	4.06
GBP-IPG	4.12

PAG=antes de la gestación, PGL=gestación y lactancia.

6.6.7 Sacrificio

Previo al sacrificio (12 horas antes) el alimento fue retirado a todos los animales, solo se dejó agua a todos los grupos, para tomar la muestra de sangre en condiciones post absorbidas. Para sacrificarlas las ratas fueron anestesiadas utilizando el anestésico ISOFLURAN marca Vedco®. La sangre obtenida fue centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, en la centrifugadora DRAGONLAB®, modelo DM0412 para obtener el suero, el cual se congeló a -30 °C; posterior a esto, se realizó a la disección de los incisivos y los huesos largos de patas traseras y delanteras de las crías.

6.6.8 Medición de albúmina y hemoglobina

Se midió hemoglobina en sangre total de ratas Wistar antes del apareamiento para confirmar el estado de depleción proteica en el GBP, se tomó una muestra de sangre capilar de la última porción de la cola, para determinar la concentración de hemoglobina, utilizando un fotómetro portátil (HemoCue®) según las recomendaciones del fabricante. Esta medición se llevó a cabo en dos momentos de la intervención, al inicio de la gestación (ratas madre) y al finalizar el periodo de lactancia (ratas madre y crías) para diagnosticar el nivel de hemoglobina basal y determinar los efectos de la suplementación. Como referencia se utilizaron los valores de

referencia de 11.0 ± 1.0 g/dL para las crías macho y 13.0 ± 1.0 g/dL para las hembras en el primer mes de vida y, en las madres adultas de 13.0 ± 1.0 g/dL (80).

Se midió albúmina en suero extraído de la muestra de sangre en el sacrificio. El suero se mantuvo en congelación hasta su análisis (-30°C). Se determinó el nivel de albúmina en suero por un método colorimétrico, utilizando un *kit* de (Wiener Lab®). En una microplaca se colocó 1 microlitro de suero y 250 microlitros de reactivo, se mezcló y se incubó entre 15 y 28°C durante 10 minutos, la microplaca se leyó en un lector de placas (BioTek®, modelo 146583 E.U.A) a 625 nm. Para obtener la concentración de albúmina se utilizó la siguiente fórmula (81):

$$\frac{\text{Albúmina}}{\text{Estándar}} \times \text{Desconocido}$$

La albúmina se midió en las ratas madre y sus crías al final de la intervención, utilizando 3.28 ± 0.48 g/dL como valor de referencia para las ratas madre y de 2.76 ± 0.3 g/dL para las crías (82).

6.6.9 Disección de huesos largos

Las crías de las madres alimentadas durante su gestación y lactancia con las dietas control, GBP, GBP-ISO, GBP-IP y GBP-IPG; fueron sacrificadas en el día 22 de vida, para realizar la disección de la pata delantera y trasera derecha. La disección de la pata delantera (figura 2) se realizó cortando entre la cabeza del húmero y la cavidad glenoidea de la escápula. Posteriormente se separó la pata delantera entre los carpelos y el radio. Después se realizó la separación del músculo del hueso, para dejar libre a los huesos, los cuales fueron limpiados con una solución al 1.0% de Tergacyme a 50°C en un periodo de 48 horas. El hueso sin rastros de tejido o músculo fue medido con un vernier (Scala®) para sacar la longitud entre la cabeza del húmero y el cóndilo del húmero y entre la cabeza del radio y la apófisis estiloidea del radio.

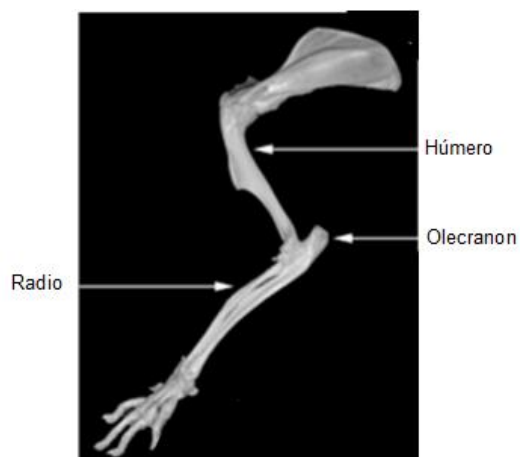


Figura 2 Imagen de huesos de pata delantera derecha de roedor. Imagen tomada de: Atlas Sketal System (83).

La disección de la pata trasera (figura 3) se realizó cortando entre la cabeza del fémur y el acetábulo del ilion y el isquion. Posteriormente se separó la pata trasera haciendo una incisión entre los huesos de la fíbula, la tibia y el tarso. Después se realizó la separación del músculo del hueso, para dejar libre a los huesos, los cuales fueron limpiados con una solución al 1.0% de Tergacyme a 50 °C en un periodo de 48 horas. El hueso sin rastros de tejido o músculo fue medido con un vernier (Scala®) para sacar la longitud entre la cabeza del fémur y la rótula y entre la eminencia intercondilar y maléolo lateral y medial.

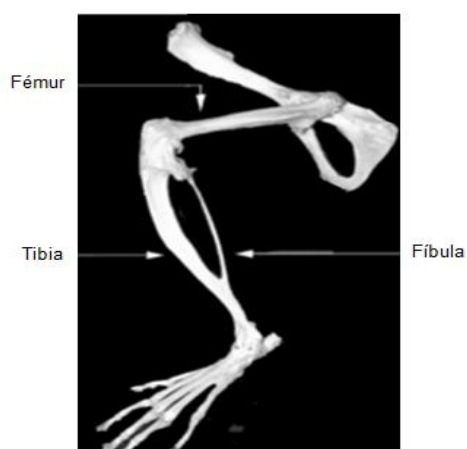


Figura 3. Imagen de huesos de pata trasera derecha de roedor. Imagen tomada de: Atlas Sketal System (83).

6.6.10 Extracción de incisivos inferiores

La extracción de los incisivos inferiores de las ratas crías se realizó posterior al sacrificio, para la extracción se utilizó un periotomo PT2 (Hu-Friedy) usando modificaciones y fórceps (figura 4) (84). Una vez que se obtuvieron los incisivos se realizó la separación del músculo del incisivo, los cuales fueron limpiados con una solución al 1.0 % de Tergacyme a 50 °C en un periodo de 48 horas. Los incisivos sin rastros de tejido o músculo fueron medidos con una cinta antropométrica (SECA®)



Figura 4. Extracción de incisivos inferiores de rata Wistar. Imagen tomada de Koshwanto, 2019 (84)

6.6.11 Determinación de densidad ósea con radiografía simple

Para realizar esta determinación en los huesos de ratas crías se utilizó un radiovisiógrafo Corix 70 Plus-USV con sensor digital (Suni Plus Digital Radiography System). Por estimulación de rayos X a las muestras óseas con una exposición de 0.15 segundos, se obtuvieron imágenes digitalizadas por medio del software Dr. Suni. Una vez que fue iniciado el programa se hizo un registro de las muestras para así poder identificarlas, posteriormente las muestras óseas se colocaron una por una en la placa de rayos X, se acercó al sensor y se colocó a una distancia de 1.0 cm centrado las muestras, se presionó el botón para la exposición de 0.15 segundos y se retiró la muestra (85).

Al obtener las imágenes éstas fueron analizadas mediante el programa Adobe Photoshop CC 2019©, al iniciar el programa se introdujo cada imagen, en la sección de ventana se eligió la

opción de histograma con vista expandida, la cual dio el promedio de los píxeles seleccionados en la región de interés; este valor nos da la densidad de la imagen seleccionada, se tomaron tres mediciones en diferentes zonas de los huesos que fueron la parte media de la epífisis proximal, diáfisis y epífisis distal (Figura 5); se sacó un promedio de los píxeles de cada hueso en cada grupo, midiendo así su nivel de densidad por radiografía simple permitiendo también registrar las partes radiopacas o más blancas, las cuales tienen una mayor densidad o bien las partes radiolúcidas o más oscuras, lo cual se interpretaron con una menor densidad.

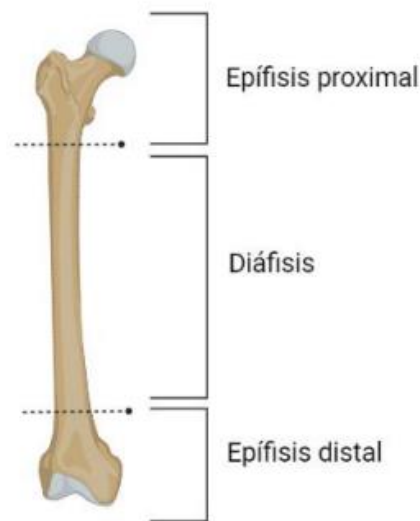


Figura 5. Puntos de mediciones para realizar la densidad óptica de los huesos de patas delanteras y traseras de las crías Wistar.

6.7 Aspectos éticos

Este proyecto de investigación fue sometido y aprobado por el CIEQUAL (Comité Institucional de Ética, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAEH), con número de folio CICUAL/001/2021, el cual se rige por la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

6.8 Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se utilizó el programa estadístico SPSS© (Statistical Package for Social Sciences) versión 21.0 para Windows. Se describió las variables cuantitativas como promedios \pm desviación estándar, se probó la homogeneidad de las variancias con el estadístico de Levene para decidir la prueba estadística que se utilizó. Para comparar dos grupos se usó una prueba de t-Student o U de Mann-Whitney y las comparaciones entre diferentes dietas y grupos en tratamiento se determinó mediante ANOVA de una vía, post test Bonferroni o T3 de Dunnett. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La concentración de hemoglobina al inicio de la gestación no tuvo diferencias significativas entre las hembras del grupo control y el grupo bajo en proteína ($p=0.286$), lo mismo se observó al final de la lactancia (17.39 ± 0.12 dL vs 17.05 ± 0.51 dL, $p=0.060$ respectivamente), tabla 5.

Tabla 5. Hemoglobina al inicio de la gestación y final de la lactancia en ratas hembra Wistar con restricción proteica

	Control	GBP	p
HbIn (g/dL)	17.97 ± 0.83	17.25 ± 1.22	0.286
HbFn (g/dL)	17.05 ± 0.51	17.39 ± 0.12	0.060

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, HbIn= hemoglobina al inicio de la gestación, HbFn= hemoglobina al final de la lactancia, P= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student.

Al final de la gestación y lactancia, las ratas hembra Wistar registraron una concentración de hemoglobina mayor para los grupos GBP-ISO, GBP-IP, GBP-IPG, en comparación con el grupo control (19.7 ± 0.5 g/dL, 20.6 ± 1.2 g/dL, 21.2 ± 0.5 g/dL, 17.0 ± 0.5 g/dL, $p=0.005$, respectivamente), tabla 6. La medición de albúmina no tuvo diferencias significativas entre los grupos bajos en proteína suplementados y el grupo control ($p=0.654$), tabla 6. En cuanto a la determinación de proteínas totales, la concentración tiende a ser mayor para el grupo control y grupo GBP-IPG, en comparación con el grupo GBP-IP, (8.7 ± 1.2 mg/dL, 8.4 ± 0.7 mg/dL, 6.6 ± 0.03 mg/dL, $p=0.159$, respectivamente), tabla 6.

Tabla 6. Indicadores proteicos al final de la gestación y lactancia en ratas hembra Wistar con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.

	Control	GBP	GBP-ISO	GBP-IP	GBP-IPG	p
Hb (g/dL)	17.0 ± 0.5^a	17.4 ± 0.1	19.7 ± 0.5	20.6 ± 1.2^b	21.2 ± 0.5^b	0.005
Alb (mg/dL)	3.4 ± 0.03	3.4 ± 0.06	3.5 ± 0.04	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.08	0.654
Ptotal (mg/dL)	8.7 ± 1.2	7.9 ± 0.6	7.7 ± 0.4	6.6 ± 0.03	8.4 ± 0.7	0.159

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-ISO= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP-IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina y prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, prolina y glicina, Hb= hemoglobina al final de la lactancia, Alb= albúmina al final de la lactancia, Ptotal= proteínas totales al final de la lactancia, p= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student.

La ingesta energética de las ratas hembra Wistar ajustada por número de cría durante la gestación fue mayor para el grupo GBP-ISO (235.6 ± 100.9 kcal), en comparación con el promedio (176.6 ± 52.5 kcal, $p=0.001$) del resto de los grupos de estudio (control, GBP, GBP-IP, GBP-IPG), tabla 7. La ganancia de peso en ratas Wistar por cría durante la gestación fue mayor para el grupo control, en comparación con resto de los grupos de estudio (102.8 ± 7.4 g, 91.0 ± 5.9 g, 78.7 ± 15.4 g, 81.6 ± 12.1 g, 84.6 ± 4.6 g, respectivamente, $p=0.029$).

Tabla 7. Ingesta energética y ganancia de peso durante la gestación en ratas hembra Wistar con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.

	Control	GBP	GBP-ISO	GBP-IP	GBP-IPG	p
IngGest (kcal)	1663 ± 235^a	1743 ± 98	1478 ± 135	1156 ± 107^b	1334 ± 138	0.000
N. Crías	10.2 ± 2.2	11.5 ± 1.3	7.3 ± 3.0	7.5 ± 1.3	7.7 ± 1.0	0.020
IngGestC (kcal)	170 ± 53^a	153 ± 19	235 ± 100^b	162.2 ± 37	172 ± 14	0.001
GanGest (g)	102.8 ± 7.4^a	91.0 ± 5.9	78.7 ± 15.4^b	81.6 ± 12.1^b	84.6 ± 4.6	0.029

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-ISO= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP-IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina y prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, prolina y glicina, IngGest= ingesta energética total durante la gestación, IngGestC= ingesta energética ajustada por cría durante la gestación, GanGest= ganancia de peso durante la gestación, P= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student.

El peso de las crías de ratas hembra Wistar al final de la lactancia presentó diferencias estadísticamente significativas tanto en hembras como en machos. El peso de las crías hembra fue menor para el grupo control, en comparación con los grupos GBP-ISO, GBP-IP, GBP-IPG, (35.2 ± 1.1 g, 39.0 ± 5.8 g, 41.2 ± 3.4 g, 39.7 ± 4.6 , $p=0.001$, respectivamente), tabla 8. El peso de las crías macho y hembra fue mayor para los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina en comparación con el grupo control ($p=0.001$), tabla 8.

La concentración de hemoglobina fue mayor para las crías hembra y macho del grupo control (10.7 ± 0.6 g/dL, 11.1 ± 0.8 g/dL, respectivamente), en comparación con el grupo bajo en proteína (8.1 ± 0.4 g/dL, 8.5 ± 0.2 g/dL, respectivamente), sin diferencias significativas con el resto de los grupos de estudio, tabla 8. La albúmina no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las crías hembra y macho de todos los grupos de estudio. En cuanto a la determinación de proteínas totales en las crías hembra al final de la lactancia, fue mayor la concentración en el grupo control en comparación con el grupo bajo en proteína

(7.54 ± 0.4 mg/dL, 5.63 ± 1.1 mg/dL, $p= 0.001$, respectivamente) sin diferencias con el resto de los grupos, tabla 8.

Tabla 8. Peso e indicadores proteicos al día 22 de vida en crías nacidas de ratas hembra Wistar suplementadas con isoleucina, prolina y glicina

	Control	GBP	GBP-ISO	GBP-IP	GBP-IPG	p
Machos						
Pcrías (g)	35.6 ± 1.8^a	34.5 ± 2.7	43.0 ± 4.3^b	43.9 ± 5.6^b	39.9 ± 0.6^b	0.001
Hb (g/dL)	11.1 ± 0.8^a	8.5 ± 0.2^b	10.6 ± 1.0	11.2 ± 0.9	11.2 ± 0.5	0.001
Alb (mg/dL)	2.98 ± 0.2	2.96 ± 0.2	3.10 ± 0.4	3.02 ± 0.3	2.84 ± 0.2	0.341
Ptotal (mg/dL)	7.39 ± 0.5^a	6.84 ± 1.5	6.14 ± 1.6^b	5.38 ± 0.7^b	6.65 ± 0.8	0.001
Hembras						
Pcrías (g)	35.2 ± 1.1^a	34.5 ± 1.2	39.0 ± 5.8^b	41.2 ± 3.4^b	39.7 ± 4.6^b	0.001
Hb (g/dL)	10.7 ± 0.6^a	8.1 ± 0.4^b	10.9 ± 1.0	10.9 ± 0.7	11.5 ± 0.5	0.001
Alb (mg/dL)	2.88 ± 0.1	2.90 ± 0.2	3.15 ± 0.3	2.94 ± 0.2	2.92 ± 0.2	0.341
Ptotal (mg/dL)	7.54 ± 0.4^a	5.63 ± 1.1^b	6.52 ± 1.0	6.64 ± 0.2	6.38 ± 0.4	0.001

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-ISO= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP-IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina y prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, prolina y glicina, Hb= hemoglobina al día 21 de vida, Alb= albúmina al día 21 de vida, Ptotal= proteínas totales al día 21 de vida, p= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett.

La longitud promedio de los huesos largos de las patas delanteras y traseras en crías hembra y macho de ratas Wistar fue mayor para el grupo control en comparación con el grupo bajo en proteína ($p=0.001$), tabla 9. Los huesos húmero, olécranon, radio, tibia y fémur de las crías macho de ratas Wistar del grupo GBP-IP registraron una longitud mayor (1.20 ± 0.06 cm, 1.54 ± 0.05 cm, 1.26 ± 0.04 cm, 1.80 ± 0.07 cm, 1.33 ± 0.08 cm, respectivamente) en relación con el grupo bajo en proteína (1.11 ± 0.05 cm, 1.40 ± 0.04 cm, 1.10 ± 0.04 cm, 1.56 ± 0.05 cm, 1.20 ± 0.05 cm, respectivamente), tabla 9. La longitud de los huesos largos en los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina fueron similares a la longitud obtenida en el grupo control, tabla 9.

Tabla 9. Longitud (cm) de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías nacidas de ratas Wistar (22 días) suplementadas con isoleucina, prolina y glicina

	Control	GBP	GBP-ISO	GBP-IP	GBP-IPG	p
Machos						
Húmero	1.20 ± 0.08 ^a	1.11 ± 0.05 ^b	1.17 ± 0.04	1.20 ± 0.06	1.18 ± 0.02	0.001
Radio	1.18 ± 0.05 ^{ad}	1.10 ± 0.04 ^{bd}	1.22 ± 0.04	1.26 ± 0.04 ^{ac}	1.21 ± 0.03	0.001
Tibia	1.71 ± 0.02 ^a	1.56 ± 0.05 ^{bd}	1.80 ± 0.05 ^{ac}	1.80 ± 0.07 ^{ac}	1.74 ± 0.02	0.001
Fémur	1.30 ± 0.03 ^a	1.20 ± 0.05 ^b	1.34 ± 0.05	1.33 ± 0.08	1.31 ± 0.04	0.001
Olécranon	1.53 ± 0.08 ^a	1.40 ± 0.04 ^b	1.52 ± 0.04	1.54 ± 0.05	1.52 ± 0.02	0.001
Hembras						
Húmero	1.17 ± 0.06 ^a	1.08 ± 0.02 ^b	1.18 ± 0.02	1.15 ± 0.04	1.16 ± 0.04	0.001
Radio	1.18 ± 0.04 ^a	1.10 ± 0.03 ^b	1.22 ± 0.03	1.17 ± 0.05	1.19 ± 0.05	0.001
Tibia	1.74 ± 0.04 ^a	1.58 ± 0.04 ^{bd}	1.80 ± 0.04 ^{ac}	1.72 ± 0.07	1.71 ± 0.03	0.001
Fémur	1.31 ± 0.02 ^a	1.20 ± 0.02 ^b	1.34 ± 0.03 ^{ac}	1.25 ± 0.04 ^{bd}	1.27 ± 0.04 ^{bd}	0.001
Olécranon	1.50 ± 0.01 ^a	1.41 ± 0.03 ^b	1.54 ± 0.02	1.47 ± 0.05	1.48 ± 0.02	0.001

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-ISO= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP-IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina y prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, prolina y glicina, P= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett.

El peso promedio de los huesos húmero, radio, tibia y fémur en crías hembra y macho de ratas Wistar fue mayor para el grupo control en comparación con el grupo bajo en proteína (p=0.001), Tabla 10. Los huesos húmero, radio, tibia, fémur y olécranon de las crías macho de ratas Wistar del grupo GBP-IP registraron un peso mayor (21.8 ± 2.1 mg, 16.5 ± 1.7 mg, 10.4 ± 1.2 mg, 37.9 ± 1.7 mg, 34.7 ± 2.2 mg, respectivamente) en relación con el grupo bajo en proteína y los grupos GBP-ISO y GBP-IPG (p=0.001), tabla 10. El peso de los huesos largos en los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina fueron mayores que las del grupo bajo en proteína (p=0.001), tabla 10. Las crías hembra de los grupos bajos en proteína suplementados con isoleucina, prolina y glicina registraron un peso similar en los huesos húmero, tibia y fémur a la obtenida en el grupo control, sin embargo, el peso fue menor en comparación con el grupo bajo en proteína (p=0.001), tabla 10.

Tabla 10. Peso (mg) de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías nacidas de ratas Wistar suplementadas con isoleucina, prolina y glicina

	Control	GBP	GBP-ISO	GBP-IP	GBP-IPG	p
Machos						
Húmero	19.2 ± 1.1 ^a	18.3 ± 3.1 ^{bd}	18.8 ± 2.1 ^{bd}	21.8 ± 2.1 ^{ac}	19.8 ± 2.9	0.004
Radio	8.3 ± 0.8 ^{ad}	6.9 ± 1.1 ^{bd}	8.8 ± 0.7 ^{bd}	10.4 ± 1.2 ^{ac}	8.9 ± 1.1 ^{bd}	0.001
Tibia	36.1 ± 2.7 ^a	28.5 ± 2.0 ^b	37.1 ± 3.2 ^a	37.9 ± 1.7 ^a	36.1 ± 1.8 ^a	0.001
Fémur	28.1 ± 2.2 ^a	23.4 ± 1.9 ^b	28.2 ± 1.6	34.7 ± 2.2	27.2 ± 1.8	0.001
Olécranon	11.1 ± 0.8 ^a	13.1 ± 1.1 ^b	14.8 ± 0.5 ^b	16.5 ± 1.7 ^b	15.3 ± 0.9 ^b	0.001
Hembras						
Húmero	19.6 ± 2.4 ^a	16.3 ± 1.3 ^{bd}	18.3 ± 2.8 ^d	19.8 ± 1.3 ^{ac}	19.6 ± 1.9	0.004
Radio	8.4 ± 0.8 ^a	6.7 ± 0.8 ^b	8.1 ± 0.8	9.0 ± 0.7	8.7 ± 1.0	0.001
Tibia	36.7 ± 2.1 ^a	27.9 ± 1.4 ^b	35.2 ± 2.5 ^a	35.5 ± 1.9 ^a	36.1 ± 1.9 ^a	0.001
Fémur	28.3 ± 2.5 ^a	22.9 ± 1.2 ^b	27.9 ± 2.2	27.4 ± 0.7	27.3 ± 2.6	0.001
Olécranon	11.0 ± 0.3 ^a	12.6 ± 0.4	14.4 ± 1.2 ^b	14.1 ± 1.1 ^b	15.1 ± 1.3 ^b	0.001

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-ISO= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP-IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina y prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, prolina y glicina, p= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett.

Tabla 11. Densidad ósea total (g/cm²) de incisivo y huesos largos de patas delanteras y traseras de crías nacidas de ratas Wistar (22 días) suplementadas con isoleucina, prolina y glicina

	Control	GBP	GBP-ISO	GBP-IP	GBP-IPG	p
Machos						
Incisivo	115.1 ± 02.8 ^a	178.4 ± 12.9 ^b	149.4 ± 08.2 ^b	109.3 ± 07.4	110.2 ± 03.7	0.001
Húmero	160.4 ± 05.7 ^a	188.1 ± 15.5 ^b	158.4 ± 11.8	166.3 ± 10.4	154.8 ± 09.2	0.001
Radio	167.6 ± 16.3	155.8 ± 22.0	157.2 ± 16.2	166.9 ± 15.8	154.6 ± 14.4	0.399
Tibia	174.2 ± 10.1	188.9 ± 18.0 ^a	158.1 ± 08.6 ^b	172.2 ± 06.8 ^b	158.9 ± 07.4 ^b	0.001
Fémur	169.9 ± 09.4 ^a	194.0 ± 10.2 ^b	173.5 ± 08.1	159.1 ± 19.4	172.1 ± 16.5	0.002
Olécranon	153.9 ± 14.4	167.2 ± 16.8 ^a	155.2 ± 12.3	139.5 ± 12.7 ^b	155.2 ± 16.7	0.001
Hembras						
Incisivo	119.3 ± 06.6 ^a	161.5 ± 10.1 ^b	112.9 ± 04.2	103.2 ± 08.1 ^b	98.8 ± 06.5 ^b	0.001
Húmero	137.3 ± 10.2 ^a	179.8 ± 09.6 ^b	159.5 ± 13.6 ^b	136.8 ± 17.7	161.8 ± 15.4 ^b	0.001
Radio	150.2 ± 10.9 ^a	180.8 ± 11.6 ^b	176.5 ± 20.4 ^b	163.5 ± 19.7	178.6 ± 14.4 ^b	0.002
Tibia	176.7 ± 10.9	188.6 ± 09.9 ^a	166.6 ± 06.5 ^b	169.4 ± 07.9 ^b	183.4 ± 08.0	0.001
Fémur	176.1 ± 08.2	179.6 ± 15.8	168.4 ± 08.1	172.1 ± 08.6	171.9 ± 14.8	0.368
Olécranon	143.6 ± 10.6 ^a	155.5 ± 08.2	190.5 ± 04.4 ^b	162.6 ± 14.1 ^b	168.1 ± 06.3 ^b	0.001

Los valores representan los promedios de la densidad ósea total de los grupos: Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-ISO= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP-IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina y prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, prolina y glicina, P= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student (0.05). Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett.

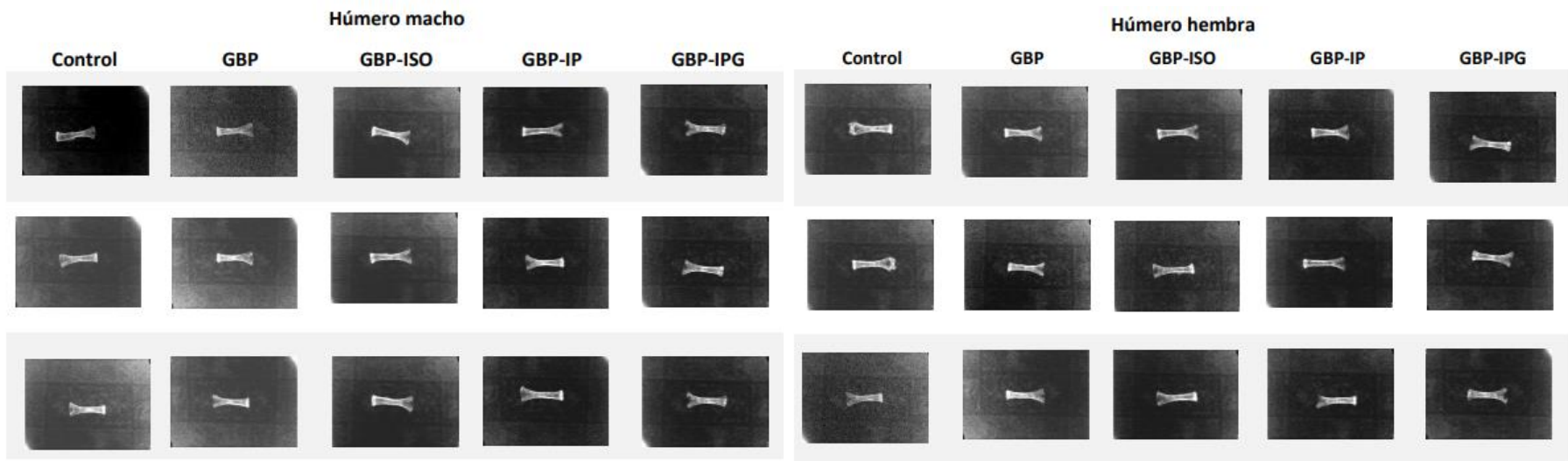
En la tabla 11 se representan los promedios de DO de huesos largos de crías de ratas Wistar suplementadas con isoleucina, prolina y glicina durante la gestación y lactancia. Para los machos del grupo control se obtuvieron promedios de DO menores en los huesos húmero y fémur en comparación con el grupo bajo en proteína ($160.42 \pm 05.70 \text{ g/cm}^2$, $160.42 \pm 05.70 \text{ g/cm}^2$ vs $188.13 \pm 15.51 \text{ g/cm}^2$, $194.04 \pm 10.23 \text{ g/cm}^2$, respectivamente). En cuanto a las hembras, los promedios de DO total de los huesos húmero y radio de los grupos GBP, GBP-ISO y GBP-IPG registrados, fueron mayores en relación con el grupo control ($p=0.001$).

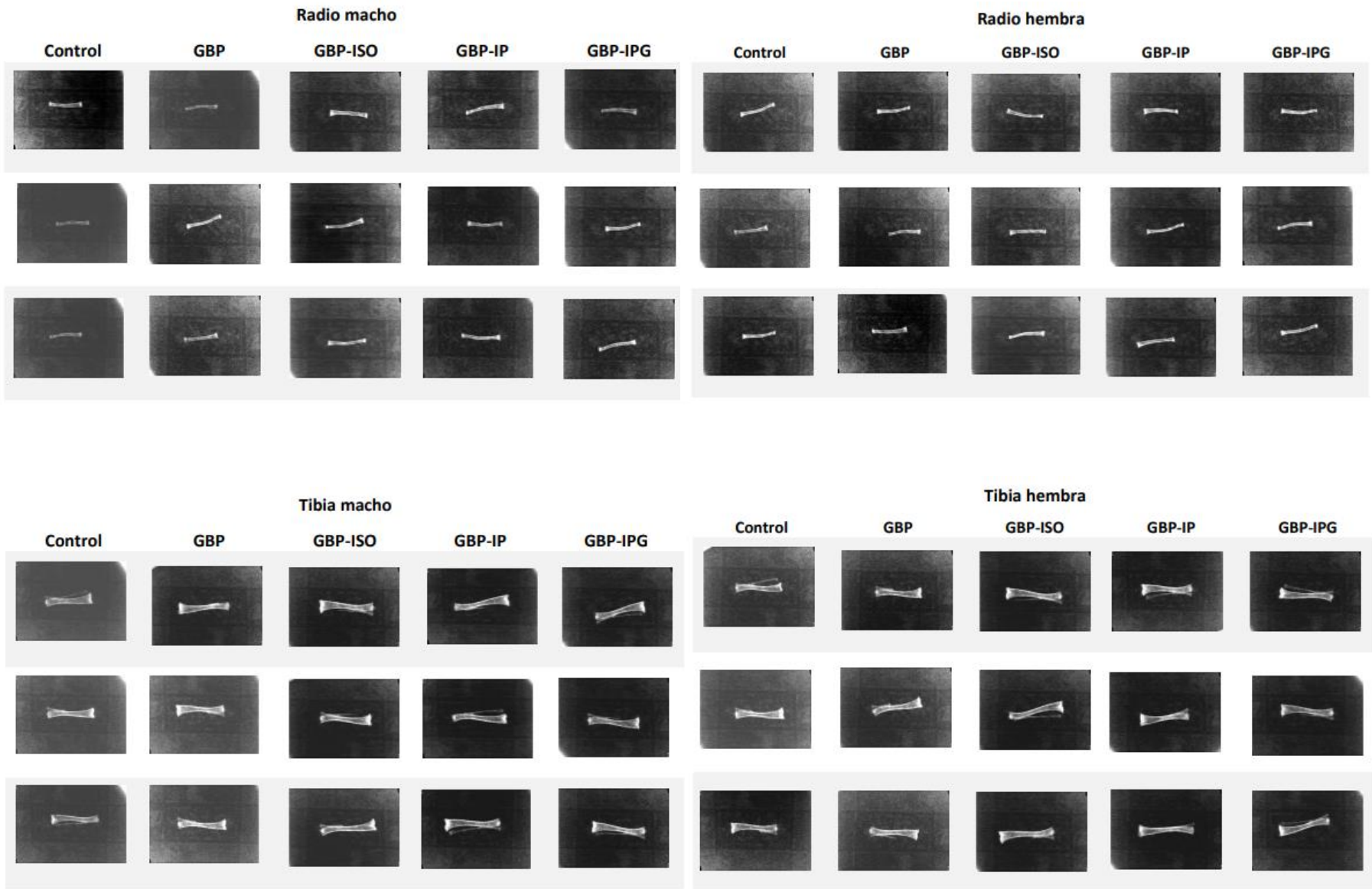
Los promedios de DO total registrados del hueso tibia para el GBP en machos fueron mayores en comparación con los grupos suplementados (GBP-ISO, GBP-IP y GBP-IPG) obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$). En las hembras, solo los grupos GBP-ISO y GBP-IP obtuvieron promedios de DO total menores, en comparación con el GBP ($166.61 \pm 06.47 \text{ g/cm}^2$, $169.41 \pm 07.98 \text{ g/cm}^2$ vs $188.57 \pm 09.93 \text{ g/cm}^2$, respectivamente), tabla 11.

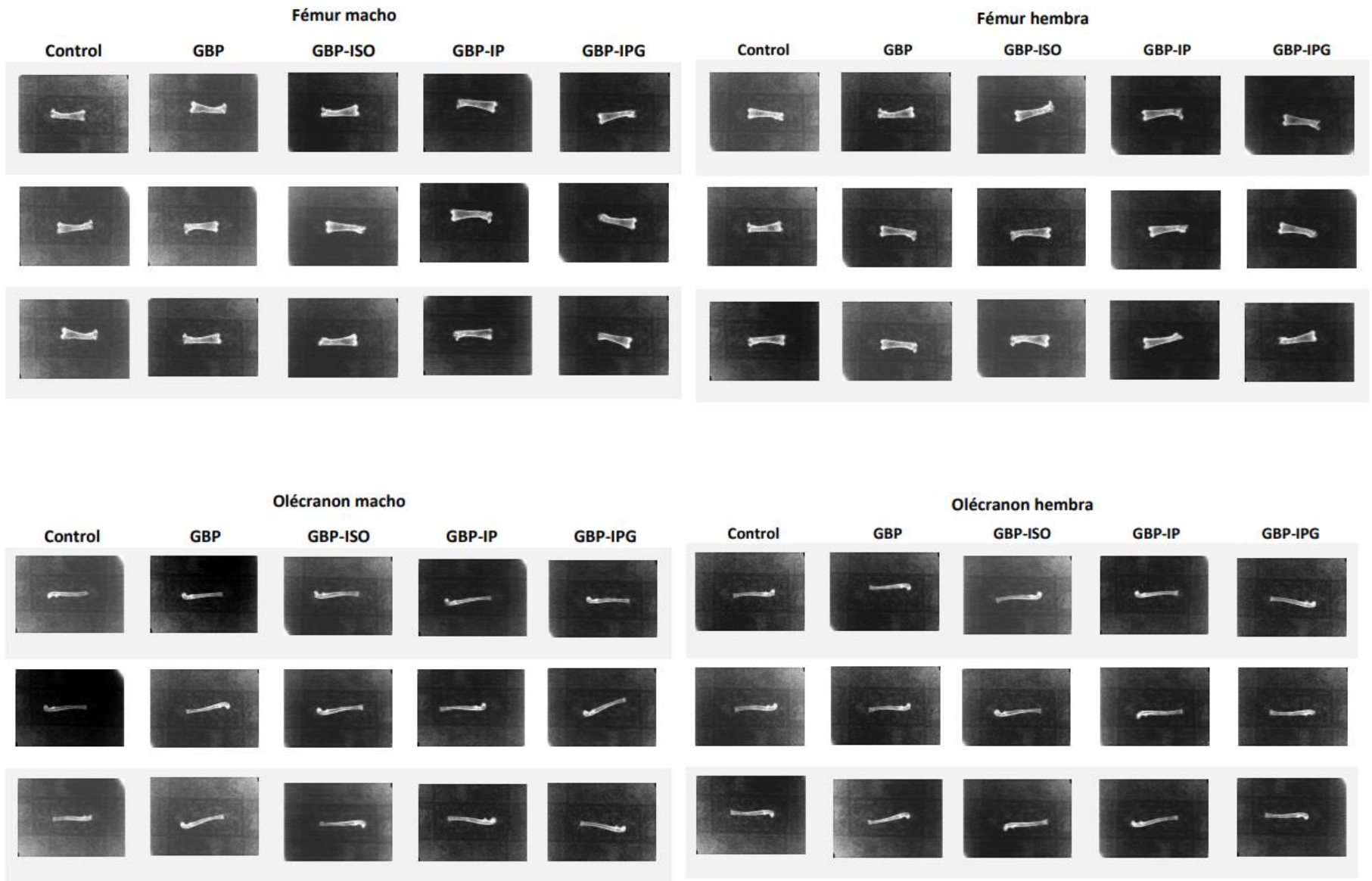
El olécranon en machos del GBP obtuvo un promedio de DO total mayor en comparación con el GBP-IPG ($167.23 \pm 16.82 \text{ g/cm}^2$ vs $139.49 \pm 12.72 \text{ g/cm}^2$, respectivamente). Para las hembras, los promedios de DO total registrados en los grupos GBP-ISO, GBP-IP y GBP-IPG fueron mayores en relación con el grupo control ($p=0.001$), tabla 11.

El grupo control registró un promedio de DO en el incisivo izquierdo de las crías macho menor en comparación con el promedio obtenido por los grupos GBP y GBP-ISO ($115.12 \pm 02.80 \text{ g/cm}^2$ vs $178.39 \pm 12.97 \text{ g/cm}^2$, $149.40 \pm 08.21 \text{ g/cm}^2$, respectivamente), pro semejante al de los grupos GBP-IP y GBP-IPG, tabla 11. El GBP de las crías hembra registró el promedio más alto de DO del incisivo en relación con el grupo control y grupos suplementados ($p=0.001$). Sin embargo, el grupo control obtuvo un promedio de DO mayor en comparación con el GBP-IP y GBP-IPG ($119.30 \pm 06.63 \text{ g/cm}^2$ vs $103.24 \pm 08.17 \text{ g/cm}^2$, $98.79 \pm 06.54 \text{ g/cm}^2$, respectivamente), tabla 11.

En la figura 6 se muestra un catálogo de imágenes computarizadas del incisivo izquierdo y huesos largos de patas traseras y delanteras de crías macho y hembra de ratas Wistar con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina, obtenidas con un radiovisiografo a una exposición de 15 segundos. Se observan partes blancas o radiopacas que son aquellos tejidos que no permiten el paso de la luz, debido a que, su densidad es mayor y las partes más oscuras conocidas como radiolúcidas, son aquellas que presentan una densidad menor, esto se aprecia en las imágenes antes mencionadas.







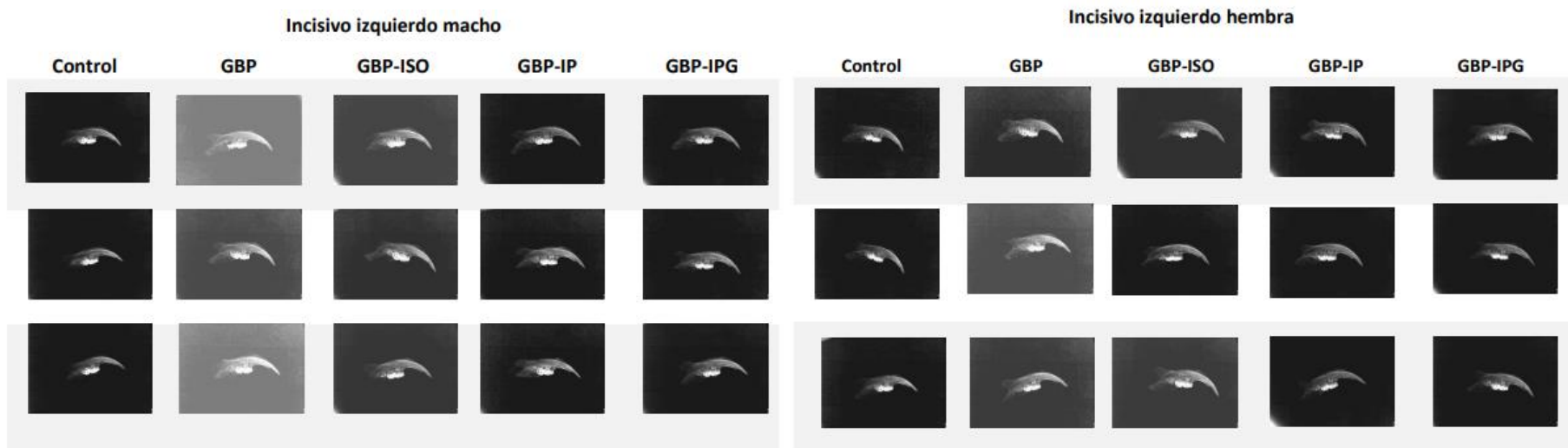


Figura 6. Radiografías de huesos largos (húmero, radio, tibia, fémur, olécranon) e incisivo izquierdo de tres crías Wistar macho y hembra por grupo de estudio (Control, GBP, GBP-ISO, GBP-IP, GBP-IPG).

DISCUSIÓN

8.1 Concentración de hemoglobina pregestacional con restricción proteica en ratas Wistar.

En el presente estudio se observó en las ratas hembra una concentración de hemoglobina al inicio de la gestación similar para el grupo con restricción proteica (9%) en comparación con el grupo control (14% de proteína); durante la restricción de proteína no se limitó la ingesta de vitaminas y minerales, nutrimentos que fueron provistos al 100% de su requerimiento. Se ha descrito que la restricción de proteína no modifica los niveles séricos de hemoglobina, albúmina, proteína total, urea y creatina, esto debido a que la síntesis fisiológica de la proteína y su metabolismo no se ven afectados solo por una ingesta baja de proteínas y aminoácidos (86).

A pesar de la restricción de proteína en los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina de las ratas hembra al término de la gestación y lactancia, estos registraron una concentración de hemoglobina mayor en comparación con el grupo control ($p=0.005$), y una concentración de albúmina y proteínas totales similar en todos los grupos de estudio. Un estudio donde utilizaron ratas Wistar en gestación sometidas a una restricción de proteína (8%) y un grupo control (17% de proteína) menciona que la restricción de proteína no afecta los parámetros bioquímicos y hematológicos, ya que, tanto el grupo control, como el grupo con restricción de proteína mostraron similitud en estos parámetros, haciendo referencia a que el organismo es capaz de adaptarse a diversos entornos y alteraciones fisiológicas (86). Sin embargo, al no disponer de datos en otros estudios de suplementación de aminoácidos en restricción proteica, se limita la discusión para comparar los datos obtenidos en los grupos ISO, IP y IPG de este estudio.

La ingesta baja de proteína disminuye la formación y maduración de eritroblastos, afectando principalmente la producción de hemoglobina, además, la deficiencia proteica induce aplasia intestinal lo que afecta la absorción y síntesis de vitaminas, en particular de la B12 y ácido fólico; y ácido nicotínico, respectivamente, estas deficiencias contribuyen también a una menor síntesis de hemoglobina (87). Por lo que, los datos obtenidos en este estudio sugieren que suplementación de isoleucina, prolina y glicina favorece la concentración de

hemoglobina, manteniendo la concentración de albúmina y proteínas totales en un rango de normalidad para todos los grupos de estudio al limitar la aplasia intestinal y favorecer la absorción de otros nutrientes involucrados en la síntesis de estas proteínas.

8.2 Parámetros bioquímicos y peso corporal con suplementación de isoleucina, prolina y glicina en crías con restricción proteica.

Las crías de ratas con restricción de proteína registraron una concentración sérica de hemoglobina y proteínas totales menor, en comparación con el grupo control y grupos suplementados, presentando diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.001$). La concentración menor de proteínas plasmáticas puede deberse a que una restricción proteica en la dieta trae consigo la reducción de la tasa de recambio del nitrógeno corporal, afectando la estructura y función de las células, tejidos y órganos, debido al aporte insuficiente de aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas estructurales y funcionales como la hemoglobina (88). Cabe mencionar que en el periodo perinatal (gestación y lactancia) los suministros nutricionales son importantes para el crecimiento y desarrollo intrauterino adecuado en las crías, se ha demostrado que una dieta limitada, principalmente en proteínas durante este periodo puede producir disfunción metabólica materna e infantil (89), ya que, las madres a corto plazo son capaces de adaptarse a un ambiente dañino para asegurar su supervivencia (90). En las ratas, las crías expuestas a la restricción de proteínas durante el embarazo y lactancia muestran un aumento de la presión arterial, resistencia a la insulina y mayores niveles de tejido adiposo en la etapa adulta (91).

La concentración de hemoglobina fue similar para el grupo control y los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina, sin diferencias significativas. Prestes-Carneiro *et al.* (92) refieren que una dieta baja en proteína desde el nacimiento puede inducir alteraciones en el recuento de glóbulos rojos, que no se reestablece, aunque se suministre una dieta adecuada de proteínas. Un estudio en ratas gestantes refiere que la biodisponibilidad de glicina y prolina exógena en el plasma de las crías aumenta las concentraciones plasmáticas, favoreciendo de esta forma los indicadores proteicos, como la hemoglobina (93). Esto coincide con lo observado en este estudio, en donde la suplementación con aminoácidos no esenciales (prolina y glicina) favoreció la concentración de hemoglobina, es importante mencionar que la prolina es un regulador clave de múltiples procesos bioquímicos, entre ellos

la síntesis de arginina, poliaminas y proteínas (colágeno y elastina), la regulación de la expresión genética y diferenciación celular, y activación de la señalización celular mTOR para iniciar la síntesis de proteínas (60).

El peso al día 22 de vida registrado en las crías macho y hembra del GBP fue menor en comparación con el resto de los grupos de estudio ($p=0.001$), existe evidencia que los modelos en ratas con una baja ingesta de proteína durante el embarazo se asocian con un bajo peso al nacer, por ende, un peso disminuido a lo largo de la vida, así como la aparición de trastornos metabólicos (94). En relación al peso de las crías macho y hembra de los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina fue mayor en comparación con el grupo control ($p=0.001$), existe evidencia que la suplementación con aminoácidos favorece la cantidad y calidad de la leche, lo que determina el estado nutricional de las crías (76). Un estudio donde administraron glicina y prolina cíclica en ratas durante un desarrollo posnatal refiere que la presencia de glicina y prolina mostró biodisponibilidad y transmisión materno-infantil efectiva a través de la leche materna, aumentando la presencia del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1), favoreciendo el crecimiento y desarrollo de su descendencia (93), cambios que pueden justificar el peso mayor de las crías de ratas hembra suplementadas con esos aminoácidos.

8.3 Incremento en el crecimiento óseo en crías con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.

Un nutriente esencial e importante en la salud ósea es la proteína de la dieta, debido a que puede afectar de varias formas, al ser un componente de la estructura de la matriz del hueso regulando la concentración y biodisponibilidad del IGF-1 y afectando el metabolismo del calcio (absorción) (71); el IGF-1 se encarga de regular el crecimiento esquelético y parte de su mecanismo de acción involucra la estimulación de osteoblastos maduros, por lo tanto, las proteínas de la dieta ejercen efectos positivos sobre el hueso durante los periodos de crecimiento (95). Estas funciones explican la falta de crecimiento (peso y longitud) de los huesos largos de las crías macho y hembras de los grupos bajos en proteína en comparación con el grupo control y grupos suplementados ($p=0.001$).

La proteína afecta la homeostasis esquelética a través de acciones de polipéptidos y aminoácidos derivados de proteínas en las células óseas (96). Existe evidencia que menciona que la administración de un aminoácido no esencial, como la arginina y un esencial, como la lisina inducen un aumento en los niveles de óxido nítrico y de osteoblastos sanos derivados del hueso (97). Por lo que, una ingesta adecuada de proteínas de alto valor biológico y aminoácidos no esenciales es importante para un crecimiento óseo adecuado, de acuerdo con lo registrado en este trabajo, en el cual la longitud y el peso de los huesos largos de las crías machos y hembras fue mayor para el grupo control y los suplementados con isoleucina, prolina y glicina en comparación con el grupo bajo en proteína ($p=0.001$). Otro estudio *in vitro* refiere que el tripéptido IPP (Isoleucina-Prolina-Prolina), regula al alza los genes PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea), BMP-5 (proteína morfogenética ósea 5) y CREB-5 (factor de transcripción), mejorando su expresión genética, aumentando la función y el número de osteoblastos y favoreciendo la formación y estructura de la masa ósea (8).

Por otro lado, la glicina y prolina son aminoácidos no esenciales que forman parte de las proteínas del colágeno tipo I y V, de la matriz ósea, estos aminoácidos representan aproximadamente un 57% de los aminoácidos totales (61). La formación de colágeno óseo disminuye en animales con ayuno y se puede proteger contra el desgaste en animales y seres humanos mediante la alimentación con proteínas de la leche (62); la leche es deficiente en glicina, sin embargo, contiene una gran cantidad de hidroxiprolina. La hidroxiprolina se forma a partir de residuos de prolina en colágenos como una modificación postraduccional, la hidroxiprolina se convierte en glicina en los riñones, proporcionando glicina endógena para apoyar el crecimiento, desarrollo y salud neonatal (98). Esto explica lo observado en este trabajo, en donde se suplementaron los aminoácidos prolina y glicina en las ratas madre durante la gestación y lactancia, obteniendo como resultado una longitud y peso de huesos largos en su descendencia, tanto en machos como hembras, similar al grupo control, inclusive por arriba de las registradas por este último grupo. En cuanto al grupo bajo en proteína, la longitud y peso de huesos largos registrados, fue menor en comparación con los grupos suplementados y grupo control ($p=0.001$), un estudio realizado en ratones alimentados con una dieta baja en proteína durante la gestación refiere que la exposición a una dieta deficiente en proteína desde la concepción y durante la gestación puede alterar el patrón de desarrollo

esquelético fetal, afectando negativamente el crecimiento óseo fetal (99), esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

8.4 Densidad ósea en crías con restricción proteica suplementadas con isoleucina, prolina y glicina.

En este estudio se registraron cambios en la densidad ósea (radiopacidad) evaluada por rayos X en los grupos de estudio, con efectos positivos en las crías de los grupos suplementados con ISO, IP e IPG. La ingesta de proteína en la dieta tiene un efecto positivo en el mantenimiento de los huesos, es decir, la salud ósea, por lo contrario, a una dieta baja en proteína, que tiene efectos adversos en la salud ósea, afectando la masa ósea, aumentando el riesgo a fracturas (100). Sin embargo, los aminoácidos también juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo óseo, un estudio de cohorte sugiere que un perfil específico de aminoácidos se correlaciona con una mayor DO y un menor riesgo de fracturas, independientemente de la dieta y los factores de estilo de vida (101). Asociado a un aumento de la resistencia ósea como resultado del aumento de la excreción de desoxipiridolina, lo que refleja una mayor resorción ósea y niveles plasmáticos de IGF-1 (102). En la tabla 11 se observa que las crías macho y hembra del grupo control y los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina registraron una menor DO en huesos largos e incisivo en comparación con el grupo bajo en proteína ($p=0.001$), estos resultados no eran los esperados. Un estudio donde evaluaron a ratones con una ingesta de proteína restringida durante 60 días refiere que los ratones alimentados con una dieta a base de caseína registraron una mayor DO femoral que los ratones alimentados con una dieta a base de proteína de soya, por el contrario, la DO espinal no estuvo influenciada por la fuente de proteína dietética (103).

Los promedios obtenidos de DO en húmero, radio y olecranon para las crías hembra del GBP-IPG fueron mayor en comparación con el grupo control ($p=0.001$). Un estudio realizado en la población humana de gemelos monocigóticos que eran discordantes en cuanto a la ingesta de proteínas o aminoácidos, donde los gemelos con mayores ingestas de alanina y glicina tenían una DO significativamente mayor en la columna que sus co-gemelos (104). Por otro lado, existe evidencia que la población de mujeres de mediana edad muestra que además de tener un efecto protector la ingesta de proteínas, una mayor ingesta de seis aminoácidos protectores de los huesos (alanina, arginina, ácido glutámico, leucina, lisina y prolina) fue

significativamente menor, esto asociado a una DO mayor en la columna vertebral y el antebrazo (104).

El análisis de diferentes mecanismos moleculares ha sugerido que los aminoácidos pueden estar asociados a la DO, demostrando que los osteoblastos pueden expresar receptores Y transportadores de aminoácidos especializados que permiten el ajuste de la bioenergética celular (105); aunque no hay estudios donde mencionen la relación de aminoácidos específicos con la DO, si existe evidencia que refiere que los aminoácidos son un potente estímulo de la secreción de la hormona del crecimiento, que da como resultado un aumento en los niveles circulantes del IGF-1 (estímulo anabólico para los osteoblastos) (106).

La masa ósea puede aumentar por los altos niveles de aminoácidos en la eficacia de la absorción de calcio, la proliferación de osteoblastos y la mineralización ósea, los niveles circulantes de IGF-1, la reducción ósea, la unión de osteoclastos, la supresión de la diferenciación de osteoclastos y la síntesis de colágeno tipo I, por lo tanto, si hay la deficiencia de aminoácidos o proteína, la adquisición de masa ósea será disminuida y así mismo se afecta la calidad del hueso (96). Los resultados obtenidos en este trabajo refieren promedios de DO en huesos largos e incisivos de las crías macho y hembra de los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina, similares a los registrados por el grupo control, esto se adjudica a que, a pesar de la restricción de proteína de los grupos suplementados, los aminoácidos favorecieron la acumulación de masa ósea a través de las síntesis de colágeno.

Entonces, la DO es indicador para evaluar la acumulación de masa ósea y la fortaleza ósea, sin embargo, es importante mencionar que hay otros parámetros a considerar, como la microarquitectura del hueso, donde se evalúa la geometría del hueso, el grosor y porosidad del cortical y la morfología del trabecular (107). La distribución del hueso trabecular superficie-volumen y predomina principalmente en extremidades de los huesos largos, por lo que se ve rápidamente afectado por la disminución de masa ósea, esto se identifica mediante la reducción de trabéculas óseas (108), en cuanto al hueso cortical, este representa la cantidad sustancial de la masa ósea total, por lo que el deterioro de su microarquitectura puede comprometer significativamente la resistencia ósea, aumenta el riesgo a

fracturas(109). En el presente estudio se observó que los huesos largos de las crías macho y hembra obtenidos del grupo GBP, presentaban una distribución diferente en el hueso trabecular y cortical en comparación con el grupo control y los grupos suplementados con isoleucina, prolina y glicina, esto se evaluó mediante la observación de las radiografías tomadas a cada uno de los huesos largos de las crías, resaltando las partes radiolúcidas y radiopacas, en el grupo GBP se observan partes radiopacas y una menor acumulación del hueso cortical, esto se adjudica a la restricción de proteínas a las que fueron sometidas las madres durante la gestación y lactancia, a diferencia del grupo control y suplementados con aminoácidos que se obtuvieron partes radiolúcidas y una acumulación mayor del hueso cortical. Sin embargo, se necesita realizar pruebas específicas para la evaluación de la microarquitectura del hueso, es decir, evaluar el hueso cortical y trabecular para respaldar que los aminoácidos isoleucina, prolina y glicina favorecen la acumulación de masa ósea a pesar de la restricción de proteína.

CONCLUSIONES

- La restricción de proteína no afecta la concentración de hemoglobina, albúmina y proteínas totales en ratas Wistar al final de la gestación y lactancia.
- La suplementación con isoleucina, prolina y glicina favorece positivamente los niveles de hemoglobina en ratas Wistar, al final de la gestación y lactancia.
- En las crías la suplementación con isoleucina, prolina y glicina se favorece el incremento de peso corporal, la concentración de hemoglobina, la longitud y peso de huesos largos de patas traseras y delanteras al día 21 de vida, obteniendo datos similares o por arriba con el grupo control.
- La suplementación con isoleucina, prolina y glicina tiene un efecto positivo en la DO de huesos largos e incisivo de crías nacidas de ratas Wistar con restricción proteica durante la gestación y lactancia
- La suplementación con isoleucina, prolina y glicina favorecen significativamente parámetros bioquímicos y óseos en crías con restricción en el crecimiento, por lo que sería un área de oportunidad para contribuir a la disminución del retraso del crecimiento en población humana.

RECOMENDACIONES

1. En proyectos posteriores se sugiere evaluar la medición del contenido mineral óseo por microscopia electrónica de barrido.
2. Desarrollar nuevos proyectos de investigación para evaluar el efecto que tiene la suplementación con isoleucina, prolina y glicina en el crecimiento óseo a largo plazo, ya que se evidenció que la suplementación con estos aminoácidos favorece el crecimiento y DO de las crías nacidas de ratas Wistar con restricción proteica.
3. Se recomienda la evaluación de la microarquitectura y fragilidad de huesos largos de las crías nacidas de ratas Wistar.
4. Realizar una evaluación de los incisivos desde un punto odontológico para saber si la suplementación con isoleucina, prolina y glicina tiene un efecto positivo en este parámetro.
5. Se recomienda realizar otros estudios previos con el mismo enfoque de suplementación de aminoácidos esenciales, antes de aplicarse en seres humanos.

REFERENCIAS

1. Godfrey K, Robinson S, Barker DJ, Osmond C, Cox V. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ*. 1996;312(7028):410-4.
2. Ghi T, Prefumo F, Fichera A, Lanna M, Periti E, Persico N, et al. Development of customized fetal growth charts in twins. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;216(5):514 e1- e17.
3. MacDonell R, Hamrick MW, Isales CM. Protein/amino-acid modulation of bone cell function. *Bonekey Rep*. 2016;5:827.
4. Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*. 2011;40(4):1053-63.
5. R. C. Factores que condicionan el crecimiento. *Crecimiento del niño Fundamentos Fisiopatológicos*. México Interamericana M-H; 1998. p. 50-6.
6. Wang W, Wu Z, Dai Z, Yang Y, Wang J, Wu G. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids*. 2013;45(3):463-77.
7. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1999;104(4):439-46.
8. Huttunen MM, Pekkinen M, Ahlstrom ME, Lamberg-Allardt CJ. Effects of bioactive peptides isoleucine-proline-proline (IPP), valine-proline-proline (VPP) and leucine-lysine-proline (LKP) on gene expression of osteoblasts differentiated from human mesenchymal stem cells. *Br J Nutr*. 2007;98(4):780-8.
9. López MI, I., Macias, C. Crecimiento y Maduración Física In: López M, editor. *Crecimiento y Maduración Física Bases para el diagnóstico y seguimiento clínico Venezuela Medica Panamericana* 2013. p. 3-6.
10. Calzada R. Capítulo 5: Factores que condicionan el crecimiento. *Crecimiento del niño Fundamentos Fisiopatológicos México Interamericana M-H; 1998. p. 50-6.*
11. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85(4):715-26.

-
12. Grantham-McGregor S, Cheung YB, Cueto S, Glewwe P, Richter L, Strupp B, et al. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. *Lancet*. 2007;369(9555):60-70.
 13. Horta BL, Victora CG, de Mola CL, Quevedo L, Pinheiro RT, Gigante DP, et al. Associations of Linear Growth and Relative Weight Gain in Early Life with Human Capital at 30 Years of Age. *J Pediatr*. 2017;182:85-91 e3.
 14. Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta*. 2001;22(1):1-13.
 15. Sepúlveda E, Crispi, F., Pons, A., Gratacos, E. . Restricción de crecimiento intrauterino Intrauterine growth restriction *Médica Clínica las Condes* 2014;25 (6):958-63.
 16. Calzada R. Capítulo 8: Crecimiento prenatal. In: Inteamericana M-H, editor. *Crecimiento del niño Fundamentos fisiopatológicos*. México1998. p. 93-102.
 17. Battaglia FC, Regnault TR. Placental transport and metabolism of amino acids. *Placenta*. 2001;22(2-3):145-61.
 18. Ghi T, Prefumo F, Fichera A, Lanna M, Periti E, Persico N, et al. Development of customized fetal growth charts in twins. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216(5):514-7.
 19. Butte NF. Energy requirements during pregnancy and consequences of deviations from requirement on fetal outcome. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2005;55:49-67; discussion -71.
 20. Economides DL, Nicolaidis KH, Gahl WA, Bernardini I, Evans MI. Plasma amino acids in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161(5):1219-27.
 21. Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Rizzoli R. Protein intake and bone growth. *Can J Appl Physiol*. 2001;26:153-66.
 22. Kuramitsu N, Matsui T, Yano H, Kawashima R. The influence of protein and/or energy deficiency on the growth of long bone in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1985;31(2):189-96.
 23. IDGN R. The Global Nutrition Report´s Independent Expert Group 2021 [Available from: <https://globalnutritionreport.org/about/independent-expert-group/>].
 24. Frank Falkner MD, M.R., C.D. Desarrollo Óseo In: Rodahl K, editor. *Desarrollo Humano*. Barcelona, España.: Human Development; 1969. p. 594-6.

-
25. Carnauba RA, Baptistella AB, Paschoal V, Hubscher GH. Diet-Induced Low-Grade Metabolic Acidosis and Clinical Outcomes: A Review. *Nutrients*. 2017;9(6).
 26. Ibarra L, Valdés, M. Microarquitectura ósea In: Villegas M, Solis, L., editor. *OSTEOPOROSIS Prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación*. México: Trillas; 2012. p. 25-9.
 27. Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol*. 2009;3(2):189-96.
 28. Cummings SR, Bates D, Black DM. Clinical use of bone densitometry: scientific review. *JAMA*. 2002;288(15):1889-97.
 29. Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(12):6871-6.
 30. Gafni RI, Weise M, Robrecht DT, Meyers JL, Barnes KM, De-Levi S, et al. Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatr Res*. 2001;50(5):618-23.
 31. Mitlak BH, Schoenfeld D, Neer RM. Accuracy, precision and utility of spine and wholeskeleton mineral measurement by DXA in rats. *J Bone Miner Res*. 1994;9:119-26.
 32. Christiansen C, Christensen MS, Larsen ME, Transbol I. Pathophysiological mechanisms of estrogen effect on bone metabolism. Dose-response relationships in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;55:1124-30.
 33. Bonnick SL. *Bone Densitometry in Clinical Practice: Application and interpretation*. ed, editor. New Jersey 2010.
 34. Martínez-Aparicio J, editor *Medición de la densidad mineral ósea y los factores de riesgo asociados*. *Anales de Radiología México*; 2015.
 35. Neyro-Bilbao JC-S AP, S. Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Osteoporos Metab Miner* 2011;3;2:105-21.
 36. Oliveira CR, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Barreto-Filho JA. Emerging role of the GH/IGF-I on cardiometabolic control. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(5):434-9.
 37. Kember NF, Walker KV. Control of bone growth in rats. *Nature*. 1971;229(5284):428-9.

-
38. Barnard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology*. 1991;128(3):1459-64.
 39. Kawai M, Rosen CJ. The insulin-like growth factor system in bone: basic and clinical implications. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012;41(2):323-33, vi.
 40. Insel P, Turner, E., Ross, D. Proteins and amino acids: function follows form In: Turner E, editor. *Discovering Nutrition* London: Jones & Bartlett Publishers; 2010. p. 211-45.
 41. Lv C, Liu S, Xia J, Xu L, Cheng Y, Li W, et al. The Mechanism of Dietary Protein Modulation of Bone Metabolism via Alterations in Members of the GH/IGF Axis. *Curr Protein Pept Sci*. 2019;20(2):115-24.
 42. Burckhardt P, Dawson-Hughes, B., Weaver, C. Dietary Protein and Bone Mass Accrual. In: Rizzoli R, Bonjour, J.P., Chevalley, T., editor. *Nutritional Influences on Bone Health* New York Springer; 2010. p. 1-6.
 43. Heaney RP. Bone health. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(1):300S-3S.
 44. Dolan E, Sale C. Protein and bone health across the lifespan. *Proc Nutr Soc*. 2018:1-11.
 45. Mangano KM, Walsh SJ, Kenny AM, Insogna KL, Kerstetter JE. Dietary acid load is associated with lower bone mineral density in men with low intake of dietary calcium. *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):500-6.
 46. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*. 2013;45(3):407-11.
 47. Jamdar J, Rao B, Netke S, Roomi MW, Ivanov V, Niedzwiecki A, et al. Reduction in tibial shaft fracture healing time with essential nutrient supplementation containing ascorbic acid, lysine, and proline. *J Altern Complement Med* 2004;10(6):915-6.
 48. Semba RD, Shardell M, Sakr Ashour FA, Moaddel R, Trehan I, Maleta KM, et al. Child stunting is associated with low circulating essential amino acids. *EBioMedicine* 2016;6:246–52.
 49. Shikata N, Maki Y, Noguchi Y, Mori M, Hanai T, Takahashi M, et al. Multi-layered network structure of amino acid (AA) metabolism characterized by each essential AA-deficient condition. *Amino Acids*. 2007;33(1):113-21.

-
50. Noguchi Y, Zhang QW, Sugimoto T, Furuhashi Y, Sakai R, Mori M, et al. Network analysis of plasma and tissue amino acids and the generation of an amino index for potential diagnostic use. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):513S-9S.
 51. Furuta C, Murakami H. A Novel Concept of Amino Acid Supplementation to Improve the Growth of Young Malnourished Male Rats. *Ann Nutr Metab* 2018;72(3):231-40.
 52. Felig P. Amino acid metabolism in man. *Annu Rev Biochem* 1975;44:933-55.
 53. Gu C, Mao X, Chen D, Yu B, Yang Q. Isoleucine Plays an Important Role for Maintaining Immune Function. *Curr Protein Pept Sci.* 2019;20(7):644-51.
 54. Snyderman SE, Norton PM, Fowler DI, Holt LE. The essential amino acid requirements of infants: lysine. *AMA J Dis Child.* 1959;97(2):175-85.
 55. Pellett PL, Ghosh S. Lysine fortification: past, present, and future. *Food Nutr Bull.* 2004;25(2):107-13.
 56. Hou Y, Yin Y, Wu G. Dietary essentiality of "nutritionally non-essential amino acids" for animals and humans. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(8):997-1007.
 57. Kurpad AV, Regan MM, Nazareth D, Nagaraj S, Gnanou J, Young VR. Intestinal parasites increase the dietary lysine requirement in chronically undernourished Indian men. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(6):1145-51.
 58. Grohmann U, Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol Rev.* 2010;236:243-64.
 59. Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Li XL, et al. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. *J Anim Sci.* 2010;88(13 Suppl):E195-204.
 60. Li P, Wu G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Amino Acids.* 2018;50(1):29-38.
 61. Elango J, Lee JW, Wang S, Henrotin Y, de Val J, J MR, et al. Evaluation of Differentiated Bone Cells Proliferation by Blue Shark Skin Collagen via Biochemical for Bone Tissue Engineering. *Mar Drugs.* 2018;16(10).
 62. Babraj JA, Smith K, Cuthbertson DJ, Rickhuss P, Dorling JS, Rennie MJ. Human bone collagen synthesis is a rapid, nutritionally modulated process. *J Bone Miner Res.* 2005;20(6):930-7.

-
63. Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Human osteopenic bone-derived osteoblasts: essential amino acids treatment effects. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2003;31(1):35-46.
 64. Baron J, Savendahl L, De Luca F, Dauber A, Phillip M, Wit JM, et al. Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(12):735-46.
 65. Lui JC, Baron J. Mechanisms limiting body growth in mammals. *Endocr Rev.* 2011;32(3):422-40.
 66. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(6):596-603.
 67. (WHO) WHO. WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. 2009 [Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44129/9789241598163eng.pdf.;jsessionid=92D2931DF4341A9709667E41D3417A21?sequence=1>].
 68. de Onis M, Branca F. Childhood stunting: a global perspective. *Matern Child Nutr.* 2016;12 Suppl 1:12-26.
 69. Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M. the Maternal and Child Nutrition Study Group. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet.* 2013;60:371-243.
 70. MC E. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2 México 2016 [Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>].
 71. Waterlow JC. Malnutrición proteico-energética. *Alteraciones Metabólicas: Organización Panamericana de la Salud; 1996. 103-23 p.*
 72. Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL, Crocker PR, Faulkner RA. A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: the university of Saskatchewan bone mineral accrual study. *J Bone Miner Res.* 1999;14(10):1672-9.
 73. Cooper C, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C, Tuomilehto J, Barker DJ. Maternal height, childhood growth and risk of hip fracture in later life: a longitudinal study. *Osteoporos Int.* 2001;12(8):623-9.

-
74. Lanham SA, Bertram C, Cooper C, Oreffo ROC. Animal models of maternal nutrition and altered offspring bone structure--bone development across the lifecourse. *European cells & materials*. 2011;22.
 75. Saxton RA, Knockenhauer KE, Wolfson RL, Chantranupong L, Pacold ME, Wang T, et al. Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science*. 2016;351(6268):53-8.
 76. Greiner L, Srichana P, Usry JL, Neill C, Allee GL, Connor J, et al. The use of feed-grade amino acids in lactating sow diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2018;9(1).
 77. Ayub A, Rasool F, Khan N, Qaisrani SN, Parveen S, Anjum KM, et al. Limiting amino acids supplementation in low crude protein diets and their impacts on growth performance and carcass composition in *Labeo rohita* (rohu) adult fish. *Brazilian Journal of Biology*. 2023;83.
 78. Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*. 2002;359(9306):564-71.
 79. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
 80. Jacob Filho W, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhao MS, Caldeira M, et al. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Aging Male*. 2018;21(2):145-8.
 81. Cétola V. Albumina AA Argentina Wiener Laboratorios S.A.I.C 2000 [Available from: http://www.wiener-lab.com/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/albumina_aa_sp.pdf].
 82. Valencia CdiHGdV. Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata Parte 2. *Research in Surgery*. 1990:12-20.
 83. Heithaus P. SKELETAL SYSTEM Gambier, Ohio.: Entire tutorial; 2010 [Available from: <http://biology.kenyon.edu/courses/biol10/110pdfs/8skeleton.pdf>].

-
84. Khoswanto C. A New Technique for Research on Wound Healing through Extraction of Mandibular Lower Incisors in Wistar Rats. *European Journal of Dentistry*. 2019;13(02):235-7.
 85. Miranda V E, Muñoz CH, S. Paolinelly G, P., Astudillo A, C. Densitometría ósea Densitometry bone *Médica Clinica las Condes*. 2013;24 (1):169-73.
 86. Barros MAV, Andrade EB, Barros RGN, Costa IKM, Costa ICL, Vitorino GFA, et al. Low-protein diet does not alter reproductive, biochemical, and hematological parameters in pregnant Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(6):e6602.
 87. Aschkenasy A. On the pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary protein deficiency. *Am J Clin Nutr*. 1957;5(1):14-25.
 88. González A, Velazco, L., Díaz-Canel, A., Cabrera, J. . Modificaciones bioquímicas e inmunológicas en ratas desnutridas moderadamente *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 2013;23:1:9-20.
 89. Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann Hum Biol*. 2009;36(5):445-58.
 90. Fleming TP, Watkins AJ, Sun C, Velazquez MA, Smyth NR, Eckert JJ. Do little embryos make big decisions? How maternal dietary protein restriction can permanently change an embryo's potential, affecting adult health. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(4):684-92.
 91. Dunlop K, Cedrone M, Staples JF, Regnault TR. Altered fetal skeletal muscle nutrient metabolism following an adverse in utero environment and the modulation of later life insulin sensitivity. *Nutrients*. 2015;7(2):1202-16.
 92. Prestes-Carneiro LE, Laraya RD, Silva PR, Moliterno RA, Felipe I, Mathias PC. Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2006;52(6):414-20.
 93. Singh-Mallah G, Singh K, McMahon CD, Harris P, Brimble MA, Thorstensen E, et al. Maternally Administered Cyclic Glycine-Proline Increases Insulin-Like Growth Factor-1 Bioavailability and Novelty Recognition in Developing Offspring. *Endocrinology*. 2016;157(8):3130-9.
 94. Ajuogu PK, Wolden M, McFarlane JR, Hart RA, Carlson DJ, Van der Touw T, et al. Effect of low- and high-protein maternal diets during gestation on reproductive outcomes in the rat: a systematic review and meta-analysis. *J Anim Sci*. 2020;98(1).

-
95. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2008;29(5):535-59.
 96. Bihuniak JD, Insogna KL. The effects of dietary protein and amino acids on skeletal metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;410:78-86.
 97. Wimalawansa SJ. Nitric oxide and bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:391-403.
 98. Hou Y, Yao K, Yin Y, Wu G. Endogenous Synthesis of Amino Acids Limits Growth, Lactation, and Reproduction in Animals. *Adv Nutr.* 2016;7(2):331-42.
 99. Lanham SA, Smith SJ, Watkins AJ, Lucas ES, MacCaoilte N, Oreffo ROC, et al. Periconception maternal low-protein diet adversely affects male mouse fetal bone growth and mineral density quality in late gestation. *J Dev Orig Health Dis.* 2021;12(3):384-95.
 100. Beasley JM, LaCroix AZ, Larson JC, Huang Y, Neuhaus ML, Tinker LF, et al. Biomarker-calibrated protein intake and bone health in the Women's Health Initiative clinical trials and observational study. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(4):934-40.
 101. Su Y, Elshorbagy A, Turner C, Refsum H, Chan R, Kwok T. Circulating amino acids are associated with bone mineral density decline and ten-year major osteoporotic fracture risk in older community-dwelling adults. *Bone.* 2019;129:115082.
 102. Ammann P, Laib A, Bonjour JP, Meyer JM, Rueggsegger P, Rizzoli R. Dietary essential amino acid supplements increase bone strength by influencing bone mass and bone microarchitecture in ovariectomized adult rats fed an isocaloric low-protein diet. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1264-72.
 103. Rouy E, Vico L, Laroche N, Benoit V, Rousseau B, Blachier F, et al. Protein quality affects bone status during moderate protein restriction in growing mice. *Bone.* 2014;59:7-13.
 104. Jennings A, MacGregor A, Spector T, Cassidy A. Amino Acid Intakes Are Associated With Bone Mineral Density and Prevalence of Low Bone Mass in Women: Evidence From Discordant Monozygotic Twins. *J Bone Miner Res.* 2016;31(2):326-35.
 105. Ding KH, Cain M, Davis M, Bergson C, McGee-Lawrence M, Perkins C, et al. Amino acids as signaling molecules modulating bone turnover. *Bone.* 2018;115:15-24.
 106. Cui Z, Feng H, He B, He J, Tian Y. Relationship Between Serum Amino Acid Levels and Bone Mineral Density: A Mendelian Randomization Study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:763538.

-
107. Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int.* 2003;14 Suppl 3:S13-8.
108. Fonseca H, Moreira-Goncalves D, Coriolano HJ, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med.* 2014;44(1):37-53.
109. MacNeil JA, Boyd SK. Load distribution and the predictive power of morphological indices in the distal radius and tibia by high resolution peripheral quantitative computed tomography. *Bone.* 2007;41(1):129-37.

ANEXOS

Anexo 1. Dictamen de aprobación CICUAL

	<p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO COORDINACIÓN ACADÉMICA DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS DIRECCIÓN DEL BIOTERIO COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO</p>	
		
DICTAMEN DE EVALUACIÓN		10 de febrero de 2021
<p>ESTIMADA DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ</p> <p>Por medio de la presente, me es grato informarle que después de haber revisado su protocolo de investigación, intitulado "Efecto de la suplementación de isoleucina, prolina y glicina en el crecimiento y densidad ósea de huesos largos de crías de ratas Wistar con restricción proteica", donde participa la LN. María Vianey Abelar Rosas, el CICUAL ha decidido aprobarlo y queda registrado con el Número de Aprobación CICUAL/001/2021.</p> <p>Sin más otro particular, aprovechamos la ocasión desearle el mejor de los éxitos en su proyecto.</p> <p style="text-align: center;">ATENTAMENTE "AMOR, ORDEN y PROGRESO"</p> <p> DR. LUIS DELGADO OLIVARES PRESIDENTE DEL CICUAL</p> <p> ING. DANIEL RAMÍREZ RICO DIRECTOR DEL BIOTERIO</p>		