UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Efecto de la suplementación de aminoácidos esenciales en la densidad ósea de 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. JOCELYN GÓMEZ CASTILLO

Directora de Tesis
DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ

Codirector de Tesis
DR. MARCOS MARCELO GALVÁN GARCÍA

San Agustín Tlaxiaca Hgo., septiembre de 2021.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine

1/agosto/2021
AAM/MCBS/066/2021
Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Jocelyn Gómez Castillo
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto de la suplementación de aminoácidos esenciales en la densidad ósea de crías de ratas Wistar con restricción proteica" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	Dr. Marcos Marcelo Galván García
PRIMER VOCAL	Dra. Guadalupe López Rodríguez
SECRETARIO	Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez
SUPLENTE	Dr. José Alberto Ariza Ortega
SUPLENTE	Dra. Raquel Cariño Cortés

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIAN MOYA ESCALERA
DIRECTOR

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
DIRECCIÓN

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
medicina@uaeh.edu.mx

Dedicatorias

Cuando se trata de amor, valores, impulso, motivación, cuidado, protección y todas las cosas buenas de la vida solo puedo pensar en agradecer profundamente a Maribel y Salvador, por ser unos padres ejemplares. Gracias por ayudarme a crecer fuerte, valiente, responsable y convencerme de que todo lo puedo, por tanto y tanto amor, les debo todo y es por eso que mis logros son suyos, los amo con el corazón.

A mis hermanos Katia y Chava, los admiro mucho, son los mejores compañeros de vida que alguien pudiera tener y a mis abuelitos Mario y Emilia, gracias a todos ustedes, son parte esencial de mi vida, sin su amor, apoyo, consejos y sabiduría no sería posible, gracias por siempre estar, los amo infinito.

El amor, motivación y apoyo de Lalo fue fundamental en este proyecto, gracias por ser mi incondicional y mi solecito en el camino, te amo mucho amor.

A Kari, Moni, Bety y Gaby por los días de risas, por estar en las buenas, las malas, el apoyo y por todos los buenos recuerdos, agradezco por su valiosa amistad en mi vida.

A Dios por siempre guiar mi vida, por contar con la mejor familia, mejores amigos, excelentes profesores, no hay palabras para expresar el infinito agradecimiento que tengo hacia ustedes y todo lo hermoso que me han dado.

Agradecimientos

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 1006134.

Por medio de estas líneas quiero agradecer a todas las personas, instituciones y académicos que con sus conocimientos y aportaciones colaboraron en la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), institución a la cual pertenezco, por permitirme trabajar dentro de sus instalaciones en el bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa).

Mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Guadalupe López Rodríguez que con sus conocimientos, experiencia y dedicación me ha guiado para obtener el mayor aprovechamiento en la realización de este trabajo dentro del laboratorio de nutrición molecular, un placer trabajar con ella, la estimo y admiro mucho.

A mi codirector, a cada uno de los integrantes de mi comité de tesis y a mis maestros por su tiempo y sus valiosas aportaciones en este trabajo.

Un agradecimiento especial al equipo de trabajo del laboratorio de nutrición molecular, con quién compartí grandes momentos, a Vian, Lei, Liz, Diana, Erick, Flor, y German por el apoyo técnico y participación en la elaboración de este trabajo.

Gracias al Dr. Carlos Enrique Cuevas por sus valiosas aportaciones y asesorías en la estandarización de técnicas y uso de equipos en el desarrollo de esta tesis y al Mtro. Jesús Navarrete por su apoyo en el acceso a los equipos dentro de las clínicas de odontología.

ÍNDICE GENERAL

I INTRODUCCIÓN....1
II ANTECEDENTES....3
2.1 Generalidades....3
2.1.1 Crecimiento....3
2.1.2 Factores que condicionan el crecimiento....5
II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA....9
2.2 Crecimiento del tejido óseo en la mineralización y densidad ósea....9
2.2.1 El efecto de la proteína en el tejido óseo....12
2.3 Planteamiento del problema....18
III JUSTIFICACIÓN....19
IV HIPÓTESIS....20
V OBJETIVOS....21
5.1 Objetivo general....21
5.2 Objetivos específicos....21
VI MATERIALES Y MÉTODOS....22
6.1 Contexto de la investigación....22
Tipo y diseño de estudio....22
6.2 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión....22
6.3 Tamaño de muestra y muestreo....23
6.4 Diagrama de diseño experimental....24
6.5 Definición operacional de variables (dependientes, independientes)....25
Prueba, principio y procedimiento....26
6.5.1 Animales de experimentación....27
6.5.2 Condiciones de alojamiento....27
6.5.3 Dietas....27
6.5.4 Apareamiento....31
6.5.5 Gestación y lactancia....31
6.5.6 Registro de peso e ingesta calórica....31
6.5.7 Sacrificio....32

6.5.8 Cuantificación de hemoglobina sérica 33
6.5.9 Cuantificación de albúmina sérica 33
6.5.10 Disección de huesos largos 34
6.5.11 Determinación de densidad ósea 36
6.6 Análisis estadístico 38
VII RESULTADOS 39
VIII DISCUSIÓN 51
IX CONCLUSIONES 60
X RECOMENDACIONES 61
XI REFERENCIAS 62
XII ANEXOS 79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental del estudio……...…… 24
Figura 2. Estructura de huesos de pata delantera derecha de roedor…….35
Figura 3. Estructura de los músculos superficiales de rata….…….……..…35
Figura 4. Estructura de huesos de pata trasera derecha de rata…….36
Figura 5. Puntos de mediciones para realizar la densidad óptica en los huesos de patas delanteras y traseras de las crías Wistar……...…….38
Figura 6. Radiografías de huesos largos de 3 ratas ratas Wistar macho y hembra (fémur, tibia, húmero, olécranon, radio) por grupos de estudio. Grupo control, grupo bajo en proteínas (GBP), grupo bajo en proteínas con mix de aminoácidos (GBP-AA) y grupo bajo en proteínas suplementado con Isoleucina (GPB-Ile)……...50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición operacional de variables ……...25
Tabla 2. Composición de nutrientes en la dieta AIN-93G y AIN-93M para roedores ……28
Tabla 3. Formulaciones de la dieta administrada durante el periodo de restricción proteica (AIN-93M), gestación y lactancia (AIN-93G) a ratas hembra Wistar …….30
Tabla 4. Aporte calórico por gramo de alimento para cada grupo de estudio ……..32
Tabla 5. Cambios de peso de las ratas hembra Wistar con restricción proteica durante su gestación asociado a la ingesta de una dieta con isoleucina y mix de aminoácidos esenciales…….. 39
Tabla 6. Peso, hemoglobina y albúmina de crías de ratas Wistar suplementadas con mix de aminoácidos e isoleucina al término de la lactancia…….40
Tabla 7. Peso y longitud de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías de ratas Wistar suplementadas con aminoácidos esenciales …….41
Tabla 8. Peso y longitud de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías de ratas Wistar macho y hembras suplementadas con aminoácidos esenciales ……43
Tabla 9. Densidad ósea total en ratas Wistar hembras y machos suplementados con mix de aminoácidos o isoleucina durante la gestación y lactancia ……..45
Tabla 10. Correlación de peso y longitud de huesos largos en ratas Wistar suplementados con mix de aminoácidos o isoleucina durante gestación y lactancia……46

ABREVIATURAS

AIN-93 G	Dieta AIN-93 de Gestación y Lactancia
AIN-93 M	Dieta AIN-93 de Mantenimiento
DO	Densidad Ósea
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina
GBP	Grupo Bajo en Proteínas
GBP-AA	Grupo Bajo en Proteínas Suplementado con Mix de Aminoácidos Esenciales
GBP-Ile	Grupo Bajo en Proteínas Suplementado con Isoleucina
MIX	Mezcla de Aminoácidos Esenciales
Kcal	Kilocalorías

RESUMEN

Introducción. Estudios en animales y en humanos indican que la baja ingesta de proteínas puede afectar la densidad ósea (DO) durante el crecimiento y en su conservación durante la edad adulta, por lo tanto, la ingesta de proteínas en la dieta tiene un papel importante en la formación del hueso durante la infancia y la adolescencia, así como en el mantenimiento de la salud ósea a lo largo de la vida. **Objetivo**. Evaluar el efecto de la suplementación con aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina) en la densidad ósea de los huesos largos de las crías de ratas Wistar hembra con restricción proteica materna durante la gestación y lactancia. **Metodología**. Se evaluaron a las crías de ratas hembra Wistar alimentadas por 44 días con una dieta AIN-93, con restricción proteica del 9% y al 8% durante la gestación y lactancia, al comienzo de la gestación y durante la lactancia se suplementaron y fueron separadas en 4 grupos: control, GBP, GBP-AA y GBP-Ile, en quienes se evaluó su efecto en la longitud de los huesos largos de patas delanteras y traseras de las crías y la DO mediante la medición de su radiopacidad. **Resultados.** El peso y longitud promedio de los huesos largos de las patas delanteras y traseras de las crías machos y hembras fue mayor para el grupo control, en comparación con el GBP, GBP-AA, GBP-Ile ($p=0.001$); las hembras presentaron una mayor DO del húmero en el GBP-AA en comparación al grupo control, ($p<0.05$), para el olécranon en los machos se presentó un aumento de la DO en el GBP-Ile en comparación al grupo control (152.7 ± 3.3 g/cm^2 vs. 126.2 ± 16.6 g/cm^2, $p<0.05$). En el radio se registró un aumento de DO en todos los grupos de hembras y machos GBP, GBP-AA y GBP-Ile en comparación con el grupo control de hembras y de machos ($p<0.05$). Asimismo, se encontró una correlación positiva del peso y la radiopacidad del olécranon en el GBP-Ile. **Conclusión.** La suplementación con Ile y AA en las ratas Wistar madre con restricción proteica durante el embarazo y la lactancia favorece el crecimiento de la longitud y peso de los huesos largos (radio, tibia, fémur, húmero) de sus crías, con un aumento de la DO del húmero, olécranon y radio.

Palabras clave: restricción proteica, aminoácidos esenciales, isoleucina, gestación, lactancia, densidad ósea.

ABSTRACT

Introduction. Studies in animals and in humans indicate that low protein intake may be detrimental to the increase in bone density (OD) during growth and to its preservation during adulthood, therefore, the intake of protein in the diet has an important role in the accumulation of bone during childhood and adolescence, as well as in the maintenance of bone health throughout life. **Objective.** To evaluate the effect of supplementation with essential amino acids during pregnancy and lactation on the bone density of the long bones of rats reared with protein restriction. **Methodology.** The offspring of female Wistar rats fed for 44 days with an AIN-93 diet, with protein restriction of 9% and 8% during gestation and lactation, at the beginning of gestation and during lactation, were supplemented and separated. in 4 groups: control, GBP, GBP-AA and GBP-Ile, then their effect on the length of the long bones of the front and rear legs of the pups and the OD was evaluated by measuring their radiopacity. **Results.** The average weight and length of the long bones of the front and rear legs of the male and female pups was higher for the control group, compared to the GBP, GBP-AA, GBP-Ile ($p = 0.001$); the females presented a higher OD of the humerus in the GBP-AA compared to the control group, ANOVA $p < 0.05$), for the olecranon in the males there is an increase in the OD in the GBP-Ile compared to the control group (152.7 ± 3.3 g / cm^2 vs. 126.2 ± 16.6 g / cm^2, ANOVA $p < 0.05$). In the radius, an increase in OD was recorded in all the GBP, GBP-AA and GBP-Ile groups of females and males compared to the control group of females and males (ANOVA $p < 0.05$). Likewise, a positive correlation of olecranon weight and radiopacity was found in GBP-Ile. **Conclusion.** Supplementation with Ile and AA in protein-restricted mother Wistar rats during pregnancy and lactation favors the growth of the length and weight of the long bones (radius, tibia, femur, humerus) of their offspring, and increases were also recorded. In the OD of the humerus, olecranon and radius.

Key words: protein restriction, essential amino acids, isoleucine, pregnancy, lactation, bone density.

I. INTRODUCCIÓN

La nutrición materna es el factor más importante que determina el crecimiento fetal óptimo, pues 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 (1). La proteína es el principal componente estructural de todas las células, incluidas las células óseas en el cuerpo (2). Por ello la ingesta de proteínas en la dieta tiene un papel importante en la acumulación del hueso durante la infancia y la adolescencia así como en el mantenimiento de la salud ósea a lo largo de la vida (3). 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, esto ocurre tanto en hombres como en mujeres, en general los hombres tienen una mayor densidad ósea (DO) que las mujeres, algunos factores son: mayor tamaño de las estructuras óseas, mayor pico de masa ósea, menor pérdida de masa ósea lineal en el tiempo (4). Muchos de los procesos fisiológicos que cumple la proteína son esenciales para el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del hueso por lo que una ingesta adecuada de proteínas resulta esencial para el desarrollo y mantenimiento de un hueso sano. Se ha estimado que el hueso comprende aproximadamente un 50% de proteína y un 50% de minerales (3). Asimismo, una dieta proteica deficiente es un factor causal documentado de un crecimiento esquelético y mantenimiento óseo deficiente que se observa en niños desnutridos, en ancianos y especialmente en mujeres en etapa posmenopáusicas, que a su vez también contribuye a la aparición de complicaciones patológicas en pacientes con fracturas (5-8).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la suplementación con aminoácidos esenciales durante la gestación y la lactancia en la densidad ósea en los huesos largos de ratas cría con restricción proteica. Se trata de un estudio experimental que se llevó a cabo en el bioterio de las instalaciones de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa), con ratas de la cepa Wistar. Las ratas Wistar hembra fueron apareadas, mientras que los machos solo participaron en el periodo de apareamiento.

Las hembras de 4 semanas de vida fueron expuestas a una restricción proteica para lograr un estado de depleción proteica antes de la gestación, alimentadas con una dieta AIN-93M estándar y otro grupo bajo en proteínas al 9%. Posterior a esto se comenzó con el periodo de apareamiento y la asignación aleatoria de ratas para cada grupo de estudio, quedando un grupo control, grupo bajo en proteína (GBP), grupo suplementado con mix de aminoácidos (GBP-AA) y grupo suplementado con isoleucina (GBP-Ile): la gestación duró de 21 a 22 días y al término de la lactancia se llevó a cabo el sacrificio. Las determinaciones que se llevaron a cabo fueron los cambios de peso, longitud de huesos largos, mediciones de albúmina, hemoglobina y finalmente la evaluación de la DO.

Para el análisis estadístico se usó el programa estadístico SPSS© (Stadistical Package for Social Sciences) versión 21.0 para Windows. Las comparaciones entre diferentes dietas y grupos en tratamiento se determinaron mediante ANOVA de una vía, post test Bonferroni o T3 de Dunnett. Se realizó un análisis de correlación de Pearson y las diferencias con valores de $p<0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Crecimiento

El crecimiento se describe como el proceso en el cual la masa de un ser vivo se ve incrementada por un 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). Así, el crecimiento es solo la manifestación de la capacidad de síntesis de un organismo y de cada una de las células, con un aumento en la relación ácido desoxirribonucleico/proteínas y una reducción consecuente de la cantidad de citoplasma formado en las células (10).

La falla de crecimiento lineal que se observa en los países en desarrollo ocurre durante los primeros mil días de vida que comprenden el periodo prenatal y hasta los dos años, en los países en desarrollo y en países muy pobres; en condiciones óptimas las tasas de crecimiento lineal después de dos años de edad son similares a las de los niños en Europa y América del Norte (11, 12). Un retraso en el crecimiento se relaciona con problemas en el desarrollo neurológico y cerebral; el rendimiento escolar y el coeficiente intelectual se asocian más fuertemente con el crecimiento temprano que con el crecimiento posterior. En un estudio hecho en niños de dos a cuatro años de edad el crecimiento lineal se relacionó con un aumento del coeficiente intelectual (4.28 puntos) entre los niños que recuperaron su peso al nacer, lo que sugiere posibles beneficios de la recuperación tardía en aquellos niños con restricción del crecimiento intrauterino (13).

Estudios en animales como en humanos indican que la baja ingesta de proteínas puede ser perjudicial para la adquisición de masa ósea durante el crecimiento y para su conservación durante la edad adulta (14). También se ha informado que los bebés con bajo peso al nacer pueden tener problemas sociales y emocionales y, al mismo, tiempo riesgo de trastornos psicológicos. En un estudio hecho en Japón se informó que las tasas de bajo peso al nacer mostraron un patrón en forma de U con reducciones del 5.5% y un aumento en la tasa de

bebés con bajo peso al nacer y una disminución en el peso promedio al nacer, debido a esto existe preocupación de que la estatura promedio también disminuya en un futuro (15). Por otro lado, un estudio hecho en humanos muestra que la desnutrición prenatal afectó permanentemente el tamaño del cerebro aproximadamente en 5% (16). Por lo tanto, los programas de intervención nutricional deben enfocarse en promover el crecimiento lineal en los primeros mil días de vida, así como el crecimiento intrauterino, ya que esto tendrá consecuencias positivas a largo plazo.

2.1.1.1 Crecimiento en la gestación

La etapa del crecimiento de mayor importancia es desde la concepción hasta el término de la gestación, pues la diferenciación fenotípica del producto es adquirida; su importancia es tanto funcional como estructural, comienza desde el campo celular para después continuar de manera progresiva con la formación tisular, orgánica y somática. Durante este período se adquieren entre otros aspectos del 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 (17). La nutrición materna es el factor más importante que determina el crecimiento fetal óptimo, cabe mencionar que 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 del producto y de acuerdo con el estado nutricio de la madre se permite el aporte de glucosa, aminoácidos y oxígeno que van a asegurar el establecimiento de un estado crónico de anabolismo fetal, 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 (1).

Entre más temprano ocurra un retraso del crecimiento intrauterino mayor será la probabilidad de alteraciones estructurales y funcionales ya sean genéticas o congénitas y

debido a esto la posibilidad de recuperación extrauterina del crecimiento va a ser menor. Asimismo, si el aporte de oxígeno o de nutrimentos es inferior al mínimo necesario para mantener una velocidad de crecimiento adecuada, el feto aumenta la secreción de catecolaminas con lo cual produce resistencia periférica a la acción de la insulina y en consecuencia a esto limita su tasa de crecimiento, de esta manera asegura la función y la supervivencia a costa de una longitud menor (17).

2.1.2 Factores que condicionan el crecimiento

La intensidad de la detención del crecimiento es directamente proporcional a la gravedad y duración del estado patológico que la provoque, así como al momento en que actúe, ya que una limitación de 50% del crecimiento durante un año, repercute en la estatura definitiva según la edad. Aunque la ingesta insuficiente de nutrientes es un factor limitante del crecimiento independientemente de su duración, esta produce un efecto significativo en la longitud o talla solo en aquellos episodios que ocurren durante dos a tres meses (18).

El crecimiento óseo longitudinal está a cargo de controles endocrinos complejos, de tal modo que el crecimiento óptimo ocurre solo en un individuo sano y bien alimentado. Si el individuo está enfermo o desnutrido, los niveles de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y las hormonas tiroides disminuyen y los niveles de glucocorticoides pueden aumentar, lo que da como resultado que el crecimiento lineal se afecte. Debido a lo anterior una correcta nutrición es importante para la regulación endocrina y para las funciones vitales en periodos de adversidad, en estos momentos, el crecimiento es un proceso no esencial que debe posponerse hasta la mejora del estado de salud o se garantice la disponibilidad de nutrientes; cuando esto ocurre el crecimiento se retrasa, pero es reversible (19, 20).

2.1.2.1 Alteraciones nutricionales

La nutrición implica un aporte constante 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. Se necesitan tres tipos de requerimientos nutricionales para cubrir de manera adecuada el crecimiento:

- Energéticos, los cuales por lo general se expresan en kilocalorías (Kcal) y dependen principalmente del consumo de hidratos de carbono y lípidos.
- Plásticos, dados por el consumo de proteínas, vitaminas y minerales.
- Oxidativos, en relación con el aporte de oxígeno a nivel tisular y celular, para que se pueda obtener una producción suficiente de energía y de temperatura.

Cuando existe una carencia prolongada de aporte calórico suficiente (aunque la proporción de hidratos de carbono 55 a 60%, lípidos 25 a 30% y proteínas 15 a 30% esté en equilibrio adecuado) el tejido graso se ve disminuido y posteriormente aumenta el consumo de proteínas tisulares, para finalmente ocasionar interrupción del crecimiento. Por otro lado, la deficiencia en la ingestión de uno o más nutrimentos esenciales (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerales) aun cuando la alimentación sea hipercalórica, produce a corto plazo detención del crecimiento. Incluso la falta de un solo aminoácido esencial para ciertos periodos de crecimiento conduce a una limitación del crecimiento en comparación con una dieta carente de todos los aminoácidos esenciales (10).

Las causas más frecuentes de alteración nutricia, y relacionadas con crecimiento subóptimo son: ingesta inadecuada de nutrientes, malabsorción, utilización anormal, problemas de la excreción y aporte insuficiente de oxígeno (10). Adoptar una dieta equilibrada, rica en nutrientes energéticos, minerales y vitaminas puede contribuir de manera significativa en la salud de los huesos. El papel de la nutrición en la salud ósea es muy importante pues participa tanto en la prevención como en el tratamiento de las enfermedades óseas (21), así como para alcanzar la DO adecuada, que es aquella que abarca desde la infancia hasta aproximadamente el trigésimo año de vida, así como para mantener la salud esquelética en toda la vida adulta; la DO del esqueleto adulto está determinada por la masa ósea máxima y la tasa de pérdida ósea.

Se ha demostrado que de un 20 a un 40% la capacidad para alcanzar el pico de masa ósea está determinada por factores ambientales como la nutrición, ejercicio, hábitos, enfermedades y el consumo de drogas. Es importante llevar una dieta saludable con cantidades adecuadas de micro y macronutrientes, tanto para disminuir el riesgo de fractura como para mejorar el proceso de curación posterior y para prevenir la osteoporosis, ya que ésta a su vez puede conducir fácilmente a un mayor riesgo de fracturas (22).

En el caso de las mujeres mayores a los 25 años de edad y los hombres mayores a 30 años, sí presentan una DO baja aumentaran las posibilidades de desarrollar osteoporosis en la cuarta década de la vida (21). La malnutrición es responsable de una evolución inadecuada e incompleta de la mayoría de los tipos de heridas y es muy frecuente en los adultos mayores; estos pacientes con fractura de cadera son más susceptibles a la desnutrición en comparación a la población de edad adulta (23).

2.1.2.1.1 Alteraciones nutricionales durante la gestación

La nutrición intrauterina insuficiente, da como resultado un cambio en el sistema endocrino y en la regulación metabólica, como mecanismo de protección de la funcionalidad cerebral, lo cual resulta en una disminución del tamaño corporal; sin embargo, aún se desconocen los mecanismos detallados que determinan el éxito o el fracaso de la recuperación del crecimiento (24). La mayoría de los conocimientos respecto a la regulación del crecimiento fetal por parte del mismo producto se extrapolan de otras especies animales a los seres humanos; sin embargo, algunos datos ya han sido demostrados en seres humanos:

- El aporte de glucosa y de aminoácidos a través de la placenta determina la secreción de insulina fetal en una relación directamente proporcional.
- La insulina fetal constituye uno de los reguladores principales de la velocidad de aporte placentario de glucosa y aminoácidos a partir de la duodécima semana de gestación; cuando existe una mayor cantidad de estos, existe mayor producción de insulina la cual genera mayor capacidad para su captación a futuro.

- 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).

Los estudios han indicado que la prevalencia del retraso en el crecimiento está relacionada con la ingesta total de proteínas en el periodo intrauterino (25, 26). Para un crecimiento y maduración esquelética óptima, se requiere de una ingesta adecuada de proteína en la dieta. La calidad de la proteínas de la dieta es de vital importancia para la fisiología del hueso durante una restricción moderada de proteínas, ya que éstas son esenciales para la síntesis de colágeno y la producción de proteínas de matriz no colágena en los huesos (27). Una variedad de proteínas de la matriz extracelular específica del hueso como lo son la osteocalcina, la sialoproteína ósea y la fibronectina también son importantes para la mineralización adecuada del esqueleto (28).

En un estudio se compararon dos dietas restringidas en proteínas (6% de la energía total como proteína) se informó que ratones Balb/C de 10 semanas de edad alimentados con una dieta a base de caseína durante 60 días mostraron un mayor aumento en la DO en comparación con aquellos ratones que fueron alimentados con una dieta de proteína a base de soya con una restricción de proteínas (29). Varios estudios epidemiológicos han encontrado una relación positiva significativa entre la ingesta de proteínas y la masa o DO (30), ya que la proteína de la dieta ejerce sus efectos sobre el hueso durante los periodos de crecimiento, esto debido a que la disponibilidad de IGF-I está regulada por proteínas de unión a IGF, mejorando la función diferenciada de osteoblastos y la formación de hueso (31).

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

2.2 Crecimiento del tejido óseo en la mineralización y densidad ósea

El sitio del hueso donde comienza la osificación se denomina núcleo o centro de osificación endocondral, su crecimiento está regulado por factores genéticos y hormonales que requieren un entorno celular y nutricional óptimo (32, 33). Los huesos se forman a partir de condensaciones de mesénquima y a partir de estas condensaciones los huesos largos se transforman en un modelo de cartílago hialino rodeado de pericondrio que se reemplaza gradualmente por hueso (32). La morfogénesis del cartílago es uno de los temas centrales en el desarrollo esquelético, pues aquí comienza el desarrollo de la formación de los patrones para culminar en la forma adulta. La geometría del cartílago determina la arquitectura futura de los huesos, articulaciones, ligamentos y tendones asociados (34, 35). Cabe destacar que, dentro de la placa de crecimiento, la proliferación de condrocitos, la hipertrofia y la diferenciación resultan en condrogénesis; posterior a esto el cartílago recién formado es invadido por los vasos sanguíneos y se modela en trabéculas óseas (20, 36-39). El efecto es que el nuevo tejido óseo se crea progresivamente en la parte inferior de la placa de crecimiento, lo que da como resultado un alargamiento óseo (20). Posterior a esto, durante el periodo perinatal, aparecen los centros secundarios de osificación en las epífisis del hueso, y durante esta etapa existe una interacción entre la invasión vascular, flujo intersticial de fluidos, la degradación de la matriz, la maduración e hipertrofia de condrocitos y la mineralización (40).

La tasa de proliferación de condrocitos juega un papel importante en la placa de crecimiento y por lo tanto la tasa de crecimiento óseo longitudinal disminuye progresivamente con la edad, por lo que la disminución en la función de la placa de crecimiento parece deberse a un mecanismo intrínseco más que a un mecanismo hormonal u otro mecanismo sistémico; que implica la disminución en la función, así como en la celularidad de la placa de crecimiento (19). La evidencia sugiere que su 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 (41).

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. 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, mientras que el 80% del peso esquelético es aportado por el hueso cortical. El hueso trabecular presenta un metabolismo más elevado que el hueso cortical; debido a esto es más susceptible a los cambios hormonales y terapéuticos (42).

Al ser el crecimiento un proceso de incremento de la masa ósea de un ser vivo (1), la nutrición materna es un factor importante para permitir este crecimiento fetal óptimo; dicho crecimiento ocurre solo en un individuo sano y bien alimentado, si el individuo está enfermo o presenta desnutrición el crecimiento lineal disminuye (2,3). Por lo que una nutrición adecuada durante los primeros mil días de vida es importante para que los niños alcancen su máximo potencial físico. Por lo tanto, una intervención nutricional debe enfocarse en esta etapa que pueden tener consecuencias a largo plazo. Adoptar una dieta equilibrada puede contribuir en la salud de los huesos, pues participa en la prevención y tratamiento de las enfermedades óseas (4-6).

Durante los últimos 25 años ha aumentado el interés en la medición del contenido mineral óseo en varias regiones del esqueleto, ya que en la osteoporosis los huesos son más propensos a rupturas. En todos los individuos la pérdida de la DO 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 (43, 44). En un estudio

hecho en mujeres premenopáusicas se pudo observar que la adherencia a una dieta mediterránea que incluye vegetales, frutas, granos enteros, frijoles, frutos secos, semillas, aceite de oliva, etc. Se asoció positivamente con una mejor masa ósea, dichas mediciones se obtuvieron mediante una ecografía ósea cuantitativa, absorciometría de rayos X de energía dual y por tomografía computarizada cuantitativa periférica (45).

La osteoporosis es un trastorno esquelético común caracterizado por una masa ósea baja, que conduce a una resistencia ósea reducida y por lo tanto a un mayor riesgo de fracturas (46). Se estima que afecta a unos 200 millones de personas en todo el mundo; de acuerdo con estadísticas de la International Osteoporosis Fundation, en todo el mundo una de cada tres mujeres mayores de 50 años y uno de cada cinco hombres sufrirán fracturas osteoporóticas a lo largo de su vida (47). Tanto la DO por área y la densidad volumétrica son los parámetros más utilizados para determinar la pérdida o ganancia de masa ósea, establecer la integridad del esqueleto y medir la cantidad de hueso (48).

Existen varios factores que contribuyen significativamente al riesgo de fractura, tales como el sexo, la edad, índice de masa corporal bajo, fracturas previas por fragilidad, antecedentes parentales de fractura de cadera, tabaquismo, consumo de alcohol de 3 o más unidades diarias (49). En un estudio hecho en lechones recién destetados con retraso en el crecimiento intrauterino y que posteriormente fueron alimentados adecuadamente durante el período de lactancia se registró que no alcanzaron el mismo crecimiento y desarrollo muscular en comparación con los lechones de peso normal al nacer, por lo tanto la restricción nutricional temprana posnatal dio como resultado un crecimiento deficiente del músculo esquelético y un retraso en la maduración de las miofibras de los lechones (50) y en otro estudio hecho en cerdos también sugiere que una alta ingesta de nutrientes en el periodo de lactancia podría mejorar el crecimiento y la madurez del músculo esquelético, puesto que está bien establecido que la actividad fisiológica está determinada en gran parte por el número total de fibras y la composición del tipo de fibras, siendo componentes clave del crecimiento (51, 52).

2.2.1 El efecto de la proteína en el tejido óseo

Los macronutrientes energéticos esenciales para la modelación ósea son los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, y los micronutrientes son calcio, vitamina D, vitamina K, magnesio, potasio y el fosforo, etc. Estos se encargan de modular el crecimiento y la formación de hueso (53), de todos los anteriores uno de los más importantes son las proteínas (54). La proteína es el principal componente estructural de todas las células, incluidas las células óseas en el cuerpo (2). Las proteínas son macromoléculas que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, que comprenden polímeros de aminoácidos de los cuales hay 20. La complejidad de la estructura de la proteína permite el cumplimiento de múltiples y variados procesos fisiológicos, incluidas las funciones en procesos estructurales (como el colágeno), contráctiles (miosina y actina), inmunitarios (anticuerpos) y reguladores (enzimas y hormonas) (55). Muchos de estos procesos son esenciales para el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del hueso y por lo tanto una ingesta adecuada de proteínas puede ser esencial para el desarrollo y mantenimiento de un hueso sano, ya que este comprende una matriz de proteína encerrada en un mineral cristalino; se ha estimado que el hueso comprende aproximadamente un 50% de proteína y un 50% de minerales (3). Por lo tanto, la resistencia ósea no depende solo de la mineralización, sino también de la integridad de sus componentes proteicos. Además de su función estructural, la ingesta adecuada de proteínas es esencial para estimular la actividad de las hormonas anabólicas y los factores de crecimiento, la mayoría de los cuales tienen funciones esenciales en la regulación de la masa ósea y su microarquitectura (56).

La ingesta de proteínas en la dieta tiene un papel importante en la acumulación del hueso durante la infancia y la adolescencia así como en el mantenimiento de la salud ósea y a lo largo de la vida (3). Una dieta proteica deficiente es un factor causal documentado del crecimiento esquelético y mantenimiento óseo deficiente observado en niños desnutridos, en adultos mayores y especialmente en mujeres en etapa posmenopáusicas, que a su vez también contribuye a la aparición de complicaciones patológicas en pacientes con fracturas (5-8). En las personas adultas mayores el mantenimiento de la masa ósea está estrictamente relacionado con la masa muscular funcional y como resultado los pacientes con bajo aporte

proteico presentan mayor despojo muscular y pérdida ósea (57). Adicionalmente al relacionar la ingesta de proteína con la curación de fracturas se sugiere que el consumo de proteína no afecta negativamente el proceso de curación y que en realidad disminuye las consecuencias de la fractura en hombres y mujeres, teniendo un efecto benéfico (58, 59).

Estudios en animales y humanos registran que una dieta baja en proteínas está relacionada con una menor densidad y contenido mineral óseo en comparación al grupo control (60-67). Por otro lado, en un estudio transversal se informó que en niños y adolescentes de 6 a 18 años la proteína de la dieta tuvo un efecto benéfico sobre la resistencia ósea diafisaria durante el crecimiento (68). En otro estudio en adolescentes sanos de entre 9 y 19 años se observó una relación positiva entre la ingesta de proteínas y el contenido mineral óseo, así como en la DO en los sitios lumbares y femorales (69). Mientras que en un estudio en hombres y mujeres de 50 a 69 años se reportó que la ingesta de proteínas en la dieta tanto de origen animal como vegetal estaba relacionado con la reducción del riesgo de fracturas osteoporóticas de cadera (5). Sin embargo, en un estudio en mujeres enfermeras no se encontró evidencia que respalde una asociación entre las fracturas de cadera y la ingesta de proteínas, por lo cual esta relación aún no está clara y pocos estudios han examinado la asociación de fuentes de proteína específicas con fracturas de cadera (70).

Durante muchos años el papel de las proteínas en la salud ósea ha sido cuestionado debido a que muchos postulan que la ingesta alta de proteínas en la dieta podría ser perjudicial para el hueso debido a la carga ácida que esta puede imponer en el cuerpo, mejor conocido como la hipótesis de la ceniza ácida (71). Sin embargo, existe evidencia de varios mecanismos tanto directos como indirectos a través de los cuales las proteínas pueden proteger a los huesos (14). En resumen la proteína es un nutriente esencial para la salud ósea, pues tiene un efecto anabólico en el hueso que se debe a la provisión de aminoácidos (72). Sin embargo, es importante aclarar las cantidades, las fuentes de alimentos y el momento para permitir la optimización de esta influencia protectora y asimismo una reducción en el riesgo de fractura.

Las ingestas de proteínas superiores a las recomendadas parecen estar justificadas en algunas situaciones, como en los atletas que tienen un gasto energético elevado relacionado con el entrenamiento y un alto requerimiento de reparación y adaptación músculo esquelética, en las personas que tienen una disponibilidad de energía reducida o en aquellos individuos en las etapas anteriores o en la vida adulta (72). Aunque en estas situaciones se puede requerir una ingesta de proteína superior a la recomendada (0.8 g/kg/día), aunque no está claro que tan altas deberían ser estas ingestas de proteínas. Es importante mencionar que es necesario que una mayor ingesta de proteínas no ocurra a expensas de la idoneidad de otros nutrientes o que genere un excedente inadvertido de energía ya que de ser así puede afectar negativamente a los huesos, particularmente a individuos sedentarios (73).

En contraste, en un estudio en ratas Wistar se observó que la restricción de proteína afectó negativamente la composición corporal y el metabolismo óseo por lo cual la fragilidad del hueso se vio afectada en comparación con el grupo control (8). Por lo tanto, la ingesta de proteínas es parte esencial para la adquisición y el mantenimiento de la masa muscular, aumentando la absorción de aminoácidos que estimulan la síntesis de proteínas musculares, esto debido a que la masa muscular se asocia con la masa ósea durante el desarrollo, el crecimiento y por lo tanto, se correlaciona positivamente con la masa ósea en el envejecimiento (57, 74).

De acuerdo con un estudio hecho en adultos jóvenes se registró que los hombres y mujeres pueden tener diferentes respuestas óseas al aumento de la ingesta de proteínas durante su participan en un programa de fuerza y acondicionamiento (75). Los estudios sugieren un efecto perjudicial de la alta ingesta de proteínas en el hueso o bien ninguna asociación, pero otros estudios han encontrado una asociación positiva entre el aumento de la ingesta de proteínas y las medidas óseas como el contenido mineral óseo y la densidad mineral ósea, principalmente en las mujeres perimenopáusicas y hombres mayores (76).

2.2.2.1 El efecto de los aminoácidos en el tejido óseo

Un hueso sano contempla la presencia de colágeno, que es la proteína que forma el marco óseo, en el que se deposita el calcio; por lo cual la construcción y el funcionamiento adecuado del hueso están relacionados con un colágeno saludable. Así como son importantes las cantidades de calcio y de vitamina D en un hueso sano también se requieren cantidades suficientes de aminoácidos esenciales (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano y valina) otros micronutrientes para la formación de la estructura del colágeno. La lisina es un aminoácido esencial, como consecuencia habrá una escasez de este nutriente en situaciones de desnutrición o deficiente ingesta, lo cual puede agravarse aún más por el estrés inducido por una fractura ósea (77).

Las dietas con maíz son un alimento básico e importante en los países en desarrollo, pero contienen proteínas de bajo valor biológico, la lisina es generalmente en primer aminoácido limitante en los alimentos, seguido del triptófano; las deficiencias en la ingesta de lisina disminuyen la síntesis de proteínas y causan pérdida de peso en los lactantes (25, 78, 79). Además, 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 en cantidad si no también calidad, con un contenido de aminoácidos bien equilibrado, para lograr un crecimiento lineal (80, 81).

En un estudio realizado en niños de 12 a 59 meses de edad en zonas rurales de Malawi, se mostró una asociación entre el retraso del crecimiento y bajos niveles circulantes de todos los aminoácidos esenciales, principalmente de isoleucina, treonina y leucina; por lo tanto, la suplementación con ciertos aminoácidos puede ser una estrategia efectiva en estados nutricionales como la desnutrición (82). En los animales, los aminoácidos plasmáticos fluctúan según la ingesta nutricional, particularmente en respuesta al contenido de proteínas y la deficiencia de aminoácidos únicos (83, 84). 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 las principales limitantes en la dieta. Otros aminoácidos esenciales como la valina, leucina, isoleucina y metionina, mejoraron significativamente sus niveles circulantes en sangre mediante la suplementación con proteína de soya junto con lisina, correlacionándose altamente con la longitud corporal. Por lo cual se puede concluir que la combinación de aminoácidos investigados (lisina, triptófano, valina, isoleucina y metionina) es óptima para logar un crecimiento lineal en ratas (85).

En un estudio clínico aleatorizado con 131 pacientes de 15 a 75 años se evaluó el efecto de la suplementación con micronutrientes involucrados en la formación de colágeno en el periodo de curación de fractura en la tibia; se observó que el grupo que consumía los micronutrientes (vitamina C, lisina, prolina y vitamina B6) mostró una aceleración en el tiempo de curación de la fractura a las 14 semanas en comparación al grupo control (77). La matriz de proteína ósea sufre renovación continua y remodelación; por lo tanto, se necesita un suministro adecuado de aminoácidos y sustrato mineral para apoyar la formación y el mantenimiento del hueso en las diferentes etapas de la vida. Debido a la reticulación de las moléculas de colágeno en el hueso que implica modificaciones postraduccionales de los aminoácidos (incluida la hidroxilación de lisina y prolina), muchos de los fragmentos de colágeno liberados durante la proteólisis como parte de la remodelación ósea no pueden reutilizarse para construir una nueva matriz ósea. En consecuencia, es necesario un suministro diario de proteína en la dieta para la acumulación ósea continua antes de alcanzar la masa ósea máxima, dado que esta se alcanza entre los 30 y 35 años y también para el mantenimiento posterior (86, 87).

A nivel mundial los patrones dietéticos varían de un lugar a otro y podemos encontrar el vegetarianismo en el cual se excluye la carne, pescado y algunos productos de origen animal como lácteos y huevo (88). En el caso de las dietas vegetarianas crónicas, estás pueden provocar problemas de osteoporosis, puesto que los vegetarianos y particularmente los veganos pueden estar en riesgo de una menor DO y fracturas, debido a una ingesta insuficiente de nutrientes. De igual manera el uso de suplementos puede ayudar a garantizar un estado óseo saludable para reducir este riesgo; así como la función hormonal

deteriorada, el embarazo, la lactancia, la nutrición, el ejercicio y otras enfermedades como la anorexia nerviosa pueden afectar el logro de la densidad ósea máxima (89, 90). En un estudio hecho en niños se pudo observar que una dieta vegetariana bien planificada no conduce a una masa ósea significativamente menor; sin embargo, los niños que seguían una dieta lacto-ovo-vegetariana tuvieron una mayor tasa de recambio óseo y cambios sutiles en los marcadores reguladores óseos (91).

Ya se ha mencionado que la osteoporosis puede conducir fácilmente a fracturas, es por esto que un buen programa nutricional puede prevenir la osteoporosis y regular otros problemas relacionados a la deficiencia de nutrientes y, por lo tanto, prevenir las fracturas (22). En un estudio se llevó a cabo una revisión sistemática de las guías de práctica clínica para osteoporosis y se encontró que las recomendaciones consistían en una serie de intervenciones para modificar el estilo de vida, principalmente la ingesta de calcio, vitamina D y ejercicio. Algunas otras recomendaciones incluyen mantener una ingesta adecuada de proteínas, identificar y tratar los factores de riesgo de caídas y limitar el consumo de café, alcohol y tabaco. La prevención eficaz de las fracturas mediante la reducción de la pérdida de la masa ósea es uno de los objetivos principales para tratar a las personas con osteoporosis y cada factor ya mencionado o una combinación de estos puede beneficiar a los pacientes (92-95).

2.3 Planteamiento del problema

La dieta es uno de los principales factores modificables que están asociados a la salud ósea (95). Se ha demostrado que una baja ingesta de proteínas tiene efectos nocivos en la adquisición y conservación de masa ósea, debido a que el hueso sufre una remodelación continua y necesita de un suministro adecuado de aminoácidos para apoyar la formación de hueso nuevo. En los periodos de desarrollo de los humanos y animales, el crecimiento esquelético es importante pues es una etapa de moldeado óseo que comienza durante el crecimiento fetal y termina en la vida adulta, en dónde los huesos se expanden y se alargan (96). Las proteínas resultan benéficas para la salud ósea, una ingesta adecuada de aminoácidos esenciales se asocia con una mayor DO, por lo que se sugiere que los aminoácidos además de formar la matiz ósea aumentan la absorción de calcio (97, 98).

En niños, el estado óseo durante la infancia es un indicador del estado óseo en la vida adulta (99, 100) y un factor de predicción de la osteoporosis (101). Por lo que se evidencia la vulnerabilidad del esqueleto en etapas de desarrollo antes de llegar al pico de masa ósea máxima (102-105). Un estudio en ratas informa que una dieta baja en proteínas disminuye la DO (9%), lo que provoca un adelgazamiento cortical además de una menor resistencia mecánica. En el hueso esponjoso la deficiencia de proteínas deprime transitoriamente la tasa de formación ósea y la tasa de aposición mineral, lo cual indica una disminución en la formación y actividad de los osteoblastos (63).

Por lo tanto, se pretendió evaluar el efecto que tiene la suplementación de aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina) en el crecimiento esquelético de las crías Wistar con restricción proteica durante la gestación y lactancia. El impacto de la suplementación con isoleucina en la densidad ósea de huesos largos (fémur, tibia, fíbula, húmero, radio y olécranon) en una condición de desnutrición proteica materna.

III. JUSTIFICACIÓN

En un estado de desnutrición o de carencia alimentaria, el proceso de crecimiento se detiene por un déficit en nutrientes esenciales, en los que se encuentran las proteínas. Además, es importante considerar que la población ha optado por dietas vegetarianas o veganas, que se asocian con un menor consumo de proteínas. La baja ingesta de proteínas de alto valor biológico afecta la DO dando como resultado un mayor riesgo de fracturas, osteoporosis y finalmente la invalidez.

Una estrategia efectiva es la suplementación con aminoácidos esenciales, ya que, aunque las proteínas de origen animal contienen un adecuado equilibrio de aminoácidos, no siempre son de fácil acceso y suelen ser costosas. Las proteínas son esenciales en periodos críticos de la vida como lo son la gestación y los primeros días de vida; ante una carente ingesta de proteínas de alto valor biológico, una disponibilidad adecuada de aminoácidos esenciales como leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina podrían favorecer el crecimiento y la densidad ósea.

Ante la imposibilidad ética de hacer este tipo de intervenciones en humanos, los modelos animales son útiles para responder preguntas sobre el efecto de la suplementación en crías de madres gestantes y en periodo de lactancia. A partir de estos datos se puede obtener información relevante de la relación que tiene la restricción proteica en el periodo intrauterino y de lactancia sobre la salud ósea de sus crías.

El estudio de la suplementación con aminoácidos esenciales es importante debido a que los resultados proveerán de evidencia sobre su efecto conjunto e independiente en el crecimiento óseo y la DO en las crías de rata Wistar nacidas de madres con una condición de restricción proteica. Estos datos pueden utilizarse para diseñar estudios en humanos enfocados a mejorar el crecimiento lineal en poblaciones con déficit en la ingesta de proteínas.

IV. HIPÓTESIS

La suplementación con aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina) en las ratas madre Wistar con restricción proteica tiene un efecto positivo en la densidad ósea de los huesos largos de las patas delanteras y traseras de sus crías.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina) en la densidad ósea de los huesos largos de las crías de ratas Wistar hembra con restricción proteica materna durante la gestación y lactancia.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar los cambios de peso de las ratas hembra Wistar desnutridas durante la gestación y lactancia asociados a la ingesta de una dieta con isoleucina y mix de aminoácidos esenciales y a una dieta AIN-93G al 64% de su requerimiento diario de proteína.

2. Evaluar el estatus proteico de ratas cría Wistar a través de la cuantificación de albúmina y hemoglobina sérica.

3. Determinar la densidad ósea mediante radiovisiografía de patas delanteras y traseras de ratas crías nacidas de madres con depleción proteica que fueron suplementadas con mix de aminoácidos esenciales o isoleucina.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Contexto de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el bioterio de las instalaciones de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa), con ratas de la cepa Wistar en un periodo de enero 2019 a junio del 2019. El proyecto de investigación fue aprobado (Folio CIECUAL-006-2018) por el CIECUAL (Comité Institucional de Ética, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAEH) 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, Anexo 1.

Tipo y diseño de estudio

Estudio experimental.

6.2 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- Ratas Wistar hembra de 4 semanas de edad.
- Ratas Wistar macho adulto.
- Ratas Wistar machos y hembras libres de cualquier patógeno.
- Animales recién destetados de 21 días de vida con un peso semejante.
- Ratas adulto sexualmente maduros

Exclusión:

- Animales de laboratorio con algún proceso patológico agudo o crónico.
- Animales que no consuman la dieta de mix de aminoácidos o isoleucina.
- Crías muertas antes de los 21 días edad.

6.3 Tamaño de muestra y muestreo

Estudio aleatorio con 18 ratas Wistar (12 hembras y 4 machos) adquiridas del Bioterio del ICSa. Para fines de este estudio se formaron 4 grupos de estudio con 3 ratas hembra (ratas madre) cada uno y 1 macho por cada grupo (solo para el apareamiento).

6.4 Diagrama de diseño experimental

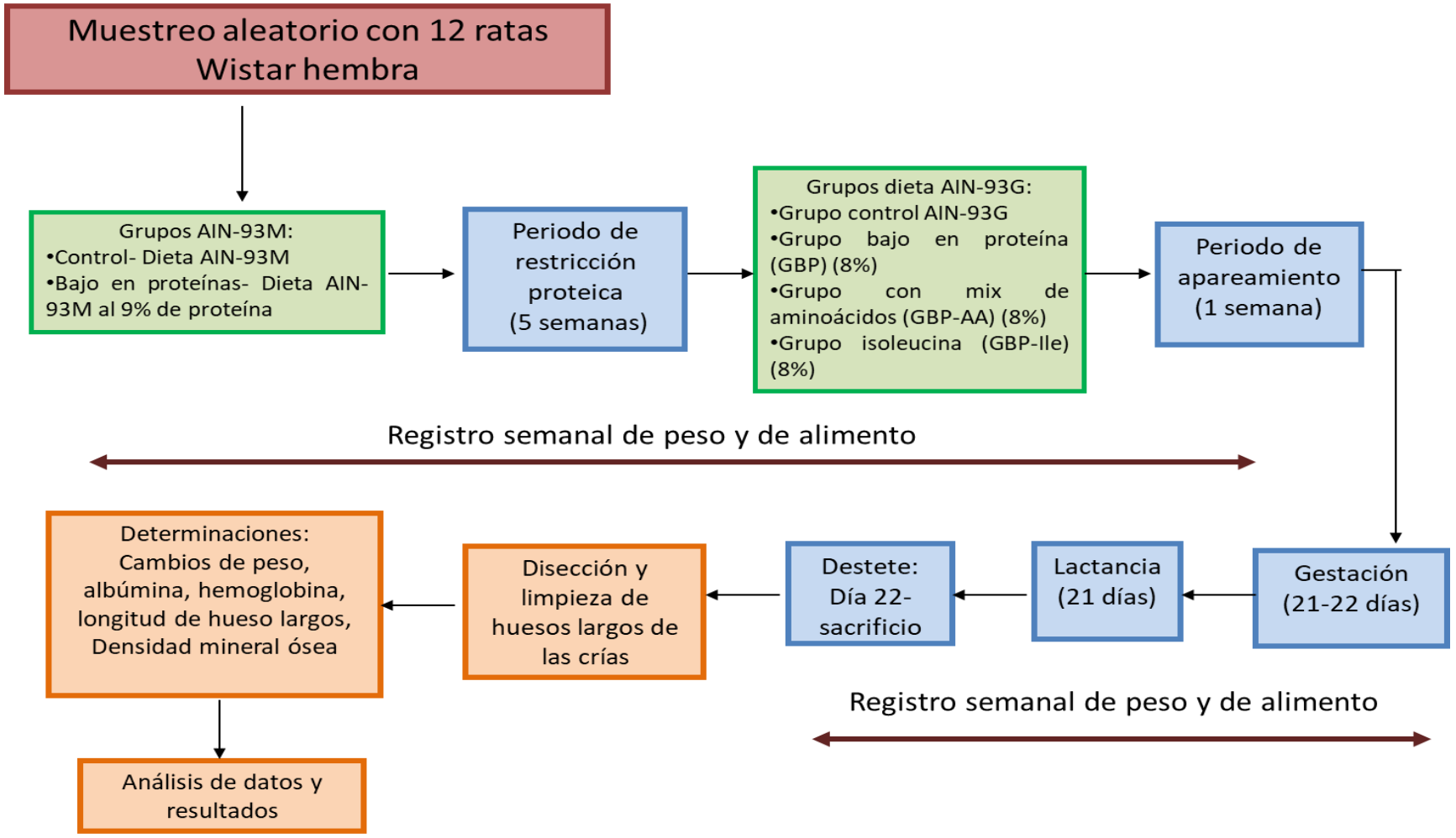


Figura 1. Diseño experimental del estudio

6.5 Definición operacional de variables (dependientes, independientes)

Tabla 1. Definición operacional de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Independientes			
Dieta AIN-93M	Dieta AIN-93M de mantenimiento para roedores.	Dieta AIN-93M para grupo control en periodo de acondicionamiento, con 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 con 20% de proteína.	g
Dieta baja en proteínas	Dieta AIN-93G baja en proteínas.	Dieta AIN-93G modificada al 10% de proteína total para el periodo de gestación y lactancia, grupo bajo en proteína (GBP).	g
Dieta Mix de aminoácidos	Dieta AIN-93G baja en proteínas.	Dieta AIN-93G modificada al 10% de proteína total para el periodo de gestación y lactancia, y 2 veces el requerimiento diario de 7 aminoácidos esenciales (Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Treonina, Triptófano y Valina); denominado grupo bajo en proteínas con mix de aminoácidos (GBP-AA).	g
Dieta con isoleucina	Dieta AIN-93G modificada en proteínas	Con una dieta AIN93G modificada al 10% de proteína total para el periodo de gestación y lactancia, y 2 veces el requerimiento diario del aminoácido Isoleucina (GBP-Ile).	g
Dependientes			
Hemoglobina	Cantidad de hemoglobina en sangre.	Muestra capilar de sangre total de la última porción de la cola de la rata madre evaluada con un fotómetro portátil (HemoCue®).	g/dL
Albúmina	Cantidad de albúmina en sangre.	Muestra de sangre en el sacrificio por método colorimétrico con un lector de placas BioTek®	g/dL

Ingesta de energía	Cantidad de energía y nutrientes ingeridos.	Sumatorio total del consumo semanal de alimento, pesado con una báscula TANITA KD-160®, multiplicado por el aporte calórico de macronutrientes.	g
Longitud ósea	Medición del tamaño en longitud en los huesos.	Medición con un vernier Scala® para obtener la longitud entre la cabeza del húmero y el cóndilo del húmero y entre la cabeza del radio y la apófisis estiloidea del radio.	mm
Densidad ósea	Medida de la cantidad de minerales por unidad de área en los huesos.	Estimulación de rayos X con sensor digital. Equipo Corix 70 Plus-USV 70 KVp-8Ma, Corix Medical Systems®.	g/cm^2
Cambios de peso	Registro de la ganancia o pérdida de peso semanal de ratas Wistar madre.	Peso semanal medido con una Balanza Triple Beam 700/800 series OHAUS®, con una precisión de 0,1 g.	g

Prueba, principio y procedimiento

Se utilizaron 12 ratas hembra Wistar de 4 semana de vida alimentadas con una dieta AIN-93M estándar para el grupo control (3 animales) y al 9% de proteína, que corresponde al 64% del requerimiento diario, para el GBP (12 animales) durante 5 semanas, registrando el peso por semana; posterior a este periodo, se inició el apareamiento y la asignación aleatoria de ratas para cada uno de los grupos de estudio (Grupo control, GBP, GBP-AA y GBP-Ile), Figura 1. En las ratas madre al inicio de la gestación se tomó una muestra de hemoglobina para determinar la depleción proteica, durante la gestación y lactancia se alimentaron con una dieta AIN-93G estándar para el grupo control y al 10% de proteína total en los grupos con tratamiento. Al término de la lactancia se registró el peso de las crías destetadas, posteriormente se sacrificaron, tomando una muestra de sangre para determinar hemoglobina y albúmina sérica, estas mismas determinaciones se realizaron en las madres. Se cortaron las patas traseras y delanteras de las crías para su disección y obtención de huesos largos, finalmente se midieron y pesaron cada uno de los huesos largos y se hicieron determinaciones de densidad ósea en cada uno de los huesos, Figura 1.

6.5.1 Animales de experimentación

Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Se utilizaron inicialmente 12 ratas Wistar hembra de 4 semanas de vida y 4 machos adultos. Hembras y machos se aparearon con 10 semanas de vida, con el fin de lograr una gestación en las ratas hembra a quienes se incluyeron en los tratamientos.

6.5.2 Condiciones de alojamiento

Durante el periodo de experimentación los animales fueron alojados en el bioterio 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 alimento fue controlado, es decir, únicamente se les proporcionaban los gramos de ingesta diaria recomendada para su peso y edad. En función de la etapa del protocolo experimental, los animales se alojaron en grupos de 3 animales (periodo de acondicionamiento y restricción proteica) o de 2 animales (periodo de apareamiento) en cajas de acrílico, en forma individual se mantuvieron a las ratas madres para las etapas de gestación y lactancia.

6.5.3 Dietas

Las dietas utilizadas fueron la AIN-93M y la AIN-93G para roedores (106), 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 fue elaborado en el Laboratorio de Nutrición Molecular del ICSa-UAEH, tomando como referencia las dietas AIN-93M y AIN-93G, Tabla 3, para las distintas formulaciones de cada grupo de estudio. El alimento una vez elaborado se colocó en charolas para su secado a temperatura ambiente, y posteriormente se almacenó en refrigeración para su conservación.

Las hembras de 4 semanas de vida fueron inducidas durante 5 semanas a una restricción de proteína, se les dio una dieta AIN-93M al 9% de proteína, lo que representara el 64% de su requerimiento diario, para lograr un estado de depleción proteínica antes de la gestación en el periodo antes de la gestación (PG), Tabla 3; las hembras control no fueron inducidas a esta depleción proteica, consumieron las dieta estándar AIN-93M, Tabla 3.

Durante el periodo de gestación y la lactancia (PGL) se colocó una hembra en cada caja, quién fue alimentada de acuerdo con el grupo de experimentación al que fue asignado.

1. Dieta AIN-93G (grupo control).
2. Dieta AIN-93G modificada al 10% de proteína total, grupo bajo en proteína (GBP).
3. Dieta AIN-93G modificada al 10% de proteína total y 2 veces el requerimiento diario de 7 aminoácidos esenciales (Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Treonina, Triptófano y Valina) denominado grupo bajo en proteínas más aminoácidos (GBP-AA).
4. Dieta AIN93G modificada al 10% de proteína total y 2 veces el requerimiento diario del aminoácido Isoleucina (GBP-Ile).

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

	Dieta *g/kg*	
Nutriente	AIN-93G	AIN-93M
Energía total, *kcal*	3766	3601
% de proteína	19.3	14.1
% de HCO	64	75.9
% de grasas	16.7	10
Humedad, g	66	68
Grasa total, g	70	40
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
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	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	7
Ceniza total, g	41.7	38.9

Tabla tomada del artículo: Reeves, P. G. y colaboradores (106).

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

	Control		GBP		GBP-AA	GBP-Ile
	PG	PGL	PG	PGL	PGL	
Ingredientes				g/kg dieta		
Almidón de maíz	465.7	397.5	515.7	517.5	517.5	517.5
Caseína	140	200	90	80	80	80
Dextrina	155	132	155	132	132	132
Sacarosa	100	100	100	100	100	100
Aceite de soja	40	70	40	70	70	70
Fibra	50	50	50	50	50	50
Mix de minerales	35	35	35	35	35	35
Mix de vitaminas	10	10	10	10	10	10
L-cistina	1.8	3	1.8	3	3	3
Bitartrato de colina	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Histidina	3.3	4.6	3	4.2	7.3	-
Isoleucina	5.9	8.5	5.4	7.8	13.6	13.6
Leucina	10.9	15.4	9.9	14.2	24.6	-
Lisina	9.2	13	8.4	11.9	20.8	-
Treonina	4.7	6.7	4.3	6.2	10.7	-
Valina	7	10	6.4	9.2	16	-
Triptófano	1.6	2.1	1.4	1.9	3.4	-

PG= periodo antes de la gestación, PGL= periodo de gestación y lactancia, Control= grupo control, GBP= Grupo Bajo en Proteína, GBP-AA = Grupo Bajo en Proteína suplementado con Mix de Aminoácidos, GBP-Ile = Grupo Bajo en Proteína suplementado con Isoleucina. Tabla adaptada del artículo: Reeves, P.G. y colaboradores (106).

6.5.4 Apareamiento

Posterior al periodo de restricción proteica con la dieta AIN-93M al 9% de proteína total, las hembras vírgenes fueron inducidas al apareamiento con machos adultos. Se colocaron individualmente una hembra con un macho durante 7 días continuos. El apareamiento fue confirmado por la presencia del tapón espermático en la vagina de la hembra, esta confirmación delimitó el inicio de la gestación.

6.5.5 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 y 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 4 grupos y las crías nacidas se alojaron con sus madres durante el periodo de lactancia. Un día después del parto, fue ajustado el número de crías por grupo a 6 hembras y 6 machos. La lactancia se continuó durante los 21 días posteriores al nacimiento, al día 22 las crías fueron destetadas y sacrificadas.

6.5.6 Registro de peso e ingesta calórica

Se tomó un registro de 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 en la pérdida o ganancia de peso de las ratas gestantes, para esta actividad se ocupó una balanza Triple Beam 700/800 series OHAUS®, con una precisión de 0,1 g. Se tomó un registro de 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, para esta actividad se utilizó una balanza Triple Beam 700/800 series OHAUS®, con una precisión de 0,1 g.

En cuanto a la ingesta de energía en las madres, se realizaron mediciones continuas (2 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 kilocalorías ingeridas para cada grupo de estudio, así como la ingesta total de energía durante el PG y PGL, sumando las semanas correspondientes a cada uno.

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

	Kcal/g
Control (PG)	3.95
Control (PGL)	3.96
GBP (PG)	3.88
GBP (PGL)	3.92
GBP-AA (PGL)	4.34
GBP-Ile (PGL)	4.01

Control= Grupo control, PG= periodo antes de la gestación, PGL= periodo de gestación y lactancia.

6.5.7 Sacrificio

Previo al inicio del sacrificio (8 horas antes) el alimento fue retirado a todos los animales, solo se dejó agua simple a todos los grupos, para tomar la muestra de sangre en condiciones post absorbidas. Las ratas fueron anestesiadas utilizando el anestésico ISOFLURAN marca Vedco® y sacrificadas en la guillotina. La sangre obtenida fue centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, en la centrifugadora DRAGONLAB®, modelo DM0412 para obtener el suero, el cual fue congelado a -35 grados centígrados. Posterior a esto, se procedió a la disección de tejido muscular y huesos largos.

6.5.8 Cuantificación de hemoglobina sérica

Con un fotómetro portátil (HemoCue®) se midió la hemoglobina (g/dL) el equipo cuenta con una absorbancia de 565 nm y 880 nm, se utilizaron micro cubetas compatibles con el equipo las cuales miden la hemoglobina con el método de la azidametahemoglobina (107). La muestra de sangre capilar se tomó de la última porción de la cola de la rata, la cual fue colocada en las micro cubetas y posteriormente se colocó dentro del equipo, se esperaron 10 segundo y se obtuvo la medición, la cual fue registrada. Esta medición se llevó a cabo en dos momentos de la intervención, al inicio de la gestación (en ratas madre) y al finalizar el periodo de lactancia (en ratas madre y crías) para diagnosticar el nivel de hemoglobina basal y determinar los efectos de la suplementación. Se utilizaron valores de referencia de 11 a 13 ± 1 g/dL para las crías en el primer mes de vida y en las madres adultas de 13 ± 1 g/dL (108).

6.5.9 Cuantificación de albúmina sérica

Sin una separación previa la albúmina reacciona particularmente con la forma aniónica de la 3, 3´,5,5´-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCG). Cuando la absorbancia aumenta a 625 nm respecto del blanco de reactivo, esto quiere decir que es proporcional a la cantidad de albúmina que está presente en la muestra (109). Se determinó el nivel de albúmina en suero por un método colorimétrico, utilizando un *kit* de Wiener Lab®. En una microplaca se colocó 1 µL de suero y 250 µL 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 de E.U.A a 625 nm. Para obtener la concentración de albúmina se utilizó la siguiente fórmula (110):

$$\frac{Albúmina}{Estándar} x\ Blanco$$

Ecuación 1. Determinación de albúmina

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 (111) y de 2.76 ± 0.3 g/dL para las crías (León, 2011).

6.5.10 Disección de huesos largos

La disección consiste en la separación de las partes de un organismo, de tal forma que sea posible estudiar sus estructuras y relaciones anatómicas, la técnica consiste en la separación del tejido conjuntivo que une a los órganos por medio de un instrumento (112).

Las crías de las madres alimentadas durante su gestación y lactancia con las dietas control, GBP, GBP-AA y GBP-Ile; 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. El húmero y el radio unidos fueron pesados con los músculos que lo recubren para obtener el peso total (Figura 3), músculo tríceps braquial (*caput laterale),* músculo tríceps braquial (*caput longum*), músculo biceps braquial, músculo braquial y músculos extensores (*carpi et digitorum).* Después del registro del peso total de la pata delantera se procedió a separar los músculos del hueso, para dejar libre a los huesos, los cuales fueron limpiados con una solución al 1% 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 obetener la longitud entre la cabeza del húmero y el cóndilo del húmero y entre la cabeza del radio y la apófisis estiloidea del radio. Los valores fueron registrados en cm.

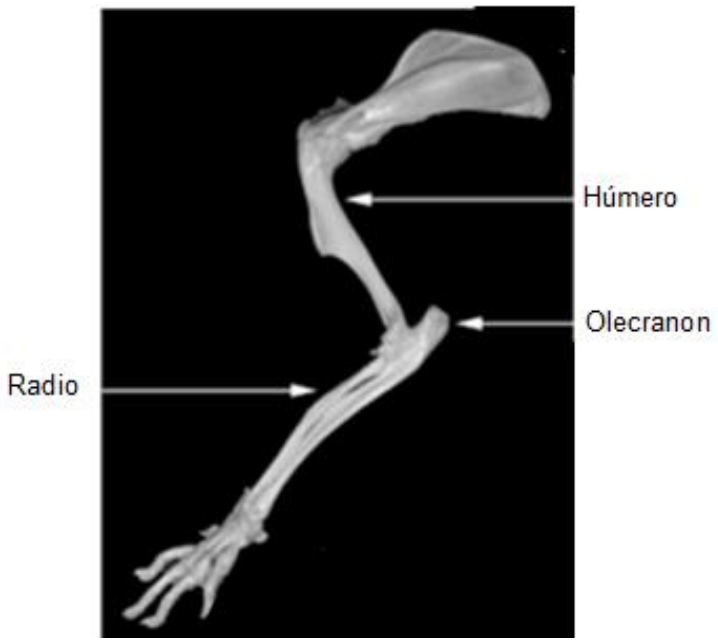


Figura 2. Estructura de huesos de pata delantera derecha de roedor. Imagen obtenida de: Atlas Sketal System (113)

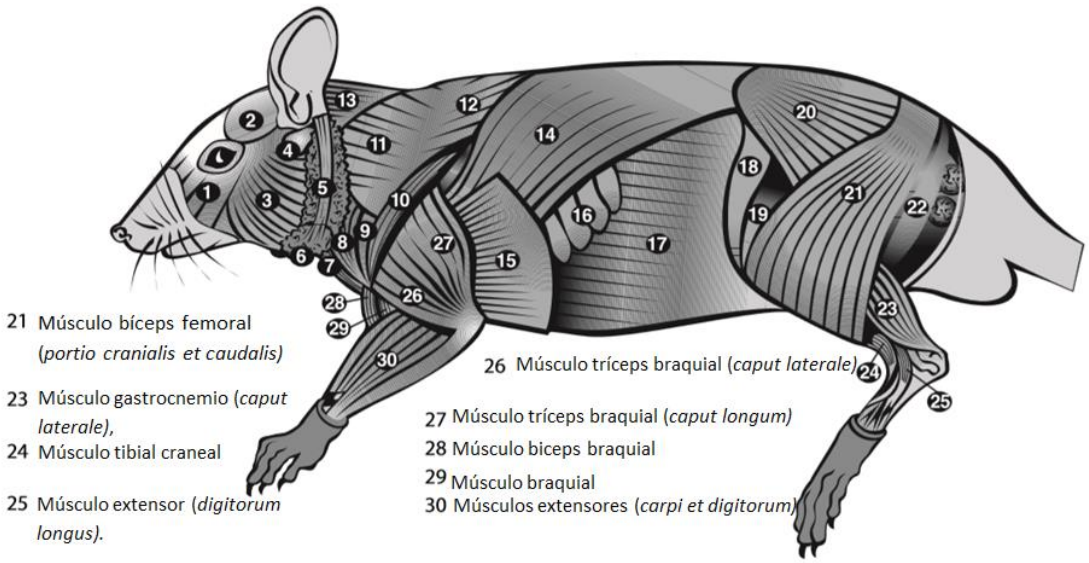


Figura 3. Estructura de los músculos superficiales de rata**.** Imagen obtenida de: Gross Anatomy (114)

La disección de la pata trasera (Figura 4) 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. El fémur, la tibia y la fíbula unidos fueron pesados con los músculos que lo recubren para obtener el peso total (Figura 3), músculo bíceps femoral (*portio cranialis et caudalis)*, músculo gastrocnemio (*caput laterale)*, músculo tibial craneal y músculo extensor (*digitorum longus).* Después del registro del peso total se procedió a separar los músculos del hueso, para dejar libre a los huesos, los cuales fueron limpiados con una solución al 1% de Tergacyme a 50°C durante 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.

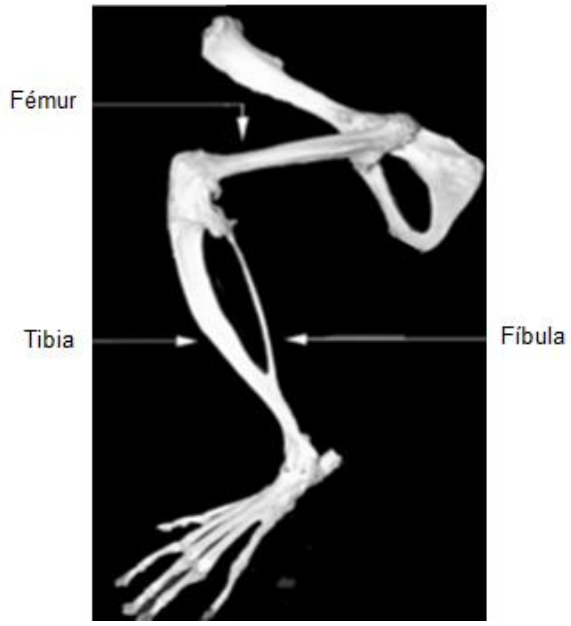


Figura 4. Estructura de huesos de pata trasera derecha de rata**.** Imagen obtenida de: Atlas Sketal System, (113)

6.5.11 Determinación de densidad ósea

La radiología digital o radiovisiografia es caracterizada por ser un sistema de diagnóstico por medio de imágenes capturadas con ayuda de un sensor especial, es un sistema que

consta de un generador de rayos X adaptable, captador de radiación o sensor, unidad de producción de imágenes, monitor y una impresora (115).

Para realizar esta determinación en los huesos de ratas cría se utilizó un radiovisiografo 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 es iniciado el programa se hace el registro de las muestras para así poder identificarlas, posteriormente las muestras óseas ya limpias se colocan una por una en la placa de rayos X, se acerca el sensor y se colocó a una distancia de 1 cm centrando las muestras, se presionó el botón para la exposición de 0.15 segundos y se retiró la muestra (116).

Al obtener las imágenes estás 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 fue la parte media de la epífisis proximal, diáfisis y epífisis distal (figura 5); se sacó un promedio por cada hueso de cada grupo, midiendo así su nivel de radiopacidad, permitiendo también registrar las partes radiopacas o más blancas, las cuales tienen una mayor densidad o bien las partes radiolucidas o más obscuras, lo cual se interpreta en una menor densidad.

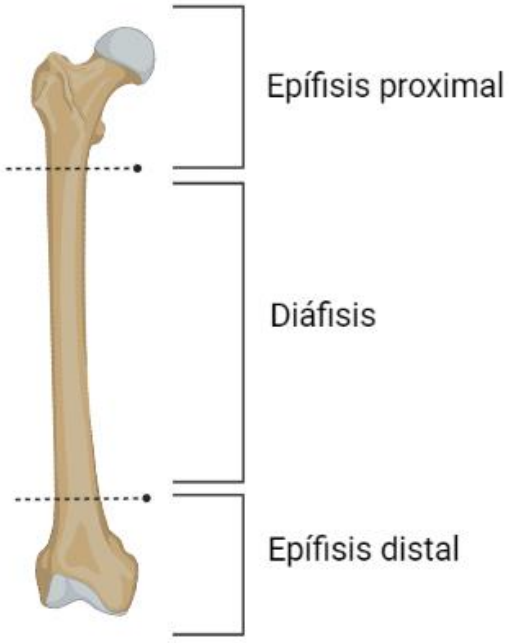


Figura 5. Puntos de mediciones para realizar la densidad óptica en los huesos de patas delanteras y traseras de las crías Wistar

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se utilizó el programa estadístico SPSS© (Stadistical Package for Social Sciences) versión 21.0 para Windows. Se probó la homogeneidad de las varianzas con el estadístico de Levene y la normalidad con el test de Shapiro-Wilk para decidir la prueba estadística que se aplicaría. Se describieron las variables en promedios ± desviación estándar. Las comparaciones entre diferentes dietas y grupos en tratamiento se determinaron mediante ANOVA de una vía, post test Bonferroni o T3 de Dunnett. Se realizó un análisis de correlación de Pearson para las variables de radiopacidad con el peso y longitud de los huesos largos de las crías, las diferencias con valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

VII. RESULTADOS

Las ratas hembra madre de los grupos experimentales sometidas a una restricción proteica durante cinco semanas antes del apareamiento, con 21 días de vida registraron un peso de 46.2 ± 1.02 g (grupo control) y de 44.7 ± 2.9 (GBP), P = 0.405; al finalizar la restricción proteica el peso fue de 159.4 ± 5.3 g en el grupo control y de 169.1 ± 6.4 g en el GBP, P = 0.023. En la Tabla 5 se describen los promedios ± DE de los cambios de peso de las ratas madre de todos los grupos de estudio. Se observó que al día 21 de gestación el GBP-Ile presenta una mayor ganancia de peso en comparación al GBP-AA (60.5 ± 2.1 g vs 37.8 ± 5.8 g, P=0.032). También se registro una mayor ganancia de peso gestacional en las ratas con restricción proteica pregestacional (GBP) en comparación el grupo GBP-AA (123.6 ± 9.1 g vs 78.5 ± 7.8 g, P=0.024).

Tabla 5. Cambios de peso de las ratas hembra Wistar con restricción proteica durante su gestación asociado a la ingesta de una dieta con isoleucina y mix de aminoácidos esenciales

	Control	GBP	GBP-AA	GBP-Ile	P
DP_D7 (g)	11.8 ± 2.2	14.6 ± 5.2	7.6 ± 5.2	16.2 ± 5.7	0.214
DP_D14 (g)	33.4 ± 3.3	40.2 ± 6.3	23.3 ± 3.6	25.5 ± 5.8	0.01
DP_D21 (g)	58.0 ± 13.2	42.1 ± 10.0	37.8 ± 5.8 [b]	60.5 ± 2.1 [a]	0.032
G_peso (g)	108.1 ± 14.3	123.6 ± 9.1[a]	78.5 ± 7.8 [b]	106.3 ± 4.8	0.024

Control= Grupo control, GBP= Grupo bajo en proteína, GBP-AA= Grupo bajo en proteína suplementado con mix de aminoácidos esenciales, GBP-Ile= Grupo bajo en proteína suplementado con Isoleucina, DP_D7= Diferencia de peso gestación día 7, DP_D14= Diferencia de peso gestación día 14, DP_D21= Diferencia de peso gestación día 21, G_Peso= Ganancia de peso en la gestación, P= representa el valor de significancia para la prueba ANOVA. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test T3 de Dunnett. El número de animales por grupo fue de 3.

En la Tabla 6 se registraron los valores de peso, hemoglobina y albúmina de las crías de ratas Wistar suplementadas con aminoácidos esenciales al término de la lactancia, se puede observar que el peso de las ratas crías fue mayor en el grupo control y GBP-Ile en comparación con el GBP-AA y GBP (35.2 ± 1.7 g, 32.2 ± 2.7 g vs 20.1 ± 1.6 g, 29.2 ± 2.6 g, P= 0.001, respectivamente).

Para la hemoglobina se registró que las crías de 21 días de vida del grupo control presentaron el nivel de hemoglobina más alto (11.2 ± 0.9 g/dL) en comparación con el GBP, GBP-AA y GBP-Ile (P=0.001).

La concentración sérica de albúmina en las crías fue en promedio de 3.6 ± 0.2 mg/dL para el grupo control al día 21 de vida y 3.7 ± 0.2 mg/dL para el GBP-Ile, la concentración fue menor para el resto de los grupos de estudio (GBP, GBP-AA) (p=0.001). En los grupos bajos en proteína la concentración de albúmina fue mayor en las crías del GBP-Ile en comparación con el resto.

Tabla 6. Peso, hemoglobina y albúmina de crías de ratas Wistar suplementadas con mix de aminoácidos e isoleucina al término de la lactancia

	Control	GBP	GBP-AA	GBP-Ile
Pcrías (g)	35.2 ± 1.7 **a**	29.2 ± 2.6 **b**	20.1 ± 1.6 **b**	32.2 ± 2.7**a**
Hb (g/dL)	11.2 ± 0.9 **a**	8.3 ± 0.8 **b**	9.8 ± 1.1 **b**	8.6 ± 0.6 **b**
Alb (mg/dL)	3.6 ± 0.2 **a**	2.8 ± 0.1 **bd**	2.6 ± 0.3 **bd**	3.7 ± 0.2 **ac**

Pcrías = peso de las crias, Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-AA= grupo bajo en proteína suplementado con aminoácidos esenciales, Hb= hemoglobina, Alb= albúmina sérica. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett. El número de animales por grupo fue de 6.

En la Tabla 7 se presenta el peso y longitud promedio de los huesos largos de patas delanteras y traseras de crías (tanto machos y hembras) de ratas Wistar suplementadas con aminoácidos esenciales, se observa que el peso y longitud de los huesos fue mayor para el grupo control, en comparación con el GBP, GBP-AA y GBP-Ile (p=0.001). Los huesos radio, tibia y fémur de crías de ratas Wistar hembra del GBP-Ile registraron un mayor peso (7.1 ± 0.6 mg, 27.1 ± 2.3 mg y 21.5 ± 1.4 mg, respectivamente) en relación con el GBP (5.6 ± 1.1 mg, 22.1 ± 1.1 mg y 16.3 ± 1.3 mg, respectivamente) (p=0.001). En cuanto a la longitud de los huesos el húmero y tibia del GBP-Ile (1.1 ± 0.05 cm y 1.6 ± 0.05 cm), fue mayor en comparación con el GBP (1.0 ± 0.01 cm y 1.5 ± 0.03 cm) (p=0.001).

Tabla 7. Peso y longitud de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías de ratas Wistar suplementadas con aminoácidos esenciales

Huesos	Control	GBP	GBP-AA	GBP-Ile	P
Húmero					
Peso (mg)	19.6 ± 2.1 **a**	14.4 ± 1.3 **b**	10.4 ± 1.1 **bd**	16.5 ± 1.7 **bc**	0.001
Longitud (cm)	1.2 ± 0.1 **a**	1.0 ± 0.01 **bd**	0.95 ± 0.1 **bd**	1.1 ± 0.05 **bc**	0.001
OléCub					
Peso (mg)	14.9 ± 0.9 **a**	11.3 ± 1.1 **b**	8.15 ± 1.1 **bd**	12.3 ± 1.05 **bc**	0.001
Longitud (cm)	1.5 ± 0.1 **a**	1.4 ± 0.05 **b**	1.3 ± 0.05 **bd**	1.4 ± 0.06 **bc**	0.001
Radio					
Peso (mg)	8.3 ± 0.8 **a**	5.6 ± 1.1 **bd**	3.1 ± 0.5 **bd**	7.1 ± 0.6 **bc**	0.001
Longitud (cm)	1.2 ± 0.04 **a**	1.1 ± 0.06 **b**	0.9 ± 0.04 **bd**	1.1 ± 0.05 **ac**	0.001
Tibia					
Peso (mg)	36.3 ± 2.6 **a**	22.1 ± 1.1 **bd**	14.4 ± 2.5 **bd**	27.1 ± 2.3 **bc**	0.001
Longitud (cm)	1.7 ± 0.04 **a**	1.5 ± 0.03 **bd**	1.3 ± 0.1 **bd**	1.6 ± 0.05 **bc**	0.001
Fémur					
Peso (mg)	28.4 ± 2.5 **a**	16.3 ± 1.3 **bd**	12.7 ± 2.2 **bd**	21.5 ± 1.4 **bc**	0.001
Longitud (cm)	1.3 ± 0.03 **a**	1.1 ± 0.04 **b**	1.0 ± 0.05 **bd**	1.2 ± 0.01 **ac**	0.001

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-AA= grupo bajo en proteína suplementado con aminoácidos esenciales, GBP-Ile= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, OléCub= olécranon más cúbito. p= representa el valor de significancia para la prueba ANOVA. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnet. El número de animales por grupo fue de 6.

La Tabla 8 presenta el peso y la longitud promedio de los huesos largos de patas delanteras y traseras de crías hembras y machos nacidos de ratas Wistar hembra suplementadas con aminoácidos esenciales. Se registra que el peso y longitud de los huesos fue mayor para los grupos control de hembras y machos, en comparación con los GBP, GBP-AA y GBP-Ile ($p=0.000$). Se observa que entre grupos las hembras del GBP registran un peso mayor en todos los huesos en comparación al GBP-AA y GBP-Ile. Por el contrario, en los machos el GBP-Ile tiene un mayor peso en todos los huesos en comparación a GBP, GBP-AA ($p=0.000$).

El húmero, radio, tibia, fémur del GBP-Ile de los machos (1.1 ± 0.0 cm, 1.2 ± 0.1 cm, 1.6 ± 0.1 cm, 1.2 ± 0.0 cm) presentan una mayor longitud en comparación al GBP (1.0 ± 0.0 cm, 1.1 ± 0.0 cm, 1.5 ± 0.0 cm, 1.1 ± 0.1 cm) ($p=0.000$).

Tabla 8. Peso y longitud de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías de ratas Wistar macho y hembras suplementadas con aminoácidos esenciales

	Hembras				Machos				
Huesos	Control	GBP	GBP-AA	GBP-Ile	Control	GBP	GBP-AA	GBP-Ile	P
Húmero									
Peso (mg)	19.4 ± 0.5 [a]	18.1 ± 3.0 [ac]	11.9 ± 1.8 [bd]	13.1 ± 3.0 [b]	20.1 ± 0.8 [a]	14.3 ± 0.4 [b]	10 ± 0.5 [bd]	17.4 ± 1.5 [ac]	0.000
Longitud (cm)	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1 [a]	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0 [b]	1.1 ± 0.0	0.002
OléCub									0.000
Peso (mg)	14.8 ± 0.2 [a]	13.8 ± 1.2 [ac]	8.0 ± 1.1 [bd]	9.6 ± 1.4 [bd]	15.7 ± 0.8 [a]	11.2 ± 0.5 [bc]	7.5 ± 0.1 [bd]	13.3 ± 0.8 [ac]	0.000
Longitud (cm)	1.5 ± 0.0 [a]	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1 [b]	1.3 ± 0.1 [b]	1.6 ± 0.1 [a]	1.4 ± 0.1 [ac]	1.3 ± 0.0 [bd]	1.4 ± 0.1 [ac]	0.000
Radio									0.000
Peso (mg)	8.5 ± 0.6 [a]	6.4 ± 1.3 [ac]	2.8 ± 0.7 [bd]	4.8 ± 1.8 [b]	8.7 ± 0.8 [a]	5.5 ± 0.5 [b]	3.0 ± 0.5 [bd]	7.2 ± 1.1 [ac]	0.000
Longitud (cm)	1.2 ± 0.0 [a]	1.0 ± 0.1 [b]	1.0 ± 0.1 [b]	1.0 ± 0.6 [b]	1.2 ± 0.0 [a]	1.1 ± 0.0 [ac]	1.0 ± 0.0 [bd]	1.2 ± 0.1 [ac]	0.000
Tibia									0.000
Peso (mg)	37.8 ± 0.8 [a]	28.0 ± 0.4 [bc]	13.5 ± 2.3 [bd]	20.1 ± 5.7 [bd]	37.6 ± 0.3 [a]	23.0 ± 0.9 [bc]	13.6 ± 2.6 [bd]	29.9 ± 2.8 [bc]	0.000
Longitud (cm)	1.8 ± 0.0 [a]	1.5 ± 0.0 [b]	1.4 ± 0.1 [b]	1.5 ± 0.1 [b]	1.7 ± 0.0 [a]	1.5 ± 0.0 [bc]	1.3 ± 0.0 [bd]	1.6 ± 0.1 [ac]	0.000
Fémur									0.000
Peso (mg)	29.5 ± 0.4 [a]	21.7 ± 2.0 [bc]	12.0 ±2.3 [bd]	15.2 ± 5.4 [b]	30.0 ± 1.2 [a]	17.0 ± 0.5 [b]	12.1 ± 2.5 [bc]	22.9 ± 1.3 [d]	0.000
Longitud (cm)	1.3 ± 0.0 [a]	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1 [b]	1.1 ± 0.1 [b]	1.3 ± 0.1 [a]	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0 [bc]	1.2 ± 0.0 [d]	0.000

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-AA= grupo bajo en proteína suplementado con aminoácidos esenciales, GBP-Ile= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, OléCub= olécranon más cúbito. p= representa el valor de significancia para la prueba ANOVA. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett. El número de animales por grupo fue de 6.

En la Tabla 9 se describen los promedios ± DE de la DO en ratas Wistar hembra y macho suplementadas del GBP-AA y GBP-Ile durante la gestación y lactancia. Para el caso de las hembras en el húmero se muestra una mayor DO en el GBP-AA en comparación al grupo control, (157.5 ± 2.6 g/cm^2 vs. 133.6 ± 1.2 g/cm^2, ANOVA $P<0.05$) y una menor DO en el GBP-Ile de hembras en relación con el grupo de hembras control (112.83 ± 2.32 g/cm^2, vs. 133.63 ± 1.22 g/cm^2, respectivamente, ANOVA $P<0.05$) Para los machos se observa un menor DO en el GBP-Ile en comparación al grupo control y una mayor DO en GBP y GBP-AA en comparación a GBP-Ile (ANOVA $P<0.05$).

En el olécranon de las hembras se registra que todos los grupos (GBP, GBP-AA, GBP-Ile) presentan una menor DO en comparación al grupo control (157.2 ± 6.8 g/cm^2, 126.8 ± 7.6 g/cm^2, 99.8 ± 11.5 g/cm^2 vs. 166.8 ± 1.2 g/cm^2, respectivamente, ANOVA $P<0.05$). Asimismo, se presenta un aumento de la DO en el GBP-Ile de machos en comparación al grupo control de machos (152.7 ± 3.3 g/cm^2 vs. 126.2 ± 16.6 g/cm^2, ANOVA $p<0.05$)

Para el radio se observa un aumento de DO en todos los grupos de hembras y machos; GBP, GBP-AA, GBP-Ile en relación con el grupo control de hembras y de machos (ANOVA $p<0.05$).

En la suma total de la DO de todos los huesos (Tabla 9), se observaron diferencias significativas con una mayor DO entre el grupo control de hembras (135.1 ± 1.5 g/cm^2) y el grupo de hembras GBP (150.6 ± 3.8 g/cm^2) (ANOVA $p<0.05$). De igual forma se registró que la DO incrementó de manera significativa en los grupos macho GBP y GBP-AA (148.61 ± 1.36 g/cm^2, 148.71 ± 6.20 g/cm^2) (ANOVA $p<0.05$) en comparación al grupo control.

Tabla 9. Densidad ósea total en ratas Wistar hembras y machos suplementados con mix de aminoácidos o isoleucina durante la gestación y lactancia

Grupo	Húmero total ($g/cm^{2)}$	Olécranon total ($g/cm^{2)}$	Radio total ($g/cm^{2)}$	Fémur total ($g/cm^{2)}$	Tibia total ($g/cm^{2)}$	Huesos total ($g/cm^{2)}$
Hembra Control	133.6 ± 1.2 [a]	166.8 ± 1.2 [a]	60.2 ± 2.4 [a]	163.7 ± 1.4	151.3 ± 11.8	135.1 ± 1.5 [a]
Hembra GBP	144.8 ± 5.2 [ac]	157.2 ± 6.8 [ac]	153.2 ± 9.7 [b]	152.7 ± 9.0	145.2 ± 0.5	150.6 ± 3.8 [bc]
Hembra GBP-AA	157.5 ± 2.6 [bc]	126.8 ± 7.6 [bd]	145.9 ± 11.2 [b]	153.2 ± 6.0	153.5 ± 3.1	147.4 ± 3.8 [ac]
Hembra GBP-Ile	112.8 ± 2.3 [bd]	99.8 ± 11.5 [bcd]	136.3 ± 11.9 [b]	158.3 ± 1.7	152.3 ± 5.5	131.9 ± 2.2 [ad]
Macho Control	140.5 ± 8.7 [a]	126.2 ± 16.6 [a]	114.6 ± 4.3 [a]	149.0 ± 5.6	137.5 ± 3.6	133.6 ± 6.9 [a]
Macho GBP	148.0 ± 7.2 [ac]	140.2 ± 7.9	154.6 ± 6.8 [b]	149.3 ± 2.6	150.8 ± 0.9	148.6 ± 1.3 [b]
Macho GBP-AA	147.4 ± 4.5 [ac]	151.2 ± 3.1	156.5 ± 10.8 [b]	140.7 ± 17.6	147.6 ± 1.0	148.7 ± 6.2 [b]
Macho GBP-Ile	114.6 ± 12.1 [bd]	152.7 ± 3.3 [b]	152.3 ± 1.3 [b]	151.8 ± 9.5	143.0 ± 1.9	142.9 ± 3.7

Los valores representan los promedios de densidad ósea ± desviación estándar en los grupos que consumieron la dieta baja en proteínas (GBP), Grupo bajo en proteínas suplementado con mix de aminoácidos (GBP-AA) Grupo bajo en proteínas suplementado con isoleucina (GBP-Ile) y grupo control. Letras distintas en columnas indican diferencias significativas entre los grupos según la prueba de ANOVA, $p<0.05$, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett. El número de animales por grupo fue de 6.

En la Tabla 10 se muestran las correlaciones entre la radiopacidad con el peso y la longitud de huesos largos de las ratas Wistar crías del grupo control, GBP, GBP-AA y GBP-Ile durante la gestación y la lactancia. Se presentó una correlación positiva entre el peso del grupo control y la radiopacidad del olécranon; lo mismo se observó en el GBP-Ile en quien también se encontró una correlación positiva del peso con la radiopacidad del olécranon: para el resto de los grupos no se observaron correlaciones positivas con el peso de los huesos largos.

Respecto a la longitud de los huesos largos de las crías de ratas Wistar se muestra una correlación positiva entre la radiopacidad del olécranon y el grupo control; para la radiopacidad del grupo GBP, GBP-AA y GBP-Ile no se observa ninguna correlación significativa.

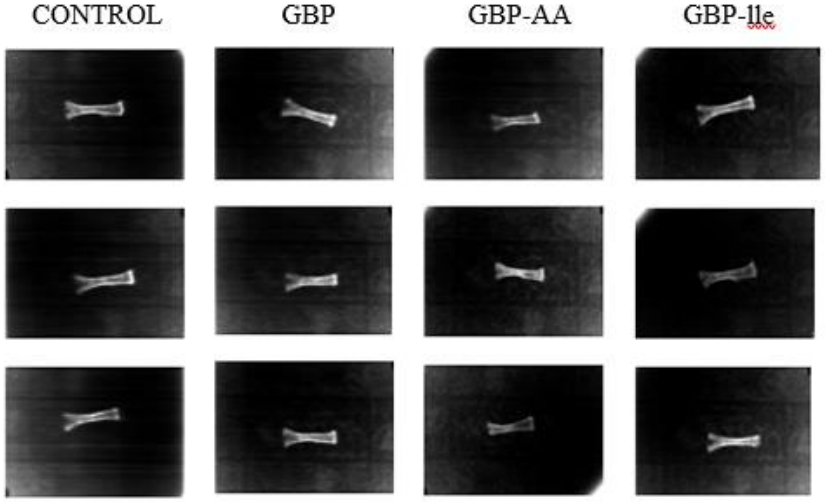
Tabla 10. Correlación de peso y longitud de huesos largos en ratas Wistar suplementados con mix de aminoácidos o isoleucina durante gestación y lactancia

	Peso				**Longitud**			
Radiopacidad	Grupo Control	GBP	GBP-AA	GBP-Ile	Grupo Control	GBP	GBP-AA	GBP-Ile
Húmero	0.567	0.021	0.329	0.203	0.478	0.047	0.619	-0.018
Olécranon	-0.894*	0.565	-0.090	-0.854*	-0.0927**	-0.449	-0.357	0.753
Radio	0.141	0.050	0.177	0.207	0.434	-0.176	-0.393	0.411
Fémur	0.098	-0.054	-0.400	-0.312	-0.058	-0.254	0.317	-0.252
Tibia	-0.029	-0.771	-0.200	-0.714	0.802	0.000	0.372	-0.493

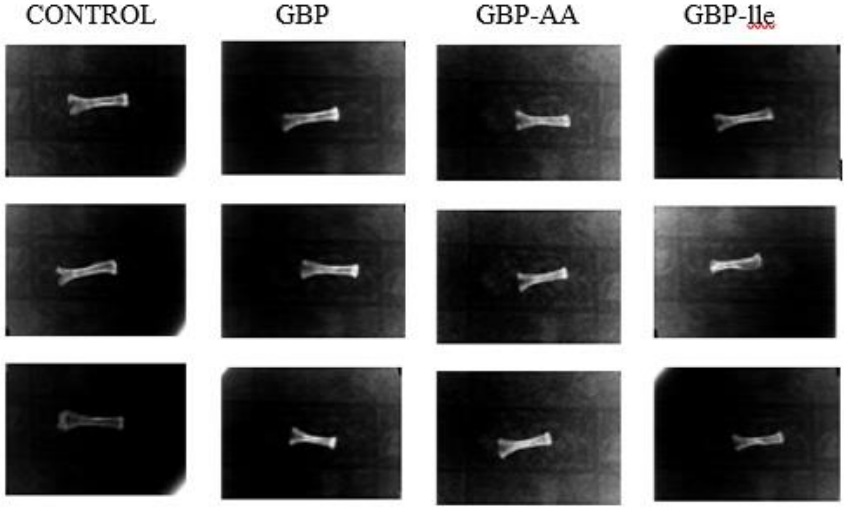
Grupo bajo en proteínas (GBP), Grupo bajo en proteínas suplementado con mix de aminoácidos (GBP-AA) Grupo bajo en proteínas suplementado con isoleucina (GBP-Ile), * $p<0.05$, **$p<0.01$ para la correlación de Pearson. El número de animales por grupo fue de 6.

En la Figura 6 se presenta un catálogo de las imágenes computarizadas de huesos largos de las patas traseras y delanteras de ratas Wistar macho y hembras suplementadas con mix AA o isoleucina, 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 ya que su densidad es mayor y las partes más oscuras conocidas como radiolúcidas son aquellas que presentan una densidad menor, esto se puede apreciar en las imágenes.

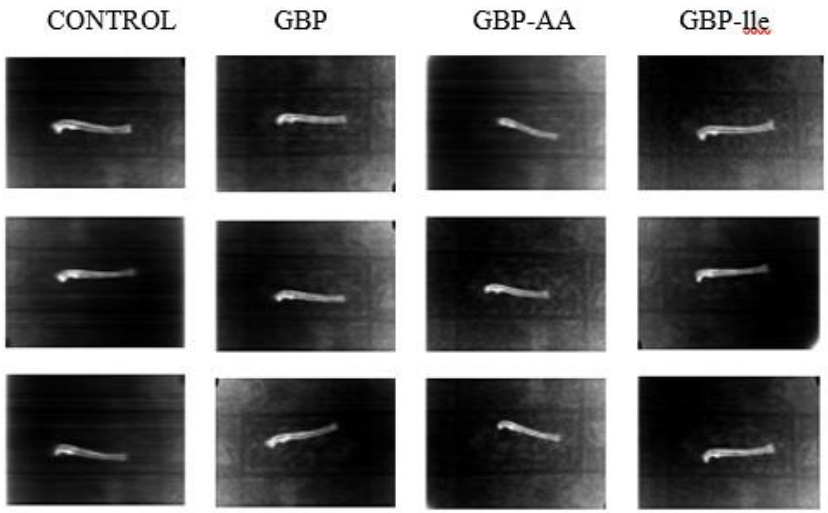
Húmero Machos



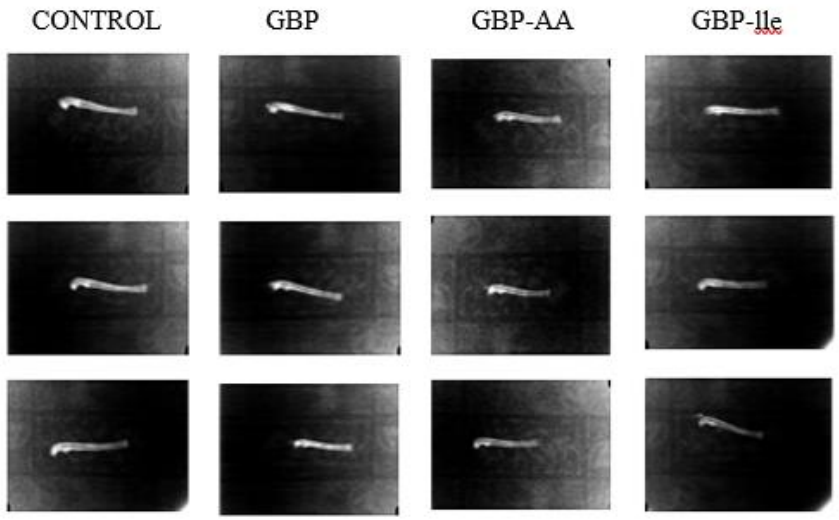
Húmero Hembras



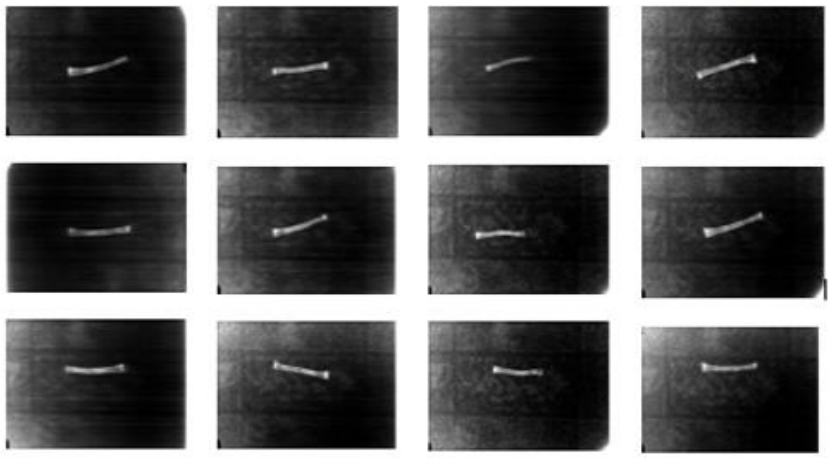
Olécranon Machos



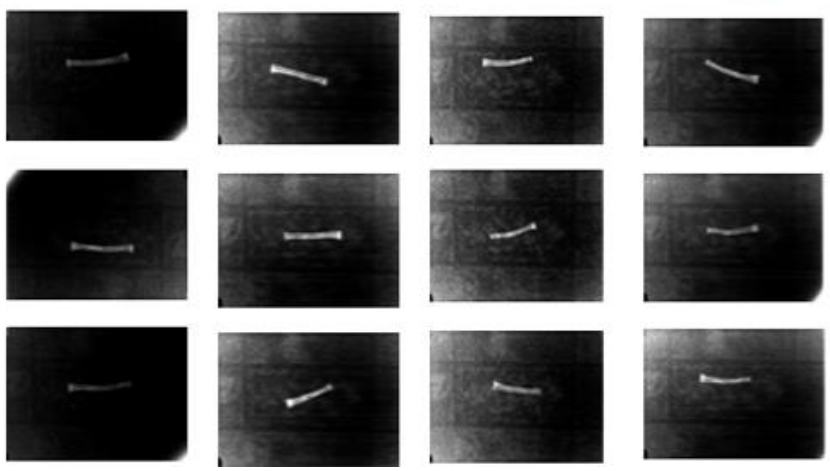
Olécranon Hembras



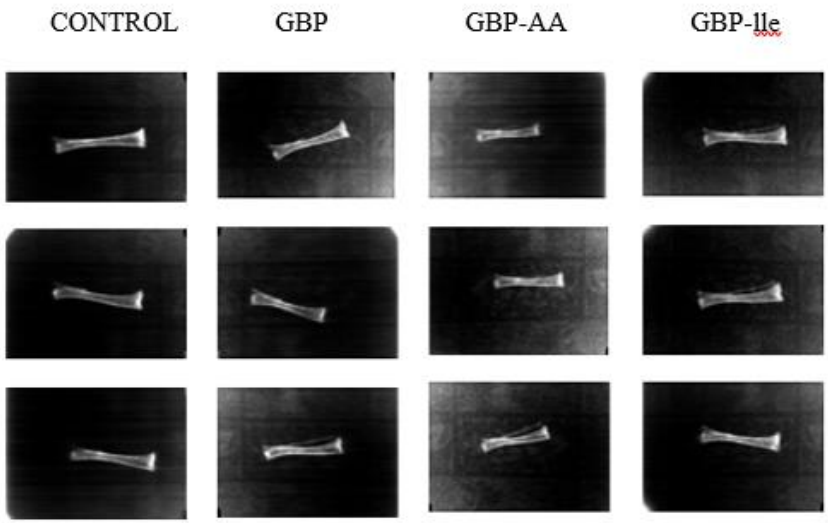
Radio Machos



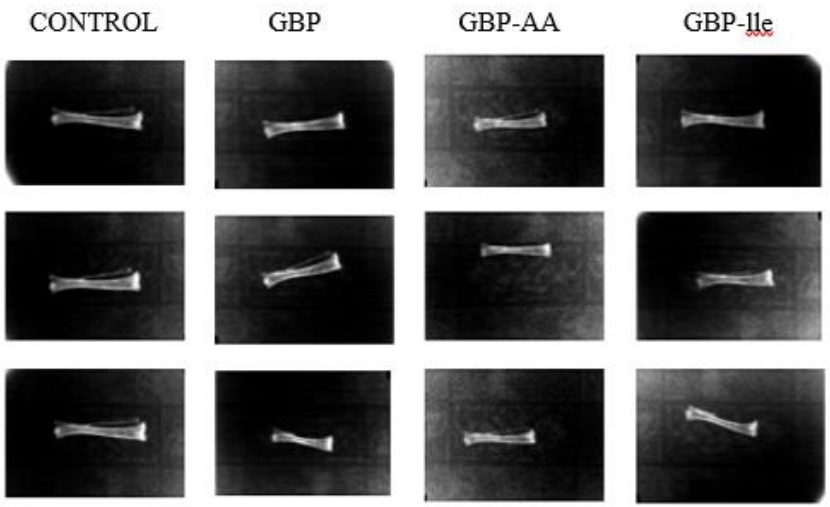
Radio Hembras



Tibia Machos



Tibia Hembras



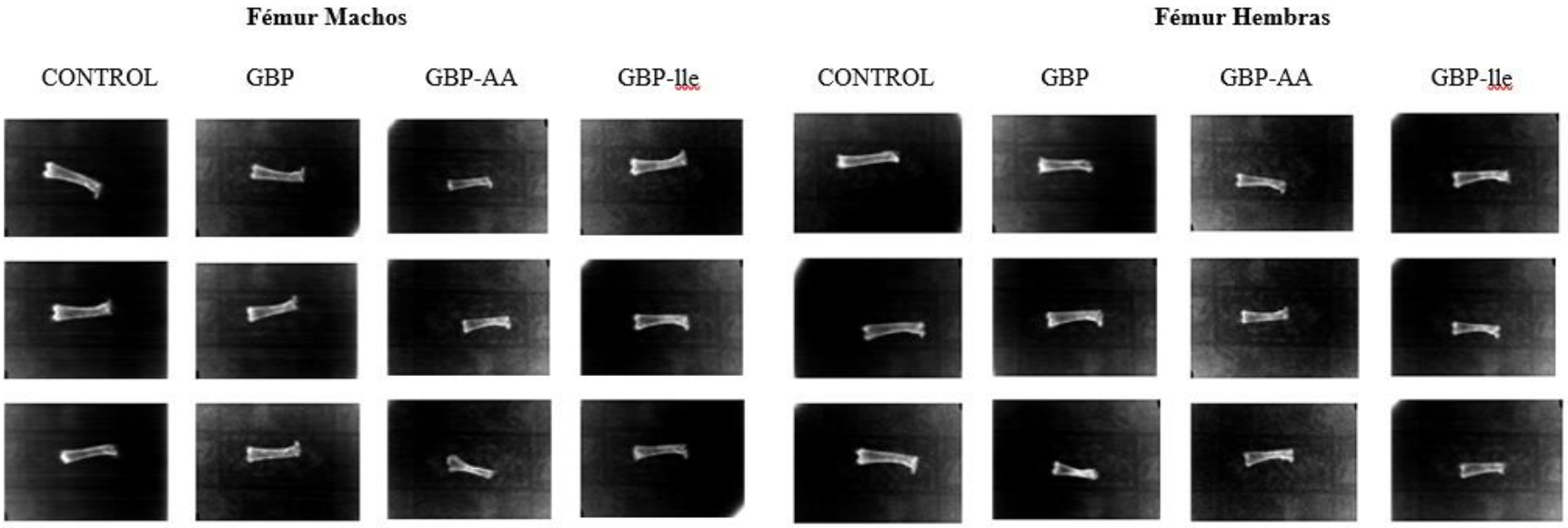


Figura 6. Radiografías de huesos largos de 3 ratas ratas Wistar macho y hembra (fémur, tibia, húmero, olécranon, radio) por grupos de estudio. Grupo control, grupo bajo en proteínas (GBP), grupo bajo en proteínas con mix de aminoácidos (GBP-AA) y grupo bajo en proteínas suplementado con Isoleucina (GPB-Ile).

VIII DISCUSIÓN

8.1 La restricción proteica no afecta el peso de las ratas madre Wistar pero si el peso y las concentraciones de hemoglobina y albúmina de sus crías al final de la lactancia.

En este trabajo se registró que las ratas madre Wistar hembra que fueron expuestas a una restricción proteica al 9% durante 5 semanas tuvieron una mayor ganancia de peso en comparación al grupo control, lo cual se ve asociado a una mayor ingesta de hidratos de carbono y un menor consumo de proteínas. En otros estudios en ratas adultas las cuales fueron inducidas a un estado de restricción proteica al 5% y 6% de la ingesta calórica total no tuvieron cambios de peso, los autores de los artículos explican que esto puede deberse a que la restricción de proteínas indujo a una preferencia condicionada por las proteínas, en relación con hidratos de carbono y esto se asocia con una mayor palatabilidad (117, 118). Contrariamente, en un estudio en ratones se observó que el grupo bajo en proteínas tuvo un peso significativamente menor en comparación a los grupos control y grupo de ratones suplementados con aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) (119).

En esta investigación se registró que ratas suplementadas con isoleucina en el día 21 de gestación tuvieron un mayor peso (60.5 ± 2.1); lo cual es semejante con un estudio en ratas dónde se registró que aquellas que fueron alimentadas con arroz y suplementadas con L-Lisina también aumentaron su peso (de 1.94 mg/g a 2.88 mg/g) en comparación a las ratas que solo fueron alimentadas con arroz, esto puede deberse a que la suplementación dietética con Lisina puede aumentar la retención de nitrógeno muscular, la acumulación de proteínas y finalmente mejorar el rendimiento del crecimiento en los animales (120). En un estudio hecho en pollos machos se registró un aumento del peso corporal en los animales que recibieron una dieta suplementada con Lisina durante 42 días en comparación a aquellos que recibieron una dieta a base de maíz convencional (121). Asimismo, otros estudios confirman que existe un aumento de peso corporal con la suplementación de Lisina en la dieta (122-124). Un estudio con felinos demostró que aquellos que consumieron una dieta control tuvieron una pérdida significativa de peso (n=14; media, -13.0%, $P<0.0001$) en un periodo de 6 meses en comparación a los gatos que consumieron una dieta de prueba

suplementada con aminoácidos esenciales, los cuales ganaron más peso, esto debido a que los gatos del grupo control no consumieron suficiente alimento para mantener el peso corporal. Es posible que los alimentos de prueba tengan una mejor palatabilidad en comparación con la dieta control (125); de acuerdo con un estudio se demostró que los alimentos de prueba mejoran el apetito en gatos, esto debido a que la regulación del apetito es uno de los determinantes de la palatabilidad en gatos, además de que implica una interacción compleja entre el hipotálamo, el tejido adiposo y el tracto digestivo (126).

Un bajo contenido en proteínas en la dieta influye significativamente en la composición corporal de las ratas (127). Como se indica en la Tabla 6, el peso de las ratas crías fue mayor en el grupo control y el GBP-Ile en comparación con el GBP y el GBP-AA (35.2 ± 1.7 g, 32.2 ± 2.7 g vs. 20.1 ± 1.6 g, 29.2 ± 2.6 g, P= 0.001, respectivamente). En un estudio se observó que las crías de las cabras madre alimentadas con una dieta baja en proteínas (40%) tuvieron un menor peso al nacer (128); sin embargo, en dicho estudio no es posible comprender sí esto se atribuye a la restricción de calorías, la restricción de proteínas o a sus efectos interactivos (129).

La concentración de albúmina fue mayor en las crías del GBP-Ile en comparación al resto de grupos bajos en proteína, la albúmina en suero refleja la síntesis de proteínas y el estado nutricional. Se ha descrito que la restricción de proteína en la dieta afecta la producción de albúmina por la ausencia de aminoácidos esenciales; sin embargo, cuando a las dietas se le adiciona una mezcla de aminoácidos que incluyen triptófano e isoleucina se aumenta la síntesis de albúmina, ya que estos aminoácidos estimulan la reagregación ribosómica y dan como resultado una mayor producción de albúmina (130). Por lo que la suplementación de isoleucina en el GBP-Ile se favoreció por el efecto positivo descrito para este aminoácido esencial.

En un estudio hecho en cerdos suplementados con aminoácidos esenciales no se observaron cambios en los niveles de albúmina, lo cual puede deberse al desequilibrio de los aminoácidos esenciales en las dietas bajas en proteínas; sin embargo, los efectos de esta suplementación aún no están claros (131). Asimismo en el estudio hecho en gatos

suplementados con aminoácidos esenciales los valores de hemoglobina y albúmina estuvieron dentro de los intervalos de referencia en ambos grupos de tratamiento (125). Para la hemoglobina se registró que las crías de 21 días de vida del grupo control presentaron el nivel de hemoglobina más alto en comparación con el GBP, GBP-AA y GBP-Ile ($p=0.001$). Una ingesta limitada de proteínas tiene como efecto una baja producción de globina y por ende de hemoglobina aunque exista un consumo adecuado de hierro (132), lo cual indica que la suplementación con aminoácidos esenciales tiene un efecto menor o nulo en la síntesis de hemoglobina.

8.2 La suplementación con isoleucina modifica el peso y longitud de huesos largos de las crías de ratas Wistar hembra con restricción proteica

La nutrición materna durante la gestación juega un papel muy importante en el desarrollo y crecimiento fetal; la ingesta deficiente de proteínas en la dieta está relacionada con la restricción del crecimiento intrauterino (133, 134). En nuestro trabajo se registró que el peso y la longitud promedio de los huesos largos de las patas delanteras y traseras de las crías de ratas Wistar hembra fue mayor para el grupo control, en comparación al GBP, GBP-AA, GBP-Ile ($p=0.001$), Tabla 7. Se ha demostrado en animales que la desnutrición materna, específicamente la deficiencia de proteínas y aminoácidos esenciales durante la gestación temprana es más dañina que durante la gestación tardía (133). Pues los aminoácidos son esenciales para la síntesis de proteínas, sustancias nitrogenadas y hormonas tiroideas (135). Y cuando existe una dieta baja en proteínas se requiere de una mayor suplementación de aminoácidos para mantener un crecimiento similar (136). Por otro lado la ingesta baja de proteínas en la dieta materna disminuye la actividad de la 11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de la placenta (11 β-HSD), lo cual aumenta la exposición fetal al cortisol materno y esta exposición afecta el crecimiento del feto (137).

Asimismo, se encontró que la longitud de los huesos (húmero, tibia) fue mayor para el grupo GBP-Ile en comparación al GBP ($p=0.001$). En un estudio hecho en ratones que fueron suplementados con BCAA se observó que la longitud femoral aumentó en comparación al grupo bajo en proteínas (119). En un estudio hecho en cerdos se registró

que, al suplementar con valina, o valina más isoleucina en una dieta baja en proteínas al 5%, el crecimiento mejoró en comparación a la dieta control (138). Por otro lado, en un estudio hecho en cerdos se observó que al reducir los niveles de proteínas en la dieta en un 5% del total requerido se puede disminuir el rendimiento del crecimiento (139), esto puede ser debido a la deficiencia de aminoácidos esenciales en las dietas bajas en proteína, se insiste en buscar en qué casos pueden usarse; y en la producción porcina es muy común la suplementación con los cuatro aminoácidos limitantes (lisina, metionina, triptófano y treonina) (131). La valina, isoleucina y leucina son aminoácidos de cadena ramificada que juegan un papel importante en la deposición de proteínas y funciones biológicas normales en el cuerpo (140). También se sabe que una dieta rica en proteínas mejora la absorción intestinal de calcio y aumenta los niveles circulantes del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y la hormona del crecimiento (GH). El IGF-1 regula el crecimiento esquelético en niños y adolescentes, asimismo los niveles más altos de IGF-1 estimulan los osteoblastos, lo que conduce a un aumento en la formación de hueso (141). Por lo tanto, un aumento de proteínas en la dieta en la vida temprana es importante para una buena absorción de calcio y los niveles circulantes de IGF-1, teniendo como resultado un impacto positivo en la salud esquelética; estos mecanismos pueden explicar la falta de crecimiento tanto en peso y longitud de los huesos largos de las crías de ratas Wistar hembra en los grupos bajos en proteína.

Los aminoácidos son uno de los principales componentes básicos de la vida, las células y los organismos de los mamíferos los utilizan de diversas formas; forman los componentes básicos de la síntesis de proteínas (142). Los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), isoleucina, leucina y valina, son aminoácidos esenciales que representan un 35% de los aminoácidos esenciales y comprenden proteínas musculares en humanos aproximadamente un 40% de los aminoácidos preformados requeridos por todos los mamíferos (143, 144). A diferencia de la mayoría de los aminoácidos, el paso inicial del catabolismo de los BCAA no tiene lugar en el hígado debido a la baja actividad hepática de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT), que es la primera enzima en la vía de catabolismo de los BCAA, por ello los BCAA aumentan rápidamente en la circulación sistémica después de la ingesta de proteínas y están fácilmente disponibles para los tejidos

extrahepáticos. El sitio inicial de la mayor parte del catabolismo de los BCAA es el músculo esquelético, esto es debido a la alta actividad de los BCAT (143).

Los BCAA funcionan como sustratos para la síntesis de proteínas o bien para la producción de energía, de igual manera realizan varias funciones metabólicas y de señalización, por medio de la activación de la vía de señalización de la diana de la rapamicina en los mamíferos (mTOR) (144), precisamente el complejo de rapamicina I (mTORC1) es el sensor de aminoácidos más conocidos, es un regulador central del crecimiento celular y orgánico, promueve el crecimiento en respuesta de la disponibilidad de nutrientes, como los aminoácidos (145). En un estudio hecho en ratas se concluyó que se necesitan aminoácidos para estimular la síntesis de proteínas en los músculos esqueléticos de las ratas (146), ahora se sabe que este proceso está regulado por mTORC1. Algunos estudios en células de mamíferos cultivadas confirmaron que la mezcla de los 20 aminoácidos activaba a mTORC1 y que la combinación de señalización de aminoácidos y factores de crecimiento es necesaria para la fosforilación de sustratos canónicos de mTORC1 (147, 148). No se sabe sí se detectan todos los aminoácidos, un aminoácido en particular o un subproducto de un aminoácido, sin embargo se sabe que la leucina y la arginina son críticas para la activación de mTORC1 (147).

Estudios han demostrado que la deficiencia de BCAA altera la traducción del ARNm y las deficiencias dietéticas de estos dan como resultado un crecimiento deficiente y pérdida de proteínas (149-151). Los mecanismos antes descritos pueden explicar por qué la suplementación con aminoácidos esenciales tiene un efecto positivo en la longitud y peso de los huesos largos de las crías Wistar evaluadas en este estudio.

8.3 La DO se asocia con el consumo de una dieta suplementada con mix de aminoácidos

La proteína dietética es necesaria para la salud del esqueleto, ya que es esencial para la síntesis de colágeno y la producción de proteínas de matriz no colágena en el hueso (27). En la Tabla 9 se registró que las crías del grupo control de hembras y el GBP presentaron una mayor DO, mientras que en los machos el GBP y el GBP-AA presentaron una mayor

DO en comparación al grupo control, estos resultados fueron inesperados. En un estudio hecho en ratones con una ingesta restringida de proteínas, los ratones alimentados con una dieta a base de caseína mostraron una mayor DO femoral, pero la DO espinal no se vio influenciada por la fuente de proteína en la dieta (29). Otro estudio hecho en hombres y en mujeres muestra que una mayor ingesta de proteínas se asocia con tasas más lentas de pérdida ósea en el cuello y la columna femoral (152). Estudios informan una relación positiva entre la ingesta de proteína en la dieta y la salud ósea, con una mayor DO y menos riesgo de fracturas de antebrazo (153, 154).

Se ha registrado una disminución de la masa del músculo esquelético en ratas gestantes alimentadas con una dieta baja en proteínas (4%) (155). Un mecanismo directo por el cual las proteínas de la dieta pueden afectar la homeostasis esquelética es por medio de las acciones de los polipéptidos y aminoácidos derivados de proteínas en las células óseas; sin embargo, existe muy poca información sobre los efectos de los polipéptidos derivados de la dieta en las células óseas (141). En un estudio se demostró que los osteoblastos derivados de hueso osteopénico humano dosificados con arginina y leucina tienen un efecto positivo sobre la proliferación, activación y diferenciación de osteoblastos, siendo útil en el tratamiento clínico y la prevención de osteoporosis (156).

En un estudio hecho en ratones suplementados con BCAA se registró que la DO femoral aumentó al inicio del estudio y a los 6 meses (119). Por ello una intervención nutricional resulta ser un enfoque potencial para mejorar las disfunciones asociadas a la edad, como la pérdida de masa muscular y ósea durante el envejecimiento (157); además de la proporción de proteínas en la dieta también se ha demostrado que los BCAA desempeñan un papel importante en la prolongación de la vida útil en ratones cuando son suplementados con estos aminoácidos (158). Es importante mencionar que la proteína dietética y los BCAA son componentes importantes en la dieta y necesarios para el mantenimiento de la función normal de los órganos, tejidos y el papel que juegan en el envejecimiento, la pérdida de masa y función del músculo esquelético (119).

Se ha demostrado *in vitro* que la arginina, lisina, alanina, prolina, leucina y glutamina estimulan la secreción de la insulina, lo que a su vez promueve el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos (159, 160), esto debido a que los aminoácidos estimulan la liberación de insulina a través de su capacidad de actuar como nutrientes en las células de los islotes o en el caso de los aminoácidos catiónicos por mencionar a la arginina; esto como resultado de su acumulación dentro de las células productoras de insulina del sistema endocrino (páncreas); la célula beta pancreática expresa varios sistemas distintos de transporte de aminoácidos (161, 162). Sin embargo, en este estudio no observamos crecimiento óseo en las crías de madres con restricción proteica y restricción proteica suplementadas con aminoácidos esenciales en gestación y lactancia, solo se identificó mayor DO en algunos grupos con restricción proteica.

Es importante resaltar que los cambios en DO se dan principalmente en los huesos largos de la pata delantera de las crías Wistar, debido a que tiene más funciones que la trasera en una rata, como el limpiar su hocico y cuerpo con sus patas delanteras o mejor conocido como acicalamiento, le ayudan a hacer huecos en el piso y manipular sus alimentos (163).

La evaluación de la DO en todos los huesos (Tabla 9) nos muestra que, las crías hembra y macho del grupo control y del GBP-Ile tienen la misma DO que coincide con un crecimiento longitudinal semejante en los huesos largos. Se sabe que el tejido esquelético de los ratones recién nacidos no está completamente mineralizado hasta 3 a 4 semanas después del nacimiento. Además de la osteocalcina y la osteopontina se han identificado otras proteínas de la matriz ósea no colágena como fibronectina, osteonectina, sialoproteina II ósea, decorina, bioglicano, proteasas, proteínas morfogenéticas óseas y factores de crecimiento (164). Las fracturas óseas son el resultado de un desgaste óseo metabólico que se relaciona con la edad, se caracteriza por extremos óseos muy porosos, de baja densidad, con una resistencia ósea reducida, donde predomina la estructura trabecular; este desgaste se debe a tasas de resorción ósea osteoclástica que supera la formación de hueso osteoblástico, lo que da como resultado una estructura porosa (165, 166). El hueso cortical también juega un papel importante en la propensión a fracturas, la estructura ósea cortical incluye la distribución de la matriz tisular, el ancho del hueso y el grosor de la corteza,

estos dos últimos son importantes para la resistencia en una falla local, pues las estructuras se pandean cuando tienen una relación de aspecto delgado, es decir ancho pequeño a largo (167). Normalmente el hueso se adapta para satisfacer las necesidades biomecánicas y algunas capacidades como el engrosamiento cortical (168). Existen algunas enfermedades que afectan al hueso como la osteogénesis imperfecta, pérdida de genes asociados a la matriz, enanismo, gigantismo, pérdida ósea inflamatoria en la enfermedad periodontal, artritis, osteoporosis, enfermedad de Paget, osteomalacia, osteopetrosis, etcétera (169).

La mayor densidad mineral ósea se encuentra en el hueso cortical (170). En un estudio hecho en perros sanos se observó que la acumulación de densidad mineral con el tiempo en un pequeño volumen de hueso recién formado es similar en huesos corticales y trabeculares (171), esto debido a que las tasas de recambio son normalmente más bajas en el hueso cortical femoral, una tasa de renovación más baja proporciona más tiempo para que se produzca la mineralización secundaria, lo que aumenta la DO promedio; sin embargo, las tasas de rotación más bajas también conducen a picos más amplios de distribuciones de la densidad ósea (172, 173)

El tejido óseo cerca de las superficies óseas está menos mineralizado que el hueso intersticial en promedio, por lo que la reabsorción dirigida al hueso menos mineralizado representa la reabsorción de las capas óseas que permanecen cerca de la superficie ósea. Por el contrario, la reabsorción dirigida a huesos más mineralizados representa la reabsorción de capas más profundas de hueso, como el hueso intersticial que está más lejos de las superficies óseas. La regulación mecánica de la remodelación ósea puede reclutar osteoclastos a diferentes velocidades dependiendo de las propiedades mecánicas del sitio óseo, como la rigidez local de la matriz ósea, que depende del contenido mineral (174, 175).

Las proteasas de las familias metaloproteinasas de la matriz extracelular (MME) junto con cisteína proteinasas convergen en la modulación de la remodelación ósea, ya que las acciones bioquímicas de las MME están ligadas a funciones específicas en la remodelación ósea fisiológica (176). La resorción ósea mediada por los osteoclastos en los huesos largos

requiere una actividad enzimática normal de las MME y de las cisteína proteinasas como lo es la catepsina K, su deficiencia afecta la remodelación ósea (177), esto se evidencia en pacientes y en ratones con picnodisostosis, que es una enfermedad ósea similar a la osteoporosis, está relacionada con mutaciones de pérdida de función en el gen de la catepsina K, al haber una deficiencia de catepsina K, que no puede digerir de manera eficaz la matriz ósea orgánica, esto resulta en grandes áreas de matriz ósea libres de minerales (178). La cisteína proteinasas sintetizadas y utilizadas por diferentes osteoclastos para la digestión de la matriz ósea pueden degradar los huesos intermembranosos, así como las MME derivadas de osteoclastos (179).

Los ratones deficientes de MME-13, 8, 9, 14 y 16 muestran alteraciones en los procesos de modelado y remodelación del tejido óseo, tienen una placa de crecimiento anormal, así como una densidad mineral ósea trabecular metafisaria aumentada, exhiben placas de crecimiento expandidas, zonas de condrocitos hipertróficas desorganizadas, mayor número de células hipertróficas diferenciadas en los extremos y formación retardada de la cavidad de la médula ósea, desarrollan un fenotipo óseo que afecta la osificación (intermembranosa y endocondral) y se caracteriza por algunas irregularidades como son la placa de crecimiento alterada y acortamiento del hueso cortical (180-183). En un estudio con ratas en periodo de gestación se pudo observar que MME-13 aumentó, lo que sugiere que las ratas utilizan este mecanismo de remodelación mineral para proporcionar minerales sin resorción de osteoclastos en el hueso, es decir pérdida neta del hueso cortical (184). Suponemos que el déficit de aminoácidos esenciales podría afectar las funciones de las MME en la remodelación ósea, lo cual explica las diferencias de DO entre los grupos de estudio.

IX. CONCLUSIONES

1. La suplementación con isoleucina tiene un efecto en la ganancia de peso durante la gestación, así como en el peso de las crías de ratas Wistar nacidas de ratas Wistas hembra que sufrieron restricción proteica durante la gestación y la lactancia en comparación con ratas suplementadas con otros aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina).

2. La suplementación con aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina) en ratas con restricción proteica no tiene efecto en la concentración de hemoglobina en ratas Wistar gestantes y en sus crías. En contraste, la suplementación con isoleucina restablece las concentraciones de albúmina en las crías de ratas Wistar con restricción proteica.

3. La suplementación con isoleucina favoreció el peso y la longitud de los huesos largos de las crías Wistar de ratas madre con restricción proteica durante la gestación y lactancia; sin embargo, el peso y la longitud de huesos fue significativamente mayor para el grupo control.

4. La suplementación con isoleucina y con aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, lisina, triptófano, treonina, histidina) tiene un efecto en la DO de los huesos largos de las ratas crías nacidas de ratas Wistar con restricción proteica en las etapas de gestación y lactancia.

5. Se registró que la suplementación con isoleucina tiene una correlación positiva entre la radiopacidad (DO) y el peso de los huesos largos en las crías nacidas de ratas Wistar madre con restricción proteica.

X RECOMENDACIONES

1. En futuros estudios se sugiere incluir la medición del contenido mineral óseo por microscopia electrónica de barrido.

2. Es importante realizar nuevas investigaciones, y se recomienda ver el efecto que tiene la suplementación con aminoácidos esenciales y las hormonas del crecimiento, ya que es evidente que la suplementación con isoleucina favorece el crecimiento óseo y la DO en las crías de ratas Wistar.

4. Estudios con mayor duración para conocer el efecto que tiene la suplementación con isoleucina a largo plazo en la densidad ósea en ratas crías Wistar con restricción proteica materna durante la gestación, lactancia y después del destete.

5. Se recomienda llevar a cabo la evaluación de densidad ósea en los dientes de las crías de las ratas Wistar para evaluar si la suplementación con isoleucina favorece este parámetro.

XI. REFERENCIAS

1. 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.
2. Wallace TC. Optimizing Dietary Protein for Lifelong Bone Health. Nutrition Science. 2019;54(3):107-15.
3. Zimmerman E, Busse B, Ritchie R. The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. Bonekey Rep. 2015;4:743.
4. Demontiero O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2012;4:61-76.
5. Papadimitropoulos E, Wells G, Shea B, Gillespie W, Weaver B, Zytaruk N, et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VIII: Meta-analysis of the efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women. Endocr Rev. 2002;23(4):560-9.
6. Heaney RP. Protein and calcium: antagonists or synergists? Am J Clin Nutr. 2002;75(4):609-10.
7. Rizzoli R, Ammann P, Chevalley T, Bonjour JP. Effects of dietary protein insufficiency on the skeleton. Nutritional aspects of bone health. 2003:193–212.
8. de Quadros V, Tobar N, Lais R. Viana, dos Santos R, Kiyataka P, Gomes-Marcondes M. The 17β-oestradiol treatment minimizes the adverse effects of protein restriction on bone parameters in ovariectomized Wistar rats. Bone Joint Res. 2019;8(12):573-81.
9. López M, Izaguirre, I., Macias, C. Conceptos básicos del crecimiento y maduración In: López M, editor. Crecimiento y Maduración Fisica Bases para el diagnóstico y seguimiento clínico. Venezuela.: Medica Panamericana.; 2013. p. 3-6.
10. Calzada R. Capítulo 5: Factores que condicionan el crecimiento. In: Interamericana M-H, editor. Crecimiento del niño Fundamentos Fisiopatológicos. México1998. p. 50-6.
11. Victora CG, de Onis M, Hallal PC, Blössner M, Shrimpton R. Worldwide timing of growth faltering: revisiting implications for interventions. Pediatrics. 2010;125(3):473-80.

12. Grantham-McGregor S, Cheung YB, Cueto S, Glewwe P, Richter L, Strupp B. International Child Development Steering Group. 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.

14. Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Rizzoli R. Protein intake and bone growth. Can J Appl Physiol. 2001;26:153-66.

15. Morisaki N, Urayama K, Yoshii K, Subramanian S, Yokoya S. Ecological analysis of secular trends in low birth weight births and adult height in Japan. J Epidemiol Community Health. 2017;71(10):1014-8.

16. Susanne R. de Rooij, Matthan W. A. Caan, Dick F. Swaab, Aart J. Nederveen, Charles B. Majoie, Matthias Schwab, et al. Prenatal famine exposure has sex-specific effects on brain size. Brain. 2016;139(8):2136-42.

17. Calzada R. Capítulo 8: Crecimiento prenatal. In: Inteamericana M-H, editor. Crecimiento del niño Fundamentos fisiopatológicos. México1998. p. 93-102.

18. Calzada R. Capítulo 4. Bases neuroendocrinas del crecimiento. In: Interamericana M-H, editor. Crecimiento del niño Fundamentos Fisiopatológicos. México.1998. p. 25-49.

19. 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.

20. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. Horm Res. 2005;64(4):157-65.

21. Cooper C, Reginster J-Y, Cortet B, Diaz-Curiel M, Lorenc RS, Kanis JA, et al. Long-term treatment of osteoporosis in postmenopausal women: a review from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF). Current Medical Research and Opinion. 2012;28(3):475-91.

22. Athanasios K, Evangelos D, Paraskevi F, Spyridon S, Theodore T. Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing. J Osteoporos. 2017:1-10.

23. García-Martínez O, Rivas A, Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, Ruiz C. The effect of olive oil on osteoporosis prevention. Int J Food Sci Nutr 2014;65(7):834-40.

24. Takahiro N, Yoshihiko K. Fetal malnutrition-induced catch up failure is caused by elevated levels of miR-322 in rats. Scientific Reports. 2020;10(1339):1-14.

25. Young VR, Pellett PL. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. Am J Clin Nutr. 1994;59(5):1203S-12S.

26. Ghosh S, Suri D, Uauy R. Assessment of protein adequacy in developing countries: quality matters. Br J Nutr 2012;108(2):S77-87.

27. Barbul A. Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. J Nutr. 2008;138(10):2021S-4S.

28. Bihuniak JD, Insogna KL. The effects of dietary protein and amino acids on skeletal metabolism. Mol Cell Endocrinol. 2015;15(410):78-86.

29. 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.

30. Jane EK, Anne MK, Karl LI. Dietary protein and skeletal health: a review of recent human research. Curr Opin Lipidol. 2015;22(1):16-20.

31. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. Endocr Rev. 2008;29(5):535-59.

32. Blumer MJ, Longato S, Fritsch H. Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone. Ann Anat 2008;190(4):305-15.

33. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. J Bone Joint Surg Am 2003;85(4):715-26.

34. Reddi AH. Cartilage morphogenesis: role of bone and cartilage morphogenetic proteins, homeobox genes and extracellular matrix. Matrix Biol. 1995;14(8):599-606.

35. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. Nature Biotechnology. 1998;16:247–52.

36. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. N Engl J Med. 1996;335(18):1363-7.

37. Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. Endocr Rev. 1987;8(4):426-38.
38. Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;85(13):4889-93.
39. Van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. Endocr Rev. 2003;24(6):782-801.
40. Roach HI, Baker JE, Clarke NM. Initiation of the bony epiphysis in long bones: chronology of interactions between the vascular system and the chondrocytes. J Bone Miner Res. 1998;13(6):950-61.
41. 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.
42. Cummings SR, Bates D, Black DM. Clinical use of bone densitometry: scientific review. JAMA2. 2002;288(15):1889-97.
43. Mitlak BH, Schoenfeld D, Neer RM. Accuracy, precision and utility of spine and wholesqueleton mineral measurement by DXA in rats. J Bone Miner Res. 1994;9:119-26.
44. Christiansen C, Christensen MS, Larsen ME, Transbol I. Pathophysiological mechanismes of estrogen effect on bone metabolism. Dose-response relationships in early postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 1982;55:1124-30.
45. Pérez-Rey J, Roncero-Martín R, Rico-Martín S, Rey-Sánchez P, Pedrera-Zamorano J, Pedrera-Canal M, et al. Adherence to a Mediterranean Diet and Bone Mineral Density in Spanish Premenopausal Women. Nutrients. 2019;11(3):555-62.
46. Ensrud K, Crandall C. Osteoporosis. Ann Intern Med. 2017;167(3):17-32.
47. Sözen T, Özışık L, Başaran N. An overview and management of osteoporosis. . Eur J Rheumatol. 2017;4(1):46-56.
48. Bonnick SL. Bone Densitometry in Clinical Practice: Application and interpretation. ed, editor. New Yersey2010.
49. Kanis J, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int. 2019;30(1):3-44.

50. Liang H, Xie P, Fei H, Fali W, Daiwen C, De W, et al. Effects of Birth Weight and Postnatal Nutritional Restriction on Skeletal Muscle Development, Myofiber Maturation, and Metabolic Status of Early-Weaned Piglets. Animals. 2020;10(156):1-16.

51. Liang H, Fei H, Lin C, Xie P, Daiwen C, De W, et al. High nutrient intake during the early postnatal period accelerates skeletal muscle fiber growth and maturity in intrauterine growth-restricted pigs. Genes Nutr. 2018;13(23):1-11.

52. Pilcher C, Jones C, Schroyen M, Severin A, Patience J, Tuggle C, et al. Transcript profiles in longissimus dorsi muscle and subcutaneous adipose tissue: a comparison of pigs with different postweaning growth rates. J Anim Sci. 2015;93(5):2134-43.

53. Ilich JZ, Kerstetter J. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. J Am Coll Nutr 2000;19:715–37.

54. Heaney R. Bone health. Am J Clin Nutr. 2007;85:300-3.

55. Insel P, Turner E, Ross D. Proteins and amino acids: function follows form. In Discovering Nutrition. 2010;3:11-245.

56. Guntur A, Rosen C. IGF-1 regulation of key signalling pathways in bone. Bonekey Rep. 2013;2:437.

57. Kawao N, Kaji H. Interactions between muscle tissues and bone metabolism. J Cell Biochem. 2015;116(5):687-95.

58. Flodin L, Cederholm T, Sääf M, Samnegård E, Ekström W, Al-Ani AN, et al. Effects of protein-rich nutritional supplementation and bisphosphonates on body composition, handgrip strength and health-related quality of life after hip fracture: a 12-month randomized controlled study. BMC Geriatr. 2015;15(149):1-10.

59. Brown JP, Josse RG. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. CMAJ. 2002;167:1–34.

60. Qasem RJ, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'Mello A P. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2016;43(4):494-502.

61. Lanham SA, Roberts C, Perry MJ, Cooper C, Oreffo RO. Intrauterine programming of bone. Part 2: Alteration of skeletal structure. Osteoporos Int. 2008;19:157–67.

62. Li M, Zhai L, Wei W, Dong J. Effect of Methionine Restriction on Bone Density and NK Cell Activity. BioMed Research International. 2016:5.

63. Bourrin S, Toromanoff A, Ammann P, Bonjour JP, Rizzoli R. Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. J Bone Miner Res. 2000;15(8):1555-63.

64. Campbell WW, Tang M. Protein intake, weight loss, and bone mineral density in postmenopausal women. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2010;65(10):1115-22.

65. Ables GP, Perrone CE, Orentreich D, Orentreich N. Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density. PLoS One. 2012;7(12):1-12.

66. Kimura T, Noguchi Y, Shikata N, Takahashi M. Plasma amino acid analysis for diagnosis and amino acid-based metabolic networks. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2009;12(1):49-53.

67. Nascimento da Silva Z, Azevedo de Jesuz V, De Salvo Castro E, Soares da Costa CA, Teles Boaventura G, Blondet de Azeredo V. Effect of the “protein diet” and bone tissue. Nutr Hosp. 2014;29(1):140-5.

68. Alexy U, Remer T, Manz F, Neu CM, Schoenau E. Long-term protein intake and dietary potential renal acid load are associated with bone modeling and remodeling at the proximal radius in healthy children. Am J Clin Nutr. 2005;82:1107–14.

69. Theintz G, Buchs B, Rizzoli R, Slosman D, Clavien H, Sizonenko PC, et al. Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1992;75:1060–5.

70. Fung T, Willett W, Feskanich D. Protein intake and risk of hip fractures in post menopausal women and men over 50 years. The faseb journal. 2016;30(1):290-5.

71. Barzel U, Massey L. Excess dietary protein can adversely effect bone. J Nutr. 1998;128:1051–3.

72. Bonjour JP, Ammann P, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R. Nutrition aspects of bone growth: an overview. Nutritional aspects of bone health. 2003:111-27.

73. Dolan E, Sale C. Protein and bone health across the lifespan. Proc Nutr Soc 2019;78(1):45-55.

74. Genaro P, Pinheiro M, Szejnfeld V, Martini L. Dietary protein intake in elderly women: association with muscle and bone mass. Nutr Clin Pract. 2015;30(2):283-9.

75. Ballard TL, Specker BL, Binkley TL, Vukovich MD. Effect of protein supplementation during a 6-month strength and conditioning program on areal and volumetric bone parameters. Bone. 2006;38(6).

76. Hassanali V, Donald AB, Adam DG, Baxter J, Susan JW. The Effects of Dietary Protein on Bone Mineral Mass in Young Adults May Be Modulated by Adolescent Calcium Intake. The Journal of Nutrition. 2007;137(12):2674–9.

77. 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.

78. Pellett PL, Ghosh S. Lysine fortification: past, present, and future. Food Nutr Bull. 2004;25(2):107-13.

79. 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.

80. 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.

81. Grohmann U, Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism. Immunol Rev. 2010;236:243-64.

82. 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.

83. 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.

84. Noguchi Y, Zhang QW, Sugimoto T, Furuhata 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.

85. 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.

86. Heaney RP, Layman DK. Amount and type of protein influences bone health. Am J Clin Nutr. 2008;87:1567–70.

87. Cano A, Chedraui P, Goulis D, Lopes P, Mishra G, Mueck A, et al. Calcium in the prevention of postmenopausal osteoporosis: EMAS clinical guide. Maturitas. 2018;107:7-12.

88. Dagnelie P, Mariotti F. Vegetarian diets: Definitions and pitfalls in interpreting literature on health effects of vegetarianism. Academic Press. 2017;3:3-10.

89. Tucker KL. Vegetarian diets and bone status. Am J Clin Nutr. 2014;100(1):329-55.

90. O'Keefe JH, Bergman N, Carrera-Bastos P, Fontes-Villalba M, DiNicolantonio JJ, Cordain L. Nutritional strategies for skeletal and cardiovascular health: hard bones, soft arteries, rather than vice versa. Open Heart. 2016;3(1):1-8.

91. Ambroszkiewicz J, Chełchowska M, Szamotulska K, Rowicka G, Klemarczyk W, Strucińska M, et al. The Assessment of Bone Regulatory Pathways, Bone Turnover, and Bone Mineral Density in Vegetarian and Omnivorous Children. Nutrients. 2018;10(2):183-8.

92. Coronado-Zarco R, Gómez de León A, García A, Quinzaños-Fresnedo J, Nava-Bringas T, Macías-Hernández S. Nonpharmacological interventions for osteoporosis treatment: Systematic review of clinical practice guidelines. Osteoporos Sarcopenia. 2019;5(3):69-77.

93. Li-Ru C, Peng-Hsuan H, Kuo-Hu C. Nutritional Support and Physical Modalities for People with Osteoporosis: Current Opinion. Nutrients. 2019;11(12):2848-52.

94. Cerani A, Zhou S, Forgetta V, Morris J, Trajanoska K, Rivadeneira F, et al. Genetic predisposition to increased serum calcium, bone mineral density, and fracture risk in individuals with normal calcium levels: mendelian randomisation study. BMJ. 2019;44(10):366-75.

95. Weaver C, Gordon C, Janz K, Kalkwarf H, Lappe J, Lewis R, et al. The National Osteoporosis Foundation’s position statement on peak bone mass development and lifestyle

factors: a systematic review and implementation recommendations. Osteoporos Int. 2016;27(4):1281-386.

96. Parfitt AM. The two faces of growth: benefits and risks to bone integrity. Osteoporos Int. 1994;4:382-98.

97. 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.

98. Dawson-Hughes B, Harris SS, Rasmussen HM, Dallal GE. Comparative effects of oral aromatic and branched-chain amino acids on urine calcium excretion in humans. Osteoporos Int. 2007;18(7):955-61.

99. Clark EM, Ness AR, Bishop NJ, Tobias JH. Association between bone mass and fractures in children: a prospective cohort study. J Bone Miner Res. 2006;21:1489-95.

100. Kalkwarf HJ, Gilsanz V, Lappe JM, Oberfield S, Shepherd JA, Hangartner TN, et al. Tracking of bone mass and density during childhood and adolescence. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95:1690-8.

101. Berger C, Goltzman D, Langsetmo L, Joseph L, Jackson S, Kreiger N, et al. Peak bone mass from longitudinal data: implications for the prevalence, pathophysiology, and diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner ReS. 2010;25:1948-57.

102. Cooper C, Dennison EM, Leufkens HG, Bishop N, van Staa TP. Epidemiology of childhood fractures in Britain: a study using the general practice research database. J Bone Miner Res. 2004;19:1976-81.

103. Mayranpaa MK, Makitie O, Kallio PE. Decreasing incidence and changing pattern of childhood fractures: a population-based study. J Bone Miner Res. 2010;25:2752-9.

104. Kalkwarf HJ, Laor T, Bean JA. Fracture risk in children with a forearm injury is associated with volumetric bone density and cortical area (by peripheral QCT) and areal bone density (by DXA). Osteoporos Int. 2011;22:607-16.

105. Holloway KL, Brennan SL, Kotowicz MA, Bucki-Smith G, Timney EN, Dobbins AG, et al. Prior fracture as a risk factor for future fracture in an Australian cohort. Osteoporos Int. 2015;26:629-35.

106. 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.

107. Jordan-Lechuga T. Prodecimiento para la determinación de la hemoglobina mediante hemoglobinómetro portátil. Lima. 2013. [Available from: https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/cenan/van/tecnica_vigilancia_nutricional/bioquimica/Determinaci%C3%B3n_hemoglobina_mediante_hemoglobin%C3%B3metro_portatil.pdf.

108. 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.

109. Lab W. Método colorimétrico para la determinación de albúmina en suero Argentina.2000 [Available from: https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/albumina_aa_sp.pdf.

110. 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. .

111. Valencia CdIHGd. Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata Parte 2. Research in Surgery. 1990:12-20.

112. García-Barrios C, Mejías-Rodríguez I, Castillo del Río M. Origen e historia de la disección anatómica. Revisión bibliográfica. International Journal of Morphology. 2006;24(4):1-8.

113. Heithaus P. SKELETAL SYSTEM Gambier, Ohio.: Entire tutorial; 2010 [Available from: http://biology.kenyon.edu/courses/biol10/110pdfs/8skeleton.pdf.

114. Komarek V. Gross Anatomy Anatomy: Academiz Press; 2000. p. 257.

115. Chargoy-Lacima M, García-Aranda R, Araiza-Téllez M. Estudio comparativo de la distorsión de la longitud de trabajo en imágenes obtenidas con radiografías convencionales y radiovisiografía. UNAM. 2002:18-25.

116. Vera-Martínez N, Hernández -Urbiola M, Pérez Torrero E. ESTUDIO DE LA DENSIDAD MINERAL OSEA POR MEDIO DE RAYOS X EN RATAS DE LA SEPA WISTAR. UAQ.1-4.

117. Murphy M, Peters K, Denton B, Lee K, Chadchankar H, McCutcheon J. Restriction of dietary protein leads to conditioned protein preference and elevated palatability of protein-containing food in rats. Physiol Behav. 2018;1(184):235-41.

118. Alheiros-Lira M, Jurema-Santos G, Tomaz da-Silva H, Cabral da-Silva A, Moreno-Senna S, Ferreira E Silva W, et al. ffects of high-fat diet on somatic growth, metabolic parameters and function of peritoneal macrophages of young rats submitted to a maternal low-protein diet. Br J Nutr. 2017;117(6):796-803.

119. Wei-Chieh M, VanHoosier E, Elks C, Grant1 R. Long-Term Effects of Dietary Protein and Branched-Chain Amino Acids on Metabolism and Inflammation in Mice. Nutrients. 2018;10(7):918-27.

120. Qing-Qing Y, Pui K, Chang-Quan Z, Wan S, Ming-Hong G, Qiao-Quan L, et al. Improved growth performance, food efficiency, and lysine availability in growing rats fed with lysine-biofortified rice. Sci Rep. 2017;7(1389):1:11.

121. Lucas D, Taylor M, Hartnell G, Nemeth M, Glenn K, Davis S. Broiler Performance and Carcass Characteristics When Fed Diets Containing Lysine Maize (LY038 or LY038 × MON 810), Control, or Conventional Reference Maize. Elsevier. 2007;86(10):2152–216.

122. Corzo A, Moran EJ, Hoehler D. Lysine need of heavy broiler males applying the ideal protein concept. Poultry Science. 2002;81(12):1863-8.

123. Kidd M, Kerr B, Halpin K, McWard G, Quarles C. Lysine Levels in Starter and Grower-Finisher Diets Affect Broiler Performance and Carcass Traits. Journal of Applied Poultry Research. 1998;7(4):351-8.

124. Labadan MJ, HsuK N, Austic R. Lysine and Arginine Requirements of Broiler Chickens at Two- to Three-Week Intervals to Eight Weeks of Age. Poultry Science. 2001;80(5):599-6'6.

125. Hall J, Fritsch D, Jewell D, Burris P, Gross K. Cats with IRIS stage 1 and 2 chronic kidney disease maintain body weight and lean muscle mass when fed food having increased caloric density, and enhanced concentrations of carnitine and essential amino acids. Vet Rec. 2019;184(6):1-10.

126. Jewell D, Fritsch D, Schiefelbein H, Vanchina M. Taste Preference in Cats is Influenced by Physiological State. The FASEB Journal. 2015;29(1):1-8.

127. Macêdo G, Ferreira C, Menegaz A, Arantes V, Veloso R, Carneiro E, et al. Correlation of serum leptin and insulin levels of pregnant protein-restricted rats with predictive obesity variables. Braz J Med Biol Res. 2008;41(6):519-25.

128. He Z, Wu D, Sun Z, Tan Z, Qiao J, Ran T, et al. Protein or energy restriction during late gestation alters fetal growth and visceral organ mass: an evidence of intrauterine programming in goats. Anim Reprod Sci. 2013;137(3-4):177.82.

129. Jahan-Mihan A, Rodriguez J, Christie C, Sadeghi M, Zerbe T. The Role of Maternal Dietary Proteins in Development of Metabolic Syndrome in Offspring. Nutrients. 2015;7(11):9185-217.

130. Rothschild MA, Oratz M, Mongelli J, Fishman L, Schreiber SS. Amino acid regulation of albumin synthesis. The Journal of nutrition. 1969;98(4):395-403.

131. Yumei Z, Gang T, Daiwen C, Ping Z, Jie Y, Jun H, et al. Effect of different dietary protein levels and amino acids supplementation patterns on growth performance, carcass characteristics and nitrogen excretion in growing-finishing pigs. J Anim Sci Biotechnol. 2019;10(75):1-10.

132. Whipple GH, Robscheit-Robbins FS. Hemoglobin Production Factors in the Human Liver : Anemias, Hypoproteinemia, Cirrhosis, Pigment Abnormalities, and Pregancy. J Exp Med. 1942;76(3):283-98.

133. Yun J, Zhenlong W, Zhaolai D, Xiaolong W, Ju L, Binggen W, et al. Fetal and neonatal programming of postnatal growth and feed efficiency in swine. J Anim Sci Biotechnol. 2017;8(42):1-15.

134. Wu G, Bazer F, Cudd T, Meininger C, Spencer T. Maternal nutrition and fetal development. J Nutr. 2004;134(9):2169-72.

135. Wu G, Bazer F, Johnson G, Herring C, Seo H, Dai Z, et al. Functional amino acids in the development of the pig placenta. Molecular Reproduction and Development. 2017;84(9):870-82.

136. Fancher B, Jensen L. Male Broiler Performance During the Starting and Growing Periods as Affected by Dietary Protein, Essential Amino Acids, and Potassium Levels. Poultry Science. 1989;68(10):1385-95.

137. Wu G, Imhoff-Kunsch B, Girard A. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. Paediatr Perinat Epidemiol. 2012;26(1):4-26.

138. Figueroa J, Lewis A, Miller P, Fischer R, Diedrichsen R. Growth, carcass traits, and plasma amino acid concentrations of gilts fed low-protein diets supplemented with amino acids including histidine, isoleucine, and valine. J Anim Sci. 2003;81(6):1529-37.

139. Figueroa J, Lewis A, Miller P, Fischer R, Gómez R, Diedrichsen R. Nitrogen metabolism and growth performance of gilts fed standard corn-soybean meal diets or low-crude protein, amino acid-supplemented diets. J Anim Sci. 2002;80(11):2911-09.

140. Harper A, Benevenga N, Wohlhueter R. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. Physiol Rev. 1970;50(3):428-558.

141. Bihuniaka J, Insognab K. The effects of dietary protein and amino acids on skeletal metabolism. Mol Cell Endocrinol. 2018;15(410):78-86.

142. Bröer S, Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. Biochem J. 2017;474(12):1935-63.

143. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. Nutr Metab (Lond). 2018;15(33):1-12.

144. O'Rielly R, Li H, Lim S, Yazbeck R, Kritas S, Ullrich S, et al. The Effect of Isoleucine Supplementation on Body Weight Gain and Blood Glucose Response in Lean and Obese Mice. Nutrients. 2020;12(8):2446.

145. Bar-Peled L, Sabatini D. Regulation of mTORC1 by amino acids. Trendsd Cell Biol. 2014;24(7):400-6.

146. Preedy V, Garlick P. The response of muscle protein synthesis to nutrient intake in postabsorptive rats: the role of insulin and amino acids. Biosci Rep. 1986;6(2):177.83.

147. Hara K, Yonezawa K, Weng Q, Kozlowski M, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. J Biol Chem. 1998;273(23):14484-94.

148. Wang X, Campbell L, Miller C, Proud C. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. Biochem J. 1998;15(334):261-7.

149. Sreekumaran-Nair K, Short K. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. J Nutr. 2005;135(6):1547-52.

150. Watford M. Lowered concentrations of branched-chain amino acids result in impaired growth and neurological problems: insights from a branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex kinase-deficient mouse model. Nutr Rev. 2007;65(4):167-72.
151. Anthony T, Reiter A, Anthony J, Kimball S, Jefferson L. Deficiency of dietary EAA preferentially inhibits mRNA translation of ribosomal proteins in liver of meal-fed rats. Am J Physol Endocrinol Metab. 2001;281(3):430-9.
152. Hannan M, Tucker K, Dawson-Hughes B, Cupples L, Felson D, Kiel D. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. J Bone Miner Res. 2000;15(12):2504-12.
153. Beasley J, LaCroix A, Larson J, Huang Y, Neuhouser M, Tinker L, 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.
154. Kim J, Zanovec M, Fulgoni V, Campbell W. Effect of dietary protein on bone status in US adults aged 50 years and older. FASEB, J. 2013;27:1999–2004.
155. Wu G. Amino acids: biochemistry and nutrition. Raton B, editor. USA: CRC Press; 2013.
156. Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Human Osteopenic Bone-Derived Osteoblasts: Essential Amino Acids Treatment Effects. Biomed Pharmacother. 2009;31(1):35-46.
157. Solon-Biet S, McMahon A, O Ballard J, Ruohonen K, E Wu L, C Cogger V, et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. Cell Metab. 2014;4(19):418-30.
158. D'Antona G, Ragni M, Cardile A, Tedesco L, Dossena M, Bruttini F, et al. Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. Cell Metab. 2010;12(4):362-72.
159. Liu Z, Jeppesen P, Gregersen S, Chen X, Hermansen K. Dose- and glucose-dependent effects of amino acids on insulin secretion from isolated mouse islets and clonal INS-1E beta-cells. Rev Diabet Stud. 2008;5(4):232-44.

160. Yang J, Zhang X, Wang W, Liu J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. Cell Biochem Funct. 2010;28(4):334-41.

161. Newsholme P, Brennan L, Bender K. Amino acid metabolism, beta-cell function, and diabetes. Diabetes. 2006;55(2):39-47.

162. Guidotti G. Amino acid transport systems. Ital J Gastroenterol. 1993;25:37-41.

163. Orozco I, Santoyo-Velasco C, Bachá-Méndez G. ANÁLISIS OBSERVACIONAL DE PATRONES CONDUCTUALES: UNA PER SPECTIVA "MÁS ALLÁ" DE LA OPERANTE. Mexican Journal of Behavior Analysis. 2017;43:40-59.

164. Sroga G, Karim L, Colón W, Vashishth D. Biochemical Characterization of Major Bone-Matrix Proteins Using Nanoscale-Size Bone Samples and Proteomics. Mol Cell Proteomics. 2011;10(9):1-12.

165. Atkinson P. CHANGES IN RESORPTION SPACES IN FEMORAL CORTICAL BONE WITH AGE. J Pathol Bacteriol. 1965;89:173-8.

166. Sanders K, Pasco J, Ugoni A, Nicholson G, Seeman E, Martin T, et al. The exclusion of high trauma fractures may underestimate the prevalence of bone fragility fractures in the community: the Geelong Osteoporosis Study. J Bone Miner Res. 1998;13(8):1337-42.

167. Beck T, Oreskovic T, Stone K, Ruff C, Ensrud K, Nevitt M, et al. Structural adaptation to changing skeletal load in the progression toward hip fragility: the study of osteoporotic fractures. J Bone Miner Res. 2001;16(6):1108-19.

168. Geissler J, Bajaj D, Fritton J. American Society of Biomechanics Journal of Biomechanics Award 2013: Cortical bone tissue mechanical quality and biological mechanisms possibly underlying atypical fractures. J Biomech. 2015;48(6):883-94.

169. Hardy E, Fernandez-Patron C. Destroy to Rebuild: The Connection Between Bone Tissue Remodeling and Matrix Metalloproteinases. Front Physiol. 2020;11(47):1-24.

170. Yajima A, Inaba M, Tominaga Y, Nishizawa Y, Ikeda K, Ito A. Increased osteocyte death and mineralization inside bone after parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. J Bone Miner Res. 2010;25(11):2374-81.

171. Marotti G, Favia A, Zallone A. Quantitative analysis on the rate of secondary bone mineralization. Calcif Tissue Res. 1972;10(1):67-81.

172. Manolagas S. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev. 2000;21(2):115-37.
173. Boivin G, Meunier P. Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone. Connect Tissue Res. 2002;43(2):535-7.
174. Burger E, Klein-Nulend J, Smit T. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. J Biomech. 2003;36(10):1453-9.
175. Lerebours C, Weinkamer R, Roschger A, Buenzlid P. Mineral density differences between femoral cortical bone and trabecular bone are not explained by turnover rate alone. Bone Rep. 2020;13:1-23.
176. Everts V, Korper W, Jansen D, Steinfort J, Lammerse I, Heera S, et al. Functional heterogeneity of osteoclasts: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvarial bone but not in resorption of long bone. FASEB J. 1999;13(10):1219-30.
177. Delaissé J, Andersen T, Engsig M, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. Microsc Res Tech. 2003;15(61):504-13.
178. Everts V, Delaissé J, Korper W, Beertsen W. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. J Bone Miner Res. 1998;13(9):1420-30.
179. Everts V, Korper W, Hoeben K, Jansen I, Bromme D, Cleutjens K, et al. Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. J Bone Miner Res. 2006;21(9):1399-408.
180. Stickens D, Behonick D, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. Development. 2004;131(23):5883-95.
181. Inada M, Wang Y, Byrne M, Miyaura C, Krane S. Mice with null mutation in collagenase-3 (Matrix Metalloproteinase [MMP]-13) exhibit altered bone remodeling and increased bone mass. J Bone Miner Res. 2001;1:16-149.

182. Kennedy A, Inada M, Krane S, Christie P, Harding B, López-Otín C, et al. MMP13 mutation causes spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD(MO). J Clin Invest. 2005;115(10):2832-42.

183. Katiucia-Batista S, Granjeiro J. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. Arch Biochem Biophys. 2014;1(561):74-87.

184. Macica C, King H, Wang M, McEachon C, Skinner C, Tommasinid S. Novel Anatomic Adaptation of Cortical Bone to Meet Increased Mineral Demands of Reproduction. Bone. 2016;85:59-69.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Dictamen de aprobación de CIECUAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
COORDINACIÓN ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS
DIRECCIÓN DEL BIOTERIO
COMITÉ INTERNO DE ÉTICA

CIECUAL

DICTAMEN DE EVALUACIÓN

DICTAMEN DE EVALUACIÓN

San Agustín Tlaxiaca, Hgo. a 06 de diciembre del 2018

Estimada Dra.Guadalupe López Rodríguez.

Por medio de la presente, le informamos que después de haber evaluado el protocolo intitulado "Efectividad de la suplementación de aminoácidos esenciales en el crecimiento de huesos largos en crías de ratas Wistar con restricción del crecimiento", éste ha sido **Aproado**, por lo que queda registrado con **el Folio CIECUAL/006/2018**.

Sin más otro particular, aprovechamos la ocasión desearle el mejor de los éxitos en su proyecto.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN y PROGRESO"

Dr Luis Delgado Olivares
PRESIDENTE DEL CIECUAL

Ing. Daniel Ramírez Rico
DIRECTOR DEL BIOTERIO