



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**Efecto de la suplementación de aminoácidos
esenciales en el crecimiento de huesos largos en
crías de ratas Wistar con restricción proteica.**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

PLN. Maria Vianey Abelar Rosas

Bajo la Dirección de:
Dra. Guadalupe López Rodríguez
Profesor Investigador, Instituto de Ciencias de la Salud,
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo



Pachuca, Hgo., enero, 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**



De acuerdo con el artículo 40 del Reglamento de Titulación vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Efecto de la suplementación de aminoácidos esenciales en el crecimiento de huesos largos en crías de ratas Wistar con restricción proteica"

Que para obtener el Título de Licenciada en Nutrición sustenta la Pasante

C. Maria Vianey Abelar Rosas
ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 28 de octubre de 2019
"Amor, Orden y Progreso"

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| PRESIDENTE: | DR. LUIS DELGADO OLIVARES |
| SECRETARIO: | MTRO. TEODORO SUÁREZ DIÉGUEZ |
| PRIMER VOCAL: | DR. MARCO AURELIO GONZÁLEZ UNZAGA |
| SEGUNDO VOCAL: | DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO |
| TERCER VOCAL: | DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ |
| PRIMER SUPLENTE: | DR. JOSÉ ALBERTO ARIZA ORTEGA |
| SEGUNDO SUPLENTE: | DRA. DIANA PATRICIA OLIVO RAMÍREZ |

RECONOCIMIENTOS

Para la realización del proyecto de investigación de esta tesis se recibió financiamiento de:

SEP-PRODEP Convocatoria Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2016, clave UAEH-CA-86.

SEP-PRODEP Convocatoria de Apoyo a la Incorporación de NPTC, convenio 511-6/17-8021.

Dedicatorias

Sin duda, este trabajo se lo dedico a mis padres Gabriel y Eva por todo su apoyo, amor, esfuerzo y dedicación que me han brindado durante todo este tiempo, gracias a ustedes he logrado culminar esta etapa de mi formación académica.

Gracias papá por siempre estar para mí, por no dejarme sola, por confiar en mí y por todo ese amor que me regalas día a día. Eres la persona más fuerte que conozco, te admiro, eres un ejemplo a seguir y mi inspiración para no darme por vencida, te amo infinitamente.

Gracias mamá porque a pesar de las adversidades has estado ahí para apoyarme en todo momento y no dejarme sola, también por enseñarme hacer una mujer fuerte e independiente. Admiro la mujer que eres, te amo infinitamente.

Gracias abuela Margarita por todo su apoyo y cariño que me ha otorgado desde que inicie la Universidad, este trabajo es fruto de todo lo aprendido a lo largo de estos años. La admiro y quiero con todo mi corazón.

Para ti Hansel, gracias mi amor por ser esa personita que me inspira y motiva día a día para salir adelante y no darme por vencida, voy a luchar siempre por tu bienestar y por mantenernos juntos. Eres mi vida entera, mi adoración y lo que más amo en este mundo, aún eres muy pequeñito, pero cuando ya puedas leer estas líneas, espero que sientas tanto orgullo como el que yo siento, te amo infinitamente mi amor.

Gracias Ángel porque a pesar de ser pequeño de edad eres muy inteligente, cada día aprendo cosas nuevas de ti y espero ser un ejemplo a seguir, para que te sigas con tus estudios y logres muchas cosas, te amo y siempre estaré para ti hermano.

Con todo mi amor para ustedes.

Agradecimientos

A la primera persona que quiero agradecer es a mi directora de tesis, la Dra. Guadalupe, por permitirme trabajar a su lado, por mostrarme que cuando se quiere se puede y que nada es imposible. Gracias por su tiempo, confianza, paciencia, consejos, apoyo moral y profesional, por compartir conmigo su conocimiento y sobre todo por creer en mí y no dejarme sola, sin su apoyo esto no habría sido posible. La admiro, respeto y estimo mucho.

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

A mis amigas de toda la vida Tere y Joss por todo su apoyo y cada aventura compartida, por escucharme y estar siempre a pesar de la distancia, las amo.

Quiero agradecer a mis amigas de Universidad Mafer, Adri y Bren por todos esos momentos que compartimos, esos días de diversión, de tristeza y también de estrés. Cada una de ustedes me ha enseñado a ser una mejor persona, les agradezco por formar parte de mi vida, las admiro y amo mucho.

A ustedes Lei y Flor mis amigas, mis confidentes, mis compañeras de carrera y servicio social. Gracias por tantas risas, llantos, diversión y aventuras compartidas, quiero agradecerles por hacer estos últimos años de mi vida los mejores, por hacerme una persona más fuerte y sobre todo por nunca dejarme sola. Las amo infinitamente y siempre estarán en mi corazón.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Vale, Joce, Liz, Diana, Erick, Eric y Germán, por cada momento compartido, por alegrarme cada día, por cada consejo y por todo su apoyo, los quiero.

Gracias a mis tías Martha y Juana por todo su apoyo, consejos y por guiarme a tomar las mejores decisiones, también a mis primas Gaby, Maleny y Jaqueline por motivarme a terminar este proceso y por compartir días de mucha risa, las quiero mucho. Además, a toda mi familia por su apoyo y cariño que han brindado a lo largo de mi vida, los quiero mucho a cada uno de ustedes.

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

ÍNDICE GENERAL

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Resumen..... | 1 |
| 2. | Abstract..... | 2 |
| 3. | Marco teórico | 3 |
| 3.1 | Crecimiento..... | 3 |
| 3.2 | Factores que condicionan el crecimiento..... | 3 |
| 3.2.1 | Alteraciones nutricionales | 3 |
| 3.2.2 | Hormonales..... | 4 |
| 3.3 | Genética del crecimiento | 4 |
| 3.3.1 | Regulación genética del crecimiento..... | 5 |
| 3.4 | Crecimiento del tejido óseo..... | 5 |
| 3.4.1 | El efecto de la proteína en el tejido óseo | 7 |
| 3.4.2 | Aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas | 10 |
| 3.4.3 | El efecto de los aminoácidos en el tejido óseo..... | 11 |
| 3.4.4 | Calcio y vitamina D en el tejido óseo..... | 13 |
| 3.4.5 | Elementos traza en el tejido óseo | 13 |
| 3.5 | Retardo en el crecimiento | 13 |
| 3.5.1 | Causas nutricionales del retardo del crecimiento..... | 15 |
| 3.5.2 | Tejido óseo y muscular en el retardo del crecimiento | 15 |
| 4. | Problema de investigación | 18 |
| 5. | Justificación..... | 19 |
| 6. | Objetivos | 20 |
| 6.1 | Objetivo general..... | 20 |
| 6.2 | Objetivos específicos..... | 20 |
| 7. | Hipótesis | 20 |
| 8. | Diseño metodológico..... | 21 |
| 8.1 | Tipo de estudio | 21 |
| 8.2 | Diagrama de flujo de la metodología | 21 |
| 8.3 | Animales de experimentación..... | 22 |
| 8.4 | Condiciones de alojamiento..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 8.5 Dietas..... | 23 |
| 8.6 Apareamiento | 26 |
| 8.7 Gestación y lactancia..... | 26 |
| 8.8 Registro de peso e ingesta calórica..... | 27 |
| 8.9 Sacrificio | 28 |
| 8.10 Medición de albúmina y hemoglobina..... | 28 |
| 8.11 Disección de huesos largos | 29 |
| 8.12 Análisis estadístico | 32 |
| 8.13 Aspectos éticos..... | 32 |
| 9. Resultados y Discusión..... | 33 |
| 10. Conclusiones..... | 47 |
| 11. Referencias bibliográficas | 48 |
| 12. Anexos | 56 |
| 12.1 Anexo 1: Dictamen de aprobación del CIEQUAL..... | 56 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Composición de nutrientes en la dieta AIN-93G y AIN-93M para roedores..... | 24 |
| Tabla 2. Formulaciones de la dieta administrada durante el periodo de restricción proteica (AIN-93M), gestación y lactancia (AIN-93G) a ratas Wistar hembra..... | 25 |
| Tabla 3. Aporte calórico por gramo de alimento para cada grupo de estudio..... | 27 |
| Tabla 4. Cambios de peso y hemoglobina en ratas Wistar hembra con una dieta de restricción proteica..... | 33 |
| Tabla 5. Ingesta de energía en ratas Wistar hembra con una dieta de restricción proteica..... | 35 |
| Tabla 6. Consumo de alimento e ingesta de energía en ratas Wistar hembra con una dieta de restricción proteica y suplementadas con 7 aminoácidos esenciales durante la gestación y lactancia..... | 37 |
| Tabla 6.1 Consumo de alimento e ingesta de energía en ratas Wistar hembra con una dieta de restricción proteica y suplementadas con leucina, treonina e isoleucina durante la gestación y lactancia. Continuación de Tabla 6..... | 38 |
| Tabla 7. Diferencias de peso, ganancia de peso, hemoglobina, albúmina y sobrevivencia en ratas Wistar hembra durante la gestación y lactancia..... | 41 |
| Tabla 8. Peso, hemoglobina y albúmina de crías de ratas Wistar suplementadas con 7 aminoácidos esenciales al término de la lactancia..... | 44 |
| Tabla 8.1 Peso, hemoglobina y albúmina de crías de ratas Wistar suplementadas leucina, treonina e isoleucina al término de la lactancia. Continuación Tabla 8..... | 44 |
| Tabla 9. Peso y longitud de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías de ratas Wistar suplementadas con aminoácidos esenciales..... | 46 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismos entre las proteínas y el hueso..... | 9 |
| Figura 2. Activación de la síntesis de proteínas por aminoácidos y factores de crecimiento a través de la vía de señalización de mTOR..... | 11 |
| Figura 3. Diseño metodológico de ratas Wistar con suplementación de aminoácidos esenciales..... | 21 |
| Figura 4. Imagen de huesos de pata delantera derecha de rata..... | 30 |
| Figura 5. Imagen de los músculos superficiales de rata..... | 30 |
| Figura 6. Imagen de huesos de pata trasera derecha de rata..... | 31 |
| Figura 7. Ingesta de energía de las ratas Wistar durante la gestación..... | 39 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| ACR | Aminoácidos de cadena ramificada |
| AIN-93M | Dieta AIN 93 para mantenimiento |
| AIN-93G | Dieta AIN 93 para gestación y lactancia |
| AKT | Proteína quinasa B |
| Alb | Albúmina en suero |
| AMP | Adenosín monofosfato |
| AMPK | Proteína quinasa activada por AMP |
| DMO | Densidad mineral ósea |
| DPGeS | Diferencia de peso gestación semanal |
| g | Gramos |
| GanPG | Ganancia de peso gestacional |
| GanPcría | Ganancia de peso crías |
| GBP | Grupo bajo en proteína |
| GBP-AA | Grupo bajo en proteína suplementado con un mix de aminoácidos esenciales |
| GBP-Ile | Grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina |
| GBP-Leu | Grupo bajo en proteína suplementado con leucina |
| GBP-Thr | Grupo bajo en proteína suplementado con treonina |
| GeS | Gestación semanal |
| GH | Hormona del crecimiento |
| Hb | Hemoglobina en sangre |

| | |
|---------|---|
| IGF-1 | Factor de crecimiento insulina 1 |
| Kcal | Kilocalorías |
| LacS | Lactancia semanal |
| mTOR | Diana de rapamicina en células de mamíferos |
| mTORC1 | Complejo de señalización sensible a la rapamicina 1 |
| mTORC2 | Complejo de señalización insensible a la rapamicina 2 |
| OléCub | Olécranon más cúbito |
| PG | Periodo antes de la gestación |
| PGL | Periodo de gestación y lactancia |
| Pcría | Peso crías |
| PRAL | Carga renal ácida |
| S6K1 | Proteína ribosómica S6 quinasa 1 |
| TSC-1/2 | Complejo de esclerosis tuberosa-1/2 |
| 4E-BP1 | Proteína 1 de unión eIF4E |

1. Resumen

Introducción. El retraso en el crecimiento afecta a niños menores de dos años de poblaciones de bajos recursos, debido a una alimentación deficiente de macronutrientes y minerales, principalmente de la proteína, que forma parte de la matriz ósea. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la suplementación con aminoácidos esenciales en el crecimiento de huesos largos de las crías de ratas Wistar hembra con restricción proteica. **Metodología.** Se evaluaron 18 ratas Wistar hembra de 4 semanas de vida, alimentadas al 9% de proteína total, durante 5 semanas previas al apareamiento, registrando el peso semanal. Durante la gestación y lactancia se asignaron aleatoriamente 3 hembras para cada grupo de estudio: GBP, GBP-AA, GBP-Leu, GBP-Thr y GBP-Ile, alimentadas con la dieta AIN-93G al 8% de proteína total y grupo control con AIN-93G estándar. Al final del tratamiento en las crías se obtuvo peso y longitud de los huesos largos de la pata delantera y trasera, así como la concentración de hemoglobina y albúmina sérica. Los datos se procesaron en SPSS© versión 21.0. **Resultados.** La ganancia de peso total durante la gestación fue mayor para el GBP en comparación con el GBP-AA y GBP-Leu (123.6 ± 9.1 g vs 78.5 ± 7.8 g, 74.2 ± 13.9 g, $p=0.004$, respectivamente). En las crías la concentración sérica de albúmina y hemoglobina al día 22 de vida fue mayor para el grupo control en comparación con el resto de los grupos de estudio ($p=0.001$), con excepción del GBP-Ile que registró una concentración de albúmina semejante al grupo control (3.7 ± 0.2 mg/dL, 3.6 ± 0.2 mg/dL, respectivamente). El peso y longitud promedio de los huesos largos de las patas delanteras y traseras de las crías fue mayor para el grupo control, en comparación con el GBP y el resto de los grupos de estudio ($p=0.001$). **Conclusión.** La restricción proteica en las crías de ratas Wistar afecta el crecimiento óseo, sin embargo, la suplementación con Ile favoreció el crecimiento de la longitud de huesos largos (radio y fémur) en comparación con el resto de los aminoácidos suplementados, así como la concentración de albúmina al día 22 de vida. **Palabras clave:** rata Wistar, crecimiento óseo, suplementación de aminoácidos, gestación y lactancia.

2. Abstract

The stunted growth affects children under two years of the low-income populations, due to a poor macronutrients and minerals diet, mainly deficient in protein, which is part of the bone matrix. **Objective:** Evaluate the effect of essential amino acids supplementation on long bones growth of the offspring female Wistar rats with protein restriction. **Methodology:** 18 female Wistar rats of 4 weeks of age, fed at 9% total protein were evaluated for 5 weeks prior to mating, recording the weekly weight. During pregnancy and lactation, were randomly assigned 3 animals to each study group: GBP-AA, GBP-Leu, GBP-Thr and GBP-Ile fed with AIN-93G diet an 8% total protein and control group with standard AIN-93G. At the end of the treatment in the offspring, weight and length of the long bones of the front and rear leg were obtained, as well as the concentration of hemoglobin and serum albumin. Data was processed with the statistical package SPSS © version 21.0. **Results:** The total weight gain during pregnancy was higher for GBP compared to GBP-AA and GBP-Leu (123.6 ± 9.1 g vs. 78.5 ± 7.8 g, 74.2 ± 13.9 g, $p=0.004$, respectively). In the offspring the serum albumin and hemoglobin concentration at day 22 of life was higher for the control group compared to the rest of the study groups ($p=0.001$), with the exception of GBP-Ile, which registered a similar albumin concentration to the control group (3.7 ± 0.2 mg/dL, 3.6 ± 0.2 mg/dL, respectively). The average weight and length of the long bones of the front and rear legs of the offspring was greater for the control group, compared to the GBP and the rest of the study groups ($p=0.001$). **Conclusion:** Protein restriction in the offspring of Wistar rats affects bone growth, however, Ile supplementation favored the growth length of long bones (radius and femur) compared to the rest of the amino acids supplemented, as well as the albumin concentration at day 22 of life.

Keywords: Wistar rat, bone growth, amino acid supplementation, pregnancy and lactation.

3. Marco teórico

3.1 Crecimiento

El crecimiento es el proceso de incremento de la masa de un ser vivo que se produce por el aumento del número de células (López, 2013). Así el crecimiento es solo la manifestación de la capacidad de síntesis de un organismo y de cada una de las células, por lo que el crecimiento inicial de diversos tejidos se caracteriza por el rápido aumento en el número de células, y de la relación ácido desoxirribonucleico/proteínas, y una reducción consecuente de la cantidad de citoplasma formado en las células (Calzada, 1998). El crecimiento normal se expresa en términos de crecimiento lineal y de aumento de la masa corporal a través del tiempo (López, 2013).

3.2 Factores que condicionan el crecimiento

3.2.1 Alteraciones nutricionales

La nutrición implica el aporte de nutrimentos y oxígeno al organismo, así como la utilización y adecuación metabólica para cubrir las necesidades fisiológicas de cada proceso, para que al final se realice la eliminación de elementos no útiles. El crecimiento del organismo humano necesita de tres tipos de nutrimentos para que se realice eficientemente (Calzada, 1998b):

- Energéticos, generalmente se expresan en kilocalorías (Kcal) y dependen principalmente del consumo de carbohidratos y grasas.
- 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 temperatura.

Cuando existe una deficiencia en la ingestión de uno o más nutrimentos esenciales, se produce a corto plazo la detención del crecimiento. Incluso la falta de un solo

aminoácido esencial, puede conducir a mayor limitación de crecimiento que una dieta carente de todos los aminoácidos esenciales (Calzada, 1998b).

3.2.2 Hormonales

La hormona del crecimiento (GH), es el principal regulador del crecimiento lineal, y posee importantes acciones metabólicas. La GH estimula especialmente en el hígado la producción del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), que se vincula a una de las seis proteínas transportadoras (Oliveira, Meneguz-Moreno, Aguiar-Oliveira & Barreto-Filho, 2011). La liberación de hormona de crecimiento (GH) está influida de manera directa por el equilibrio entre la hormona liberadora de hormona de crecimiento hipotalámica y somatostatina que llegan a la hipófisis a través de la circulación hipotálamo hipofisaria (Calzada, 1998a).

La hipoglucemia y algunos aminoácidos (arginina, lisina) incrementan la secreción de la GH, mientras que la insulina y los ácidos grasos libres la inhiben, de manera experimental se ha observado que luego de un ayuno de cinco días aumenta la concentración sérica de la GH, lo cual coincide con disminución de ácidos grasos e insulina y aumento de aminoácidos circulantes, producto de la gluconeogénesis (Calzada, 1998a). Existe evidencia que cuando hay presencia de enfermedades como anorexia nerviosa, obesidad, diabetes mellitus y desnutrición, la secreción de la GH se encuentra modificada (Calzada, 1998a).

Las concentraciones séricas de hormona de crecimiento que se encuentran en la circulación sistémica aumentan de manera significativa desde el inicio de la pubertad, por el efecto de los andrógenos. Sin embargo, existen diferencias notables en el patrón de secreción determinado por andrógenos y estrógenos (Calzada, 1998a).

3.3 Genética del crecimiento

Los genes son los principales detonadores fisicoquímicos, que dirigen y condicionan el crecimiento, además de que su acción depende de la integración y el buen funcionamiento del sistema nervioso y el sistema endocrino (Calva, 2005). Es

importante resaltar que la dirección y la velocidad del crecimiento y del desarrollo son los principales representantes del control genético al que está sometido el individuo con condiciones fisiológicas y en términos generales se mantienen características semejantes para todos los seres humanos como especie biológica, aunque para las niñas, el peso y la talla promedio son menores que la de los niños (Falkner, 1969b). También puede haber diferencias en cuanto a la raza, es decir, hay ciertas particularidades y expresiones en el crecimiento propias de cada grupo étnico.

3.3.1 Regulación genética del crecimiento

El organismo debe mantener un equilibrio entre la síntesis y la degradación, por una parte se debe asegurar el consumo de energía y nutrientes orgánicos e inorgánicos, para mantener el anabolismo y catabolismo, por lo que debe existir un equilibrio entre la replicación del material genético (ácidos desoxirribonucleico) y las proteínas generadas para mantener la división celular (Calzada, 1998).

3.4 Crecimiento del tejido óseo

El crecimiento óseo constituye un proceso fisiológico único que en la naturaleza no tiene paralelo con el crecimiento de ningún otro tejido (Falkner, 1969a). El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado, mineralizado, vascularizado e innervado, que forma la mayor parte del esqueleto, el armazón que soporta nuestro cuerpo, protege nuestros órganos y permite nuestros movimientos (Ibarra, 2012), también actúa como un depósito de minerales, la mayoría de los cuales tienen propiedades alcalinas (Carnauba, Baptistella, Paschoal, & Hubscher, 2017).

El tejido óseo está formado por células osteoprogenitoras, que tienen la capacidad de diferenciación y pueden originar fibroblastos, adipocitos, mioblastos, osteoblastos y osteoclastos (Ibarra, 2012). Los osteoclastos y osteoblastos son los principales en la formación de la matriz ósea; los osteoclastos se encargan de la reabsorción de la matriz ósea y los osteoblastos, de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y su posterior mineralización; los osteocitos, son células óseas maduras derivadas de los osteoblastos que constituyen la mayor parte del tejido

óseo. En promedio la composición en peso de la masa ósea es de un 15% de agua, 65% de minerales como fosfato y carbonato de calcio y 20% de materia orgánica, principalmente colágeno y otras proteínas (Ibarra, 2012).

La modificación ósea comienza con el desarrollo del esqueleto, desde la vida fetal hasta la segunda década de crecimiento, cuando las placas de crecimiento epifisario se cierran y se completa el crecimiento longitudinal (Burckhardt, 2010). La masa ósea aumenta rápidamente durante la infancia y la adolescencia, aproximadamente el 90% de esta, se adquiere a la edad de 20 años (Recker et al., 1992).

A partir de los 20 años ya se alcanza la masa ósea máxima, que se define como la cantidad de hueso presente en el esqueleto final de su proceso de maduración (Bonjour & Rizzoli, 2001), por lo que entra en un periodo de estabilidad relativa antes de comenzar un declive relacionada con el ingreso a la etapa adulta. Esto ocurre en ambos sexos, sin embargo, los hombres tienen mayor densidad mineral ósea (DMO) que las mujeres, mientras que las mujeres también tienen una tasa ligeramente más alta de disminución de la DMO relacionada con la edad (Hendrickx, Boudin, & Van Hul, 2015).

Cuando ya se tiene una edad avanzada existe mayor probabilidad de desarrollar afecciones por la pérdida ósea, como osteoporosis, que es una enfermedad esquelética sistémica progresiva caracterizada por una baja masa ósea y deterioro micro arquitectónico del tejido óseo, con el consiguiente aumento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad de fractura, esto puede ocurrir por un desequilibrio entre la resorción ósea (osteoclastos) y la formación ósea (osteoblastos) (W. H. O., 1994).

Existen varios factores no modificables (genética, edad, sexo y raza) y modificables (ejercicio, dieta y tabaquismo) que influyen, tanto en la acumulación como en la pérdida ósea (Dolan & Sale, 2018). Entre los factores de riesgo modificables, la carga mecánica lograda a través de algunos tipos de ejercicio indudablemente tiene un efecto positivo sobre el hueso. En cuanto a nutrición los encargados de la modulación del hueso son los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) y

algunos minerales (calcio, vitamina D, vitamina K, magnesio, potasio, fósforo, entre otros) (Ilich & Kerstetter, 2000).

3.4.1 El efecto de la proteína en el tejido óseo

Las proteínas son moléculas que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, formadas por polímeros de aminoácidos esenciales y no esenciales. La complejidad de la estructura de las proteínas permite el cumplimiento de funciones fisiológicas múltiples y de amplio alcance, incluidas funciones en procesos estructurales (colágeno), contráctiles (miosina y actina), inmunes (anticuerpos) y reguladores (enzimas y hormonas) (Insel, 2010). Las proteínas son un nutriente clave para el hueso, ya que su ingesta en la dieta regula el metabolismo óseo a través de dos aspectos: la presencia de aminoácidos y la transducción de señales; diversos aminoácidos obtenidos de los alimentos ricos en proteína, regulan la proteólisis y la síntesis de proteína, así como la vía de señalización de la hormona de crecimiento/hormona de crecimiento semejante a la insulina (Lv et al., 2019), modulando también el potencial genético para la adquisición de la masa ósea máxima (Burckhardt, 2010).

Existen diversos estudios que refieren que la proteína puede tener un impacto positivo y negativo en el crecimiento óseo, ya que la proteína representa aproximadamente la mitad del volumen de los huesos y alrededor del 33% de su masa, por lo que la resistencia del hueso dependerá de la integridad de sus componentes proteicos (Heaney, 2007). Es importante destacar que la matriz orgánica del hueso está formada por colágeno y proteínas no colágenas, de ahí la importancia de tener una ingesta de proteínas adecuada para que la acumulación de masa ósea durante la infancia y la adolescencia favorezca el mantenimiento de la salud ósea en la vejez (Dolan & Sale, 2018).

Hallazgos sugieren que una alta ingesta de proteína en la dieta puede tener impactos negativos en los huesos, esto debido a una mayor pérdida de calcio en el esqueleto para compensar un aumento en la carga de ácido, a lo que se le ha denominado hipótesis de la ceniza ácida. Esta hipótesis supone que una mayor excreción de

calcio, es resultado de la ingesta alta en proteínas en la dieta para proteger la integridad estructural del tejido óseo (Dolan & Sale, 2018).

Un estudio en el que evaluaron a 1218 hombres mayores de 60 años, muestra la importancia de las interacciones nutriente a nutriente entre la ingesta y la cinética de proteínas y calcio, mediante la investigación de la relación entre la carga ácida renal en la dieta (PRAL), el calcio suplementario y la DMO del fémur. Mostrando una relación inversa entre PRAL y la DMO del fémur proximal en hombres que consumen <800 mg de calcio al día, pero no hay asociación entre PRAL y la DMO en hombres que consumen >800 mg de calcio al día (Mangano, Walsh, Kenny, Insogna, & Kerstetter, 2014).

Existen cuatro mecanismos, tanto directos como indirectos, a través de los cuales las proteínas pueden afectar al hueso. Algunos mecanismos rigen la influencia de la ingesta de proteínas en los huesos en el eje calcio/vitamina D/paratiroidea, la moderación de varias hormonas, junto con su influencia en la absorción y acción de otros nutrientes. Además, los componentes de proteínas, como los aminoácidos aislados, también actúan para regular el metabolismo óseo a través de una amplia gama de mecanismos, donde se resalta el efecto de las proteínas y aminoácidos en las acciones de hormonas y factores de crecimiento que regulan el metabolismo óseo (fuerza y funcionalidad) (MacDonell, Hamrick, & Isales, 2016).

Los cuatro mecanismos descritos en la Figura 1, se refieren a los efectos positivos y negativos de la proteína en el hueso:

El primer mecanismo está relacionado con la regulación de la actividad de las hormonas anabólicas y factores de crecimiento (Insulina 1 (IGF-1), andrógenos y estrógenos). El IGF-1 ayuda en los procesos complejos de la remodelación ósea, modulando directamente la influencia de la ingesta nutricional en el metabolismo óseo, también puede actuar indirectamente para regular el hueso a través de un papel en la moderación de la absorción de calcio (Bonjour, Schurch, Chevalley, Ammann, & Rizzoli, 1997).

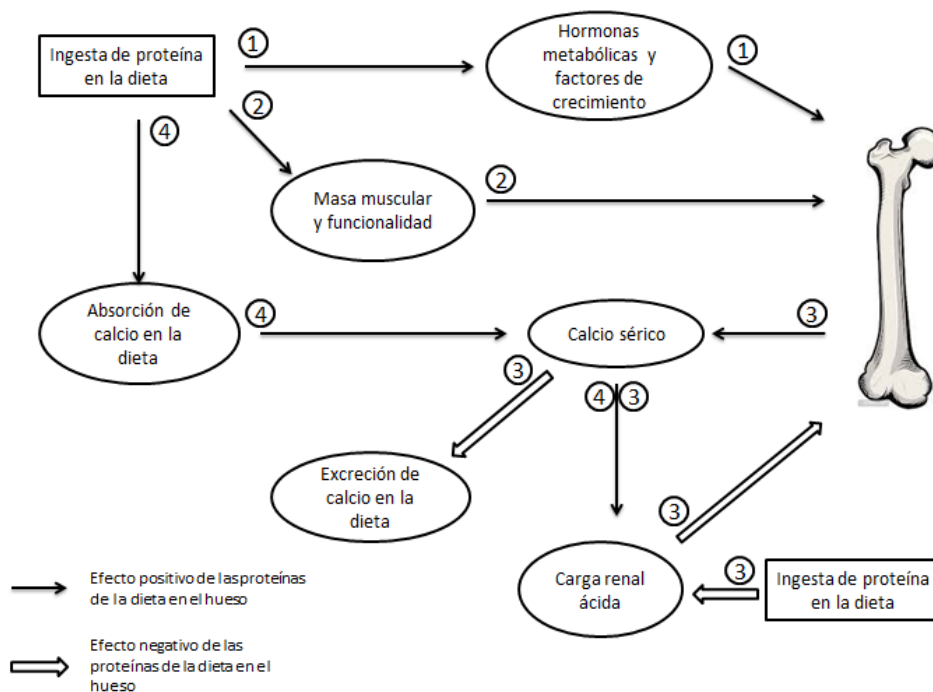


Figura 1. Mecanismos de interacción entre las proteínas y el hueso. Imagen adaptada de: Dolan, E. & Sale, C., 2018.

El segundo mecanismo describe el impacto positivo de la proteína en el músculo y su funcionalidad, se debe a que la masa corporal magra ejerce una importante influencia moderadora sobre el hueso, al aumentar la carga mecánica que proporciona. Es por ello que la ingesta de proteínas en la dieta puede influir directamente en los huesos a través de su impacto sobre la masa muscular magra, que se reconoce como uno de los predictores más fuertes de la masa ósea (Dolan & Sale, 2018).

El tercer mecanismo es cuando la proteína de la dieta aumenta la PRAL, lo que induce a un estado de acidosis metabólica de bajo grado, como puede ocurrir con altas ingestas de proteínas en la dieta, los minerales como el magnesio, potasio y calcio se pierden por un aumento de la excreción urinaria, lo que causa la desmineralización ósea (Carnauba et al., 2017).

El cuarto mecanismo inicia cuando la proteína en la dieta aumenta la absorción de calcio, por lo que la disponibilidad de calcio en suero se eleva, permitiendo la neutralización del pH, sin dañar el hueso (Dolan & Sale, 2018). El cuerpo necesita un pH cercano al neutral para una función óptima, y las desviaciones de este punto de ajuste homeostático pueden tener consecuencias metabólicas y fisiológicas generalizadas (Levitsky, 2018).

El origen de las proteínas también es un factor importante, ya que algunos autores afirman que las proteínas de origen animal tienen mayor contenido de aminoácidos azufrados, por lo que su efecto en el organismo es ácido, mientras que las de origen vegetal (frutas y verduras) tienen una influencia alcalina. Por lo tanto, se ha propuesto que si la dieta es rica en proteínas animales y baja en vegetales induce a un estado de acidosis metabólica de bajo grado, que tiene como consecuencia la afectación del metabolismo óseo (Carnauba et al., 2017).

3.4.2 Aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas

Los aminoácidos contienen en su estructura química un grupo carboxilo, un grupo amino, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R) todos ellos unidos al carbono α (Swanson, Kim & Glucksman, 2007). Los aminoácidos esenciales son aquellos que el organismo no puede sintetizar por sí mismo, obteniéndose de la ingesta de alimentos ricos en proteína de la dieta. En el ser humano se describen 9 aminoácidos como esenciales: leucina, valina, isoleucina, histidina, lisina, metionina, triptófano, fenilalanina y treonina (Carbajal, 2013).

De acuerdo a su estructura química, lo que diferencia a los aminoácidos es su radical R, ya que es variable en cuanto a posición y contenido. Los aminoácidos esenciales obtienen una clasificación dependiendo de este grupo químico (radical R), por ejemplo: la leucina, valina e isoleucina son de cadena ramificada; triptófano aromático polar; treonina, polar sin carga; fenilalanina, no polar; metionina, contiene sulfuro y lisina e histidina son de carga positiva (Swanson, Kim & Glucksman, 2007).

La síntesis de proteína ocurre en todas las células, debido a que las proteínas se recambian, pasan a la circulación generando un flujo bidireccional que permite mantener la concentración plasmática de los aminoácidos y llevar a cabo funciones específicas ya sea estructurales o de control metabólico (Bourges, Casanueva & Rosado, 2008). La leucina acelera la síntesis de proteína e incrementa la formación del factor de iniciación, también es degradada para formar tanto acetil-CoA como acetoacetato, tiene efecto sobre la masa muscular en los seres humanos (Swanson, Kim & Glucksman, 2007).

3.4.3 El efecto de los aminoácidos en el tejido óseo

El crecimiento humano está controlado por la vía principal de regulación del crecimiento, que es la diana de rapamicina en las células (mTOR). El sistema mTOR consiste en dos complejos de señalización, el primero sensible a la rapamicina 1 (mTORC1), que puede ser activada por aminoácidos; y el complejo insensible a la rapamicina 2 (mTORC2) activada por la quinasa y proteína tipo B de la proteína G (Laplante y Sabatini, 2012).

En la Figura 2 se observa la activación de la síntesis de proteína, esta inicia cuando mTOR fosforila la proteína 1 de unión a eIF4E (4E-BP1) y la proteína ribosómica S6 quinasa 1 (S6K1), estimulando así la síntesis de proteínas e inhibiendo la autofagia. mTOR es inhibido por el TSC-1/2 (complejo de esclerosis tuberosa-1/2) cuya actividad es potenciada por la AMPK (proteína quinasa activada por AMP) pero suprimida por la proteína quinasa B (AKT). La fosforilación de AKT en respuesta a la insulina y otros factores de crecimiento tiene un efecto inhibitorio de TSC-1/2 en mTOR (Liao, Majithia, Huang & Kimmel, 2008). La fosforilación de mTOR es estimulada por algunos nutrientes como: glutamina, arginina, leucina y glucosa, además del ácido fosfatídico producido por la fosfolipasa D (PLD), por lo tanto, aumentan su actividad. La oxidación de aminoácidos, glucosa y ácidos grasos aumenta las relaciones celulares de ATP: AMP, lo que reduce la actividad de AMPK (Wu, 2009). Entonces cuando la ingesta de aminoácidos esenciales en la dieta es

deficiente, este complejo mTORC1 lo detecta y empieza a reprimir a síntesis de las proteínas, de lípidos y el crecimiento celular (Semba et al., 2016).

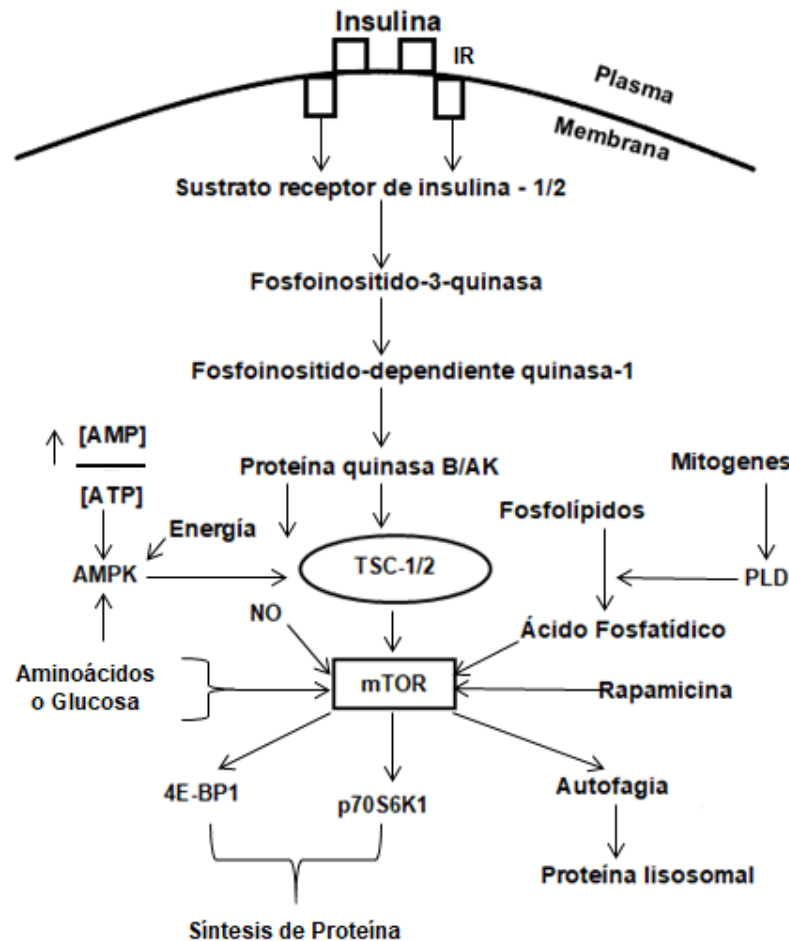


Figura 2. Activación de la síntesis de proteínas por aminoácidos y factores de crecimiento a través de la vía de señalización de mTOR. Imagen adaptada de: Guoyao Wu. 2009.

El crecimiento óseo en niños depende de la placa de crecimiento condral, que se regula por mTORC1 y la disponibilidad de aminoácidos, como el aminoácido esencial “leucina”. Dada esta relación del crecimiento con la ingesta de aminoácidos esenciales, existe una alta probabilidad que se dé un retraso en el crecimiento durante los primeros dos años de vida (Kim et al., 2009).

En 2014, se estimó que había 159 millones de niños con retraso en su crecimiento que viven en países de bajos ingresos (W. H. O, 2015), es importante resaltar que en este entorno los niños están más propensos a adquirir alguna enfermedad infecciosa, por lo que la carga de enfermedades y las necesidades metabólicas para la activación del sistema inmune puede dividir los aminoácidos esenciales para apoyar la función inmune a expensas del crecimiento (Kampman-van et al., 2016).

3.4.4 Calcio y vitamina D en el tejido óseo

Niños y jóvenes adultos con una mayor ingesta de calcio tienen significativamente mayor masa ósea en comparación con los que consumen menor cantidad de calcio, estos resultados han sido replicados en muchas poblaciones con lo cual se concluye que existe un efecto positivo en la masa ósea a corto tiempo al incrementar la ingesta de calcio a partir de suplementos o de alimentos (Thacher et al., 2009). Esto se explica por la necesidad del organismo en crecimiento para sintetizar fosfato de calcio e hidroxiapatita, necesaria para la rigidez del hueso. La vitamina D es crucial para la formación del hueso debido a que es necesaria para regular la expresión del gen que codifica para la proteína transportadora de calcio, necesaria para la absorción intestinal de calcio (Burckhardt, 2010).

3.4.5 Elementos traza en el tejido óseo

Los elementos básicos, carbono, oxígeno, hidrógeno, y nitrógeno junto con el calcio y el fósforo representan el 98% del peso seco del organismo, el restante 0.2% de la masa seca consiste en 40 elementos traza, entre los que se encuentra el zinc, el selenio, el cobre, el cromo, el cobalto y el hierro entre otros. En particular el zinc y el selenio tienen una importante función en la biología celular del hueso. Por lo que deficiencia de estos micronutrientes contribuyen a una deficiente formación de hueso (Burckhardt, 2010).

3.5 Retardo en el crecimiento

El crecimiento lineal en humanos comenzó a describirse en 1950, en ese momento se descubrió el eje de la hormona del crecimiento (GH) factor de crecimiento similar

a la insulina (IGF-I), sistema central que regula el crecimiento infantil, al cual se le atribuyó la causalidad del retardo en el crecimiento. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que el eje GH-IGF es solo uno de los muchos sistemas reguladores que controlan la condrogénesis en la placa del crecimiento; en consecuencia, el retardo en el crecimiento depende además de múltiples hormonas, factores paracrinos, moléculas de matriz extracelular y proteínas intracelulares que regulan los condrocitos de la placa de crecimiento (Baron, 2015).

El retardo en el crecimiento es causado por la disfunción de la placa de crecimiento que puede resultar de un defecto primario, es decir, un trastorno intrínseco de la placa de crecimiento, o un defecto secundario, en el que la placa de crecimiento se ve afectada por un trastorno en cualquier sitio del organismo (Lui & Baron, 2011). La evidencia que existe en modelos animales no excluye la posibilidad de que los mecanismos sistémicos contribuyan a la desaceleración del crecimiento fisiológico, pero sí indica que los mecanismos locales desempeñan un papel central en el proceso. Por lo tanto, la desaceleración del crecimiento parece ser principalmente una propiedad intrínseca de los órganos del crecimiento; no obstante, sigue siendo posible que tales mecanismos locales puedan depender de una señal sistémica (Lui y Baron, 2011); la disminución de la ingesta nutricional en sí no es responsable de la desaceleración del crecimiento, pero participa en medición local, ya que la disponibilidad nutricional regula el crecimiento celular en parte a través de la vía de señalización de la rapamicina (mTOR) a nivel molecular (Sabassov, Ali & Sabatini, 2005).

El crecimiento infantil es el mejor indicador del bienestar general de los niños y el retraso en el crecimiento un reflejo preciso de las desigualdades sociales; es la forma más prevalente de desnutrición infantil; esto se refleja en millones de niños en todo el mundo que no solo no logran su potencial de crecimiento lineal debido a precarias condiciones de salud y nutrición, que también sufren el severo daño físico y cognitivo irreversible que acompaña el crecimiento atrofiado. El retraso en el crecimiento a menudo no se reconoce en las comunidades donde la talla baja es tan común que se

considera normal. La dificultad para identificar visualmente a estos niños y la falta de evaluación rutinaria del crecimiento lineal en los servicios de salud explican por qué se ha tardado tanto en reconocer la magnitud de esta patología (De Onis & Branca, 2016).

3.5.1 Causas nutricionales del retardo del crecimiento

Los factores que con mayor frecuencia están implicados en el retardo del crecimiento posnatal son las deficiencias nutricionales de energía, proteína o micronutrientes como hierro, zinc y vitaminas D, A o C; así como las prácticas subóptimas de alimentación y altas tasas de infecciones (Martínez & Palma, 2015).

Los principales nutrientes se pueden clasificar en dos tipos según su impacto en el crecimiento; para los nutrientes de tipo 1 que se encuentran en diversas concentraciones en el tejido óseo y muscular; cuando se agotan las reservas corporales, las vías metabólicas se ponen en peligro y producen síntomas clínicos, sin embargo, el crecimiento raramente se ve afectado. Los nutrientes de tipo 2 están implicados en las funciones fisiológicas esenciales, los niveles de tejido óseo y muscular son fijos y no existe una reserva para el cuerpo a la que recurrir, en lapsos de prolongada deficiencia los síntomas clínicos tienden a no emerger, pero el retardo del crecimiento ocurre rápidamente. La respuesta a una deficiencia constante de cualquiera de estos nutrientes es el retardo en el crecimiento progresivo; en la mayoría de los casos, no es posible aclarar si alguno de estos nutrientes, o la combinación ha sido responsable del deterioro del crecimiento, para algunos de los nutrientes, la evidencia sobre un rol causal independiente es más sólida (Branca & Ferrari, 2002).

3.5.2 Tejido óseo y muscular en el retardo del crecimiento

La desnutrición crónica como una de las causas del retardo en el crecimiento atrofia la mucosa intestinal y pancreática, disminuyendo la producción de enzimas digestivas, sin embargo, no pierde la capacidad para hidrolizar proteínas. Durante el “recambio” proteico el organismo no es capaz de retener nitrógeno, lo que disminuye

la velocidad de síntesis proteica dos tercios en comparación con niños normales; las repercusiones de la disminución de síntesis proteica están directamente relacionadas con la reducción preferencial de síntesis del tejido muscular, como respuesta de protección a la deficiencia dietética de aminoácidos esenciales. La disminución de la retención de nitrógeno también se relaciona con la respuesta disminuida a las lesiones e infecciones (Waterlow, 1996).

La deficiencia de nutrientes específicos afecta la respuesta de la fase aguda reduciendo la producción de citoquinas o modulando la respuesta de los tejidos efectores de tejido muscular y óseo; en respuesta a ello el organismo buscara mecanismos para economizar nitrógeno; mediante la oxidación de aminoácidos esenciales o la disminución de la actividad del ciclo de la urea; los aminoácidos de cadena ramificada (ACR) presentan mayores descensos, estudios refieren que la deficiencia de ACR como la leucina afecta la síntesis proteica en el músculo (Waterlow, 1996).

Investigaciones realizadas desde hace 10 años, han demostrado que el hueso es un importante órgano endocrino, en el que interviene la leptina, insulina y osteocalcina, todos juegan un papel importante en el desarrollo óseo y metabólico, en el estudio realizado con dietas con diferentes requerimientos de proteínas han demostrado que el estado de nutrición de la madre, no solo afecta la absorción de nutrientes del feto, sino que además predispone la maduración ósea del mismo, el estudio de acumulación ósea de Saskatchewan y en estudios finlandeses muestran que el retraso de la maduración puede aumentar el riesgo de fractura de cadera a través de alteraciones en la acumulación de densidad ósea y crecimiento desproporcionado, demostrando que los bebés con retardo en el crecimiento son capaces de presentar recuperación de crecimiento acelerado cuando la ingesta proteica alcanza los requerimientos necesarios para la edad, siempre y cuando estos sean durante los primeros 1000 días de vida; los estudios hasta el momento concluyen que la dieta materna influye en la masa ósea a través de la programación de respuestas óseas en relación la ingesta proteica (Lanham, Bertram, Cooper, & Oreffo, 2011).

Un estudio realizado en la zona rural de Malawi en 2011, muestra que los niños con retraso en el crecimiento tienen concentraciones séricas más bajas de los nueve aminoácidos (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina) (Semba et al., 2016). Por lo tanto, las bajas concentraciones séricas de aminoácidos encontradas en estos niños tienen el potencial de reprimir la síntesis de proteínas y lípidos a través de mTORC1 y así retrasar el crecimiento. Aunque se muestra una concentración baja en los nueve aminoácidos, debe destacarse que la leucina es un aminoácido clave detectado por mTORC1, ya que fue el metabolito con mayor asociación en el crecimiento lineal (Saxton et al., 2016).

4. Problema de investigación

Los requerimientos de aminoácidos de los niños en los primeros dos años de vida, no están adaptados a las condiciones patológicas, por ejemplo la desnutrición. Por lo que las recomendaciones dietéticas que están establecidas no son suficientes para niños en entornos vulnerables, donde las enfermedades infecciosas son más frecuentes y las necesidades metabólicas aumentan. Se ha demostrado que la ingesta baja de proteínas tiene efectos nocivos en la adquisición de la masa mineral ósea.

En 2014, se estimó que había 159 millones de niños con retraso en el crecimiento, la mayoría de países de bajos ingresos. El retraso en el crecimiento se asocia con una menor supervivencia, un desarrollo cognitivo y motor deteriorado, productividad económica reducida y mayor posibilidad de vivir en la pobreza en edad adulta. Aunque se han implementado intervenciones nutricionales para reducir el retraso en el crecimiento, no son suficientes, ya que los recursos disponibles no alcanzan para dar cobertura a todos los sectores que presentan este problema. Es por ello que el impacto que han tenido estas intervenciones nutricionales ha sido deficiente y por ende no se alcanzarían los objetivos internacionales para reducir el retraso en el crecimiento.

Por lo anterior surgen las siguientes preguntas de investigación: ¿Qué efecto tiene la suplementación de aminoácidos esenciales en la longitud de huesos largos (fémur, tibia, fíbula, húmero, radio y olécranon más cúbito) en ratas Wistar? Y ¿Qué efecto tiene la suplementación de leucina, isoleucina, y treonina en la longitud de huesos largos (fémur, tibia, fíbula, húmero, radio y olécranon más cúbito) en ratas Wistar?

5. Justificación

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el retraso en el crecimiento afecta aproximadamente a un cuarto de los niños menores de cinco años de todo el mundo. El retraso en el crecimiento se desarrolla principalmente durante los primeros dos años de vida, ya que en este periodo la velocidad de crecimiento es mayor, se da la homeostasis, se definen las rutas metabólicas y también es el periodo más sensible en cuanto a deficiencias de macronutrientes y minerales (W. H. O, 2015). Una alimentación inadecuada es la principal causa del retraso del crecimiento, por la ingesta deficiente de macronutrientes y minerales, por lo que el crecimiento óseo se ve afectado. Sin embargo, las proteínas son las más importantes, ya que son las que proporcionan los aminoácidos necesarios al organismo para la construcción de la matriz ósea (Bhutta et al., 2013).

Un estudio realizado en países de bajos ingresos del norte de África, menciona que los niños que presentan retraso en el crecimiento, tienen una concentración sérica baja de aminoácidos, específicamente de los 9 aminoácidos esenciales, entre los que destacan leucina, isoleucina y treonina. Por lo que la ingesta adecuada de proteína y aminoácidos esenciales favorecerían el crecimiento óseo, disminuyendo así el retraso en el crecimiento (Semba et al., 2016).

Por lo que el estudio de la efectividad de los suplementos de aminoácidos esenciales es importante debido a que los resultados proveerían evidencia sobre su efecto en el crecimiento de huesos largos. A partir de estos datos se puede obtener información de gran importancia, pues de esta manera se logrará observar el efecto de 7 aminoácidos esenciales en conjunto (histidina, isoleucina, leucina, lisina, treonina, triptófano y valina) y de 3 de ellos de manera individual (leucina, isoleucina y treonina), esto con el fin de conocer cuál favorece más el crecimiento óseo. El uso de solo 7 aminoácidos esenciales de los 9 antes mencionados, se debe a la falta de disponibilidad del resto en la industria.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con aminoácidos esenciales en el crecimiento de huesos largos de las crías de ratas Wistar hembra con restricción proteica para identificar aminoácidos esenciales susceptibles a suplementar en tratamientos del crecimiento óseo.

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar los cambios de peso, hemoglobina y albúmina en ratas Wistar hembras relacionados con el consumo de una dieta AIN-93M al 64% de su requerimiento diario de proteínas.
2. Evaluar los cambios de peso de las ratas Wistar hembra desnutridas durante su gestación y lactancia asociado a la ingesta de aminoácidos esenciales y a una dieta AIN-93G al 58% de su requerimiento diario de proteína.
3. Evaluar el peso y longitud de huesos largos de patas delanteras y traseras de crías nacidas de madres con restricción proteica que fueron suplementadas con aminoácidos esenciales.

7. Hipótesis

La suplementación con aminoácidos esenciales en las ratas madre tiene un efecto positivo en la longitud de los huesos largos de las patas delanteras y traseras de las crías de ratas Wistar desnutridas.

8. Diseño metodológico

8.1 Tipo de estudio

Estudio experimental.

8.2 Diagrama de flujo de la metodología

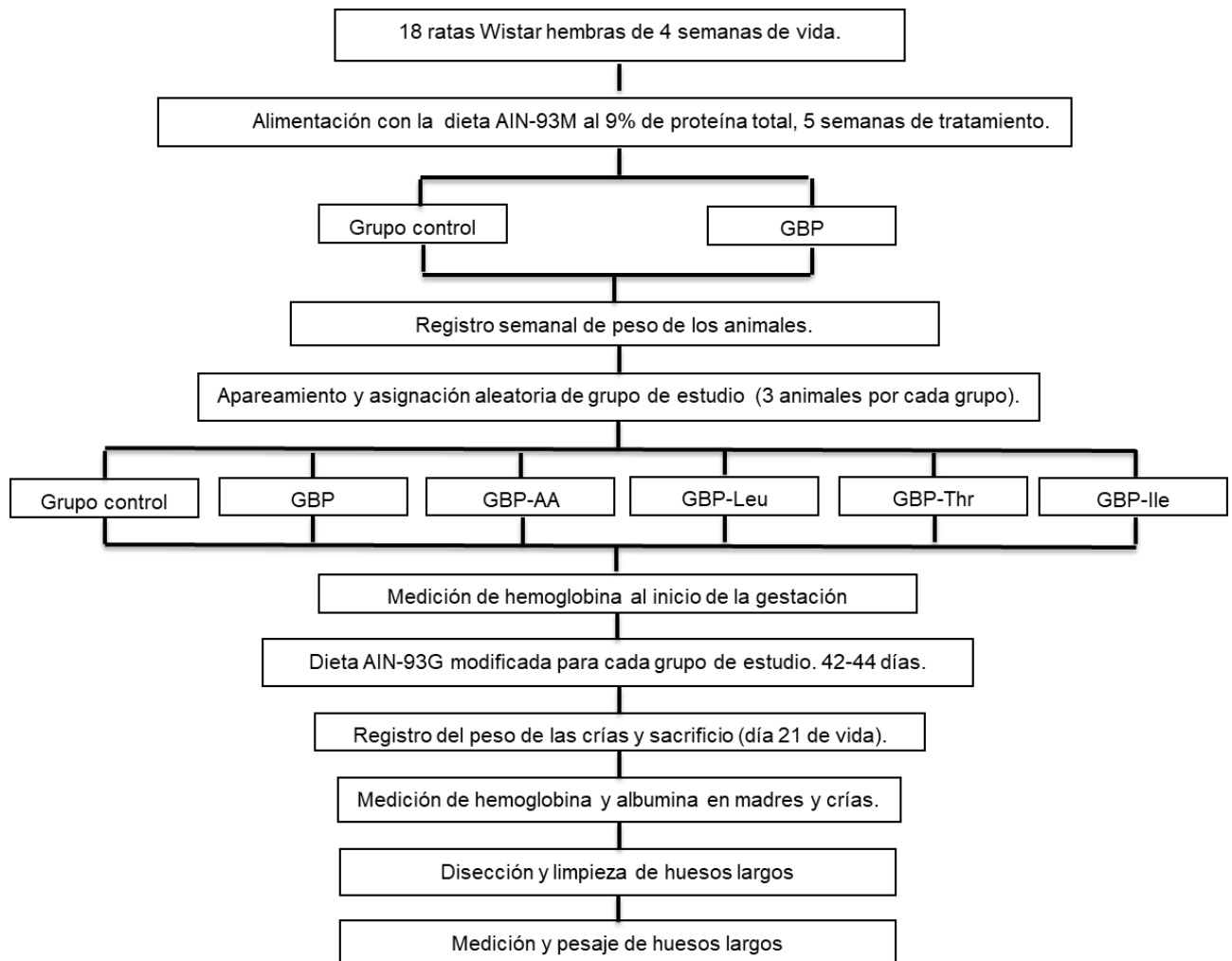


Figura 3. Diseño metodológico de ratas Wistar con suplementación de aminoácidos esenciales.

Se utilizaron 18 ratas Wistar hembras de 4 semana de gestación alimentadas con una dieta AIN-93M estándar para el grupo control (3 animales) y al 9% de proteína total, que corresponde al 64% del requerimiento diario, para el GBP (15 animales) durante 5 semanas, registrando el peso por semana; posterior a este periodo, se inició el apareamiento y la asignación de ratas para cada uno de los grupos de estudio (Grupo control, GBP, GBP-AA, GBP-Leu, GBP-Thr y GBP-Ile), Figura 3. 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 8% de proteína total que corresponde al 58% del requerimiento diario con la respectiva suplementación para cada GBP. Al término de la lactancia se registró el peso de las crías nacidas, posteriormente se sacrificaron, tomando una muestra de sangre para determinar hemoglobina y albúmina, estas mismas determinaciones se realizaron en la madres, se obtuvieron las patas traseras y delanteras para su disección y obtención de huesos largos, finalmente se midieron y pesaron cada uno de los huesos largos, Figura 3.

8.3 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 18 ratas Wistar hembra de 4 semanas de vida y 6 machos adultos.

8.4 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 y humedad y ciclos de luz/oscuridad 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. En función de la etapa experimental, los animales se alojaron en grupos de 3 animales (periodo de acondicionamiento) o de 2

animales (periodo de apareamiento) en cajas de acrílico, en forma individual se mantuvieron a las madres para las etapas de gestación y lactancia.

8.5 Dietas

Las dietas utilizadas fueron la AIN-93M y la AIN-93G para roedores (Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993), con modificaciones para cada grupo de estudio, en la Tabla 1 se muestra la composición de nutrientes de cada una de las dietas estándar.

El alimento fue elaborado de forma artesanal en el Laboratorio de Nutrición Molecular del ICSa-UAEH, tomando como referencia las dietas AIN-93M y AIN-93G, Tabla 2, 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 expuestas durante 5 semanas a una restricción de proteína, se les dio una dieta AIN-93M al 9% de proteína total, lo que representó el 64% de su requerimiento diario, para lograr un estado de depleción proteico antes de la gestación (PG); las hembras control no fueron expuestas a esta depleción proteica y consumieron la dieta estándar AIN-93M, Tabla 2.

Durante el periodo de gestación y la lactancia (PGL) se colocó 1 hembra en cada caja, quien fue alimentada de acuerdo al grupo de experimentación al que fue asignado, como se puede observar en la Tabla 2:

Tabla 1. Composición de nutrientes en la dieta AIN-93G y AIN-93M para roedores.

| Nutriente | Dieta g/kg | |
|----------------------------|------------|---------|
| | AIN-93G | AIN-93M |
| Energía total, <i>Kcal</i> | 3766 | 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 Linolenico, 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, 1993.

Tabla 2. Formulaciones de la dieta administrada durante el periodo de restricción proteica (AIN-93M), gestación y lactancia (AIN-93G) a ratas Wistar hembra.

| Ingredientes | Control | | GBP | | GBP-AA | GBP-Leu | GBP-Thr | GBP-Ile |
|----------------------|------------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|---------|
| | PG | PGL | PG | PGL | PGL | | | |
| | g/kg dieta | | | | | | | |
| Almidón de maíz | 465.7 | 397.5 | 515.7 | 517.5 | 517.5 | 517.5 | 517.5 | 517.5 |
| Caseína | 140 | 200 | 90 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| Dextrina | 155 | 132 | 155 | 132 | 132 | 132 | 132 | 132 |
| Sacarosa | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Aceite de soja | 40 | 70 | 40 | 70 | 70 | | 70 | 70 |
| Fibra | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Mix de minerales | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Mix de vitaminas | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| L-cistina | 1.8 | 3 | 1.8 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Bitartrato de colina | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Histidina | 3.3 | 4.6 | 3 | 4.2 | 7.3 | 24.6 | 10.7 | 13.6 |
| Isoleucina | 5.9 | 8.5 | 5.4 | 7.8 | 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. Tabla adaptada del artículo: Reeves, P.G. y colaboradores, 1993.

-
1. Dieta estándar AIN-93G (Grupo control).
 2. AIN-93G modificada al 8% de proteína total, grupo bajo en proteína (GBP).
 3. AIN-93G modificada al 8% 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. AIN-93G modificada al 8% de proteína total y 2 veces el requerimiento diario del aminoácido leucina (GBP-Leu).
 5. AIN-93G modificada al 8% de proteína total y 2 veces el requerimiento diario del aminoácido treonina (GBP-Thr).
 6. AIN93G modificada al 8% de proteína total y 2 veces el requerimiento diario del aminoácido isoleucina (GBP-Ile).

8.6 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.

8.7 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 6 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 asignado 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.

8.8 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 ocupó 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 2 y Tabla 3. 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 3. Aporte calórico por gramo de alimento para cada grupo de estudio.

| | | Kcal/g |
|---------|-----|--------|
| Control | PG | 3.95 |
| | PGL | 3.96 |
| GBP | PG | 3.88 |
| | PGL | 3.92 |
| GBP-AA | | 4.34 |
| GBP-Leu | PGL | 4.05 |
| GBP-Thr | | 4 |
| GBP-Ile | | 4.01 |

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

8.9 Sacrificio

Previo al inicio del sacrificio (8 horas antes) el alimento fue retirado a todos los animales, solo se dejó agua a todos los grupos, para tomar la muestra de sangre en condiciones post absorbidas. 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 centrifuga marca DRAGONLAB® DM0412, para obtener el suero, el cual fue congelado a -30 grados centígrados, posterior a esto, se procedió a la disección de tejido muscular y huesos largos.

8.10 Medición de albúmina y hemoglobina

Se midió hemoglobina en sangre de ratas Wistar para confirmar el estado de depleción proteica, se tomó una muestra de sangre capilar de la última porción de la cola, para determinar la concentración de hemoglobina, utilizando un fotómetro portátil (HemoCue®) según las recomendaciones del fabricante. Esta medición se llevó a cabo en dos momentos de la intervención, al inicio de la gestación (ratas madre) y al finalizar el periodo de lactancia (ratas madre y crías) para diagnosticar el nivel de hemoglobina basal y determinar los efectos de la suplementación. Utilizando valores de referencia de 11 a 13 ± 1 g/dL para las crías en el primer mes de vida y en las madre adultas de 13 ± 1 g/dL (Jacob Filho et al., 2018).

Se midió albúmina tomando una muestra de sangre en el sacrificio. Se colocó la muestra en un tubo Vacutainer y se mantuvo frío en una hielera hasta llegar al laboratorio. La sangre se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos para obtener el suero, en una centrifuga marca DRAGONLAB® DM0412. El suero se mantuvo en congelación hasta su análisis. Se determinó el nivel de albúmina en suero por un método colorimétrico, utilizando un *kit* de Wiener Lab®. En una microplaca se colocó 1 microlitro de suero y 250 microlitros de reactivo, se mezcló y se incubó entre 15° y 28°C durante 10 minutos, la microplaca se leyó en un lector de placas BioTek®, modelo 146583 de E.U.A a 625 nm. Para obtener la concentración de albúmina se utilizó la siguiente fórmula (Cétola, 2000):

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

La albúmina se midió en las ratas madre y sus crías al final de la intervención, utilizando 3.28 ± 0.48 g/dL como valor de referencia para las ratas madre (Valencia, 1990) y de 2.76 ± 0.3 g/dL para las crías (León, 2011).

8.11 Disección de huesos largos

Las crías de las madres alimentadas durante su gestación y lactancia con las dietas control, GBP, GBP-AA, GBP-Leu, GBP-Thr 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 4) se realizó cortando entre la cabeza del húmero y la cavidad glenoidea de la escápula. Posteriormente se separa la pata delantera entre los carpelos y el radio. El húmero, el radio y olécranon más el cúbito (OléCub), unidos fueron pesados con los músculos que lo recubren para obtener el peso total (Figura 5), 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 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 sacar la longitud entre la cabeza del húmero y el cóndilo del húmero y entre la cabeza del radio y el apófisis estiloides del radio.

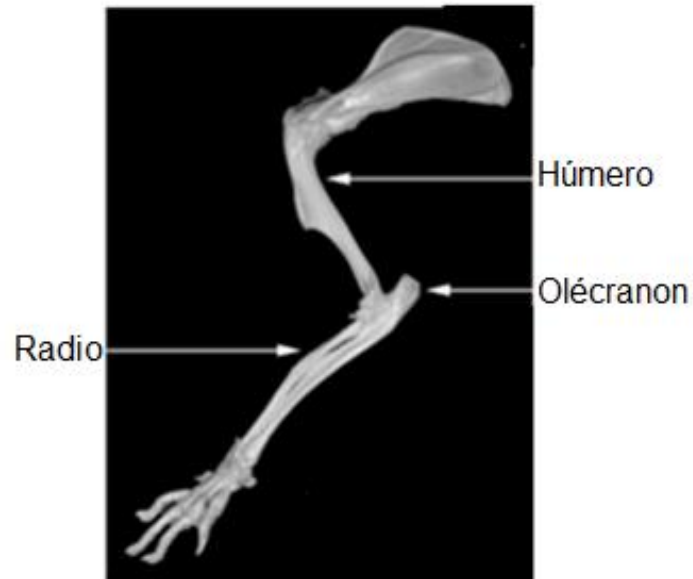


Figura 4. Imagen de huesos de pata delantera derecha de rata. Imagen tomada de: Atlas Sketal System, (Heithaus, 2010).

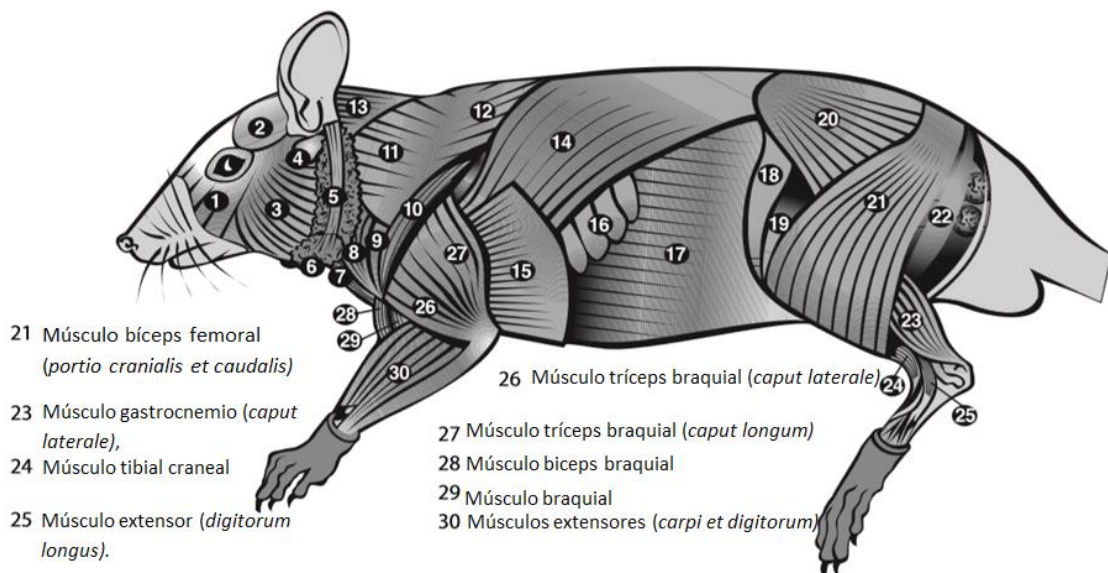


Figura 5. Imagen de los músculos superficiales de rata. Imagen tomada de: Gross Anatomy (Komarek, 2000).

La disección de la pata trasera (Figura 6) 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 5), 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.

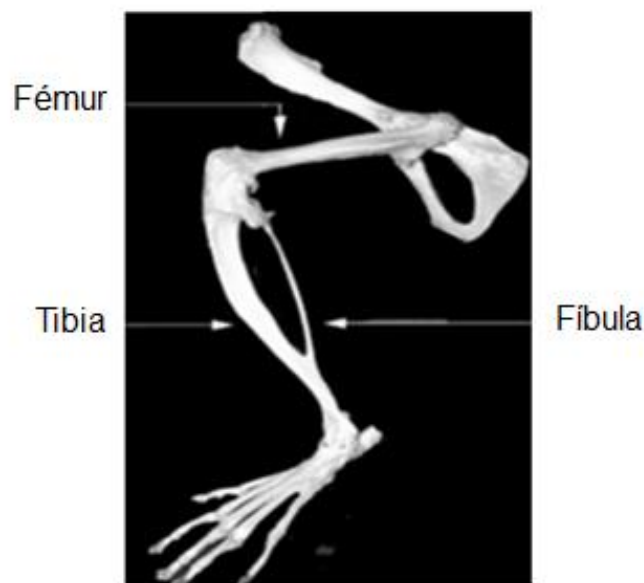


Figura 6. Imagen de huesos de pata trasera derecha de rata. Imagen tomada de: Atlas Sketal System, (Heithaus, 2010).

8.12 Análisis estadístico

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

8.13 Aspectos éticos

Este proyecto de investigación fue aprobado (Folio CIEQUAL-006-2018) por el CIEQUAL (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.

9. Resultados y Discusión

El peso de las ratas Wistar hembra a quienes se les sometió durante 5 semanas a una dieta de restricción proteica disminuyó a partir de la segunda y tercera semana ($p < 0.05$), sin diferencias de peso en la semana 4 y 5 de tratamiento. El peso promedio del grupo control fue menor al grupo bajo en proteína al inicio de la gestación (159.4 ± 5.3 g vs 169.1 ± 6.4 g, $p = 0.026$, respectivamente), Tabla 4.

Tabla 4. Cambios de peso (g) y hemoglobina en ratas Wistar hembra con una dieta de restricción proteica.

| Semana | Control | GBP | P |
|-----------|------------------|------------------|-------|
| 1 | 46.2 ± 1.0 | 44.7 ± 2.9 | 0.148 |
| 2 | 76.2 ± 2.1 | 68.1 ± 6.3 | 0.002 |
| 3 | 102.6 ± 7.6 | 93.2 ± 5.1 | 0.015 |
| 4 | 123.3 ± 10.5 | 117.6 ± 5.9 | 0.196 |
| 5 | 142.8 ± 9.8 | 141.0 ± 8.9 | 0.755 |
| IG | 159.4 ± 5.3 | 169.1 ± 6.4 | 0.026 |
| Hb (g/dL) | 18.1 ± 0.00 | 16.62 ± 0.95 | 0.001 |

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, IG= inicio de la gestación, p= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student.

En este trabajo las ratas Wistar hembra expuestas a una restricción proteica (8%) ganaron más peso con el mismo consumo de energía en comparación con el grupo control, esto se asoció a un mayor consumo de carbohidratos con una proporción menor de proteínas. Un estudio realizado en ratas Wistar, quienes consumieron una dieta baja en proteínas (6%) no registraron una ganancia de peso distinta al grupo control (20%), en sus crías la restricción proteica a temprana edad ocasionó depósitos de grasa abdominal aumentados y se relacionó con mayor peso en etapas posteriores (Alheiros-Lira et al., 2017). La evidencia indica que el consumo de una dieta con restricción proteica no afecta significativamente la ganancia de peso de ratas Wistar hembra.

El grupo de ratas con restricción proteica presentó en promedio 1.48 g/dL menor concentración de hemoglobina en comparación con el grupo control ($p=0.001$), Tabla 4. La patogénesis de la anemia inducida por deficiencia de proteína se debe a la ausencia de aminoácidos esenciales necesarios para la hematopoyesis (metionina), lo que disminuye la formación y maduración de eritroblastos, afectando principalmente la producción de hemoglobina, además, la deficiencia proteica induce aplasia intestinal lo que afecta la absorción y síntesis de vitaminas, en particular de la B₁₂ y ácido fólico; y ácido nicotínico, respectivamente, estas deficiencias contribuyen también a una menor síntesis de hemoglobina (Aschkenasy, 1957). En este trabajo se observó una menor concentración de hemoglobina para el grupo con restricción proteica (6%) en comparación con el grupo control (14% de proteína), esta disminución de hemoglobina en sangre se debió a la baja ingesta de proteínas y no de vitaminas y minerales, ya que de estos nutrimentos fueron provistos al 100% de su requerimiento.

La ingesta de energía durante las 5 semanas de restricción proteica fue semejante en el grupo bajo en proteína en comparación con el grupo control, excepto en la semana 4 donde la ingesta fue mayor en el grupo control ($p=0.025$), Tabla 5. El consumo de los dos grupos (GBP y grupo control) fue incrementando durante las 5 semanas de tratamiento, aproximadamente 50 g en la primer semana, 100 g en la segunda, 60 g en la tercera, y sin incrementos en la cuarta y quinta semana, Tabla 5. Estos resultados son semejantes a lo observado en ratas hembra expuestas a una restricción proteica (6%), las cuales consumieron la misma cantidad de alimento en comparación con el grupo control (20% de proteína) (Vickers, Breier, Cutfield, Hofman, & Gluckman, 2000).

Tabla 5. Ingesta de energía (Kcal) en ratas hembra Wistar con una dieta de restricción proteica.

| Semana | Control | GBP | p |
|--------|--------------|---------------|-------|
| 1 | 305.4 ± 9.9 | 311.6 ± 23.1 | 0.670 |
| 2 | 352.9 ± 21.8 | 364.2 ± 19.1 | 0.373 |
| 3 | 467.4 ± 72.4 | 520.8 ± 35.0 | 0.329 |
| 4 | 531.8 ± 15.2 | 467.4 ± 43.8 | 0.025 |
| 5 | 531.8 ± 15.2 | 524.5 ± 127.6 | 0.921 |
| Total | 437.9 ± 22.9 | 436.3 ± 26.2 | 0.93 |

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, p= representa un valor de probabilidad para la prueba t-Student.

El consumo de alimento y la ingesta de energía durante la gestación de ratas Wistar fue mayor en la segunda semana de gestación (día 14) para el grupo control, el GBP y el GBP-Leu en comparación con el GBP-AA, GBP-Thr y GBP-Ile, quienes consumieron la mayor cantidad de alimento (g) y energía en la tercera semana de gestación (día 21). El consumo total de alimento durante las 3 semanas de gestación fue mayor para el grupo control y GBP-Leu, en comparación con GBP-Thr y GBP-Ile (139.8 ± 0.7 g, 142.3 ± 2.7 g vs 119.7 ± 2.0 g, 128.3 ± 4.6 g, $p=0.001$, respectivamente), Tabla 6 y Tabla 6.1.

Durante la segunda y tercera semana de lactancia el GBP y el GBP-AA presentaron un consumo de alimento y energía semejantes (211.5 ± 1.5 g y 213.9 ± 8.0 g). El consumo total de alimento durante la gestación fue mayor para el GBP y el GBP-AA en comparación con el grupo control, GBP-Leu, GBP-Thr y GBP-Ile ($p=0.001$), Tabla 6 y Tabla 6.1.

La percepción del sabor de los aminoácidos esenciales en los animales es similar a la de los seres humanos, por ejemplo, el sabor dulce es similar a la sacarosa, el salado al cloruro de sodio (NaCl) y el sabor amargo al café (Bachmanov et al., 2016). Un estudio realizado sobre el sabor de los aminoácidos, menciona que la isoleucina y treonina son aminoácidos sin sabor, ya que tienen un equilibrio en su forma L y D y

para leucina tiene un sabor es amargo, aunque la concentración de los aminoácidos es una variable que interfiere en la percepción del sabor (Solms, 1969). Por lo que es posible que la ingesta menor de treonina e isoleucina observada en este estudio no se deba a la percepción del sabor, sino posiblemente a una mayor sensación de saciedad por el consumo aumentado de proteína. Existe evidencia que las ratas alimentadas con una dieta alta en proteína tienden a presentar una mayor saciedad, sin tener otros efectos perjudiciales en su alimentación (Bensaid et al., 2003).

Además del sabor, los mecanismos postingestivos también pueden intervenir en la elección y el consumo de alimentos, es decir, una vez que se ingieren los aminoácidos y sus metabolitos, estos pueden generar señales que afectan el apetito y la saciedad (Bachmanov et al., 2016). De acuerdo a lo observado en este trabajo el consumo de treonina e isoleucina pudieran haber generado una señalización de mayor saciedad en comparación con los demás aminoácidos, se ha descrito que la L-Leucina y la L-Isoleucina incrementan la secreción de colecistoquinina, lo que puede regular la ingesta de alimento a través de la señalización gastrointestinal (Tian, Heng, Song, Zhang, et al., 2019), esto incluso en dietas restringidas en proteína (Tian, Heng, Song, Shi, et al., 2019). El menor consumo de energía de las ratas alimentadas con treonina no parece estar relacionado con el sabor del aminoácido o con el efecto de saciedad relacionado con su consumo, de este último se ha reportado que la treonina no tiene efectos en los patrones de alimentación de ratas suplementadas (Ayaso, Ghattas, Abiad, & Obeid, 2014).

Tabla 6. Consumo de alimento e ingesta de energía en ratas Wistar hembra con una dieta de restricción proteica y suplementadas con 7 aminoácidos esenciales durante la gestación y lactancia

| Semanas | Control | | GBP | | GBP-AA | |
|---------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Alimento (g) | Energía (Kcal) | Alimento (g) | Energía (Kcal) | Alimento (g) | Energía (Kcal) |
| GeS1 | 142.5 ± 11.5 ^a | 564.2 ± 45.6 ¹ | 109.4 ± 2.5 ^b | 433.4 ± 9.7 ² | 107.9 ± 5.9 ^b | 468.6 ± 26.0 ² |
| GeS2 | 153.7 ± 11.7 | 608.7 ± 46.4 | 158.6 ± 3.2 ^a | 628.2 ± 12.8 ¹ | 136.9 ± 10.1 | 594.5 ± 43.4 |
| GeS3 | 123.4 ± 5.5 ^b | 489.1 ± 21.7 ² | 142.9 ± 5.0 | 566.2 ± 19.8 | 156.6 ± 0.9 ^a | 679.8 ± 3.78 ¹ |
| Total | 139.8 ± 0.7 ^a | 553.9 ± 3.1 ¹ | 137.0 ± 2.0 | 542.6 ± 8.0 | 133.9 ± 3.1 | 580.9 ± 13.6 |
| LacS1 | 147.2 ± 9.8 ^a | 582.9 ± 38.8 ¹ | 135.1 ± 7.3 | 543.8 ± 28.9 | 109.9 ± 10.8 ^b | 477.2 ± 46.8 |
| LacS2 | 154.9 ± 2.9 ^b | 614.3 ± 11.3 ² | 211.5 ± 1.5 | 837.4 ± 5.8 | 213.9 ± 8.0 ^a | 928.6 ± 49.2 ¹ |
| LacS3 | 206.4 ± 1.5 ^b | 817.6 ± 5.9 ² | 222.0 ± 2.0 ^a | 878.9 ± 8.1 ¹ | 212.5 ± 9.5 | 922.2 ± 58.2 |
| Total | 169.5 ± 2.7 ^b | 671.6 ± 10.2 ² | 189.5 ± 1.4 ^a | 750.4 ± 5.3 ¹ | 181.3 ± 9.0 | 786.7 ± 39.1 |

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-AA= grupo bajo en proteína suplementado con aminoácidos esenciales, GeS1= gestación semana 1, GeS2= gestación semana 2, GeS3= gestación semana 3, LacS1= lactancia semana 1, LacS2= lactancia semana 2, LacS3= lactancia semana 3. Letras y números distintos en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett. El símbolo (*) = p<0.05 para la ANOVA.

Tabla 6.1 Consumo de alimento e ingesta de energía en ratas Wistar hembra con una dieta de restricción proteica y suplementadas con leucina, treonina e isoleucina durante la gestación y lactancia. Continuación de Tabla 6.

| Semanas | GBP-Leu | | GBP-Thr | | GBP-Ile | |
|---------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Alimento (g) | Energía (Kcal) | Alimento (g) | Energía (Kcal) | Alimento (g) | Energía (Kcal) |
| GeS1 | 125.2 ± 1.8 | 506.9 ± 7.1 | 102.8 ± 3.9 ^b | 411.1 ± 15.8 ² | 117.3 ± 7.0 ^b | 470.5 ± 28.2 ² |
| GeS2 | 154.0 ± 8.7 | 623.7 ± 35.3 | 119.2 ± 6.9 ^b | 476.9 ± 6.9 ² | 124.3 ± 0.3 ^b | 498.6 ± 1.2 ² |
| GeS3 | 147.9 ± 0.9 ^b | 598.9 ± 3.5 ² | 137.3 ± 5.7 | 549.1 ± 23.0 | 143.1 ± 10.6 | 573.8 ± 42.5 |
| Total | 142.3 ± 2.7 | 576.5 ± 11.1 | 119.7 ± 2.0 ^b | 479.0 ± 8.0 ² | 128.3 ± 4.6 ^b | 514.3 ± 18.5 ² |
| LacS1 | 120.9 ± 6.9 | 498.7 ± 31.9 | 98.0 ± 12.3 ^b | 392.0 ± 49.0 ² | 101.2 ± 12.9 ^b | 405.9 ± 52.1 ² |
| LacS2 | 149.9 ± 7.2 ^b | 604.5 ± 29.3 ² | 142.9 ± 6.0 ^b | 590.8 ± 5.2 ² | 151.5 ± 1.5 ^b | 607.3 ± 5.8 ² |
| LacS3 | 112.0 ± 6.1 ^b | 453.6 ± 24.6 ² | 169.0 ± 1.7 ^b | 675.9 ± 6.9 ² | 177.3 ± 13.6 | 711.1 ± 54.4 |
| Total | 127.4 ± 5.1 ^b | 518.9 ± 19.3 ² | 136.6 ± 2.3 ^b | 552.9 ± 13.5 ² | 143.4 ± 8.3 ^b | 574.8 ± 33.2 ² |

GBP-Leu= grupo bajo en proteína suplementado con leucina, GBP-Thr= grupo bajo en proteína suplementado con treonina, GBP-Ile= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GeS1= gestación semana 1, GeS2= gestación semana 2, GeS3= gestación semana 3, LacS1= lactancia semana 1, LacS2= lactancia semana 2, LacS3= lactancia semana 3. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett. El símbolo (*) = p<0.05 para la ANOVA.

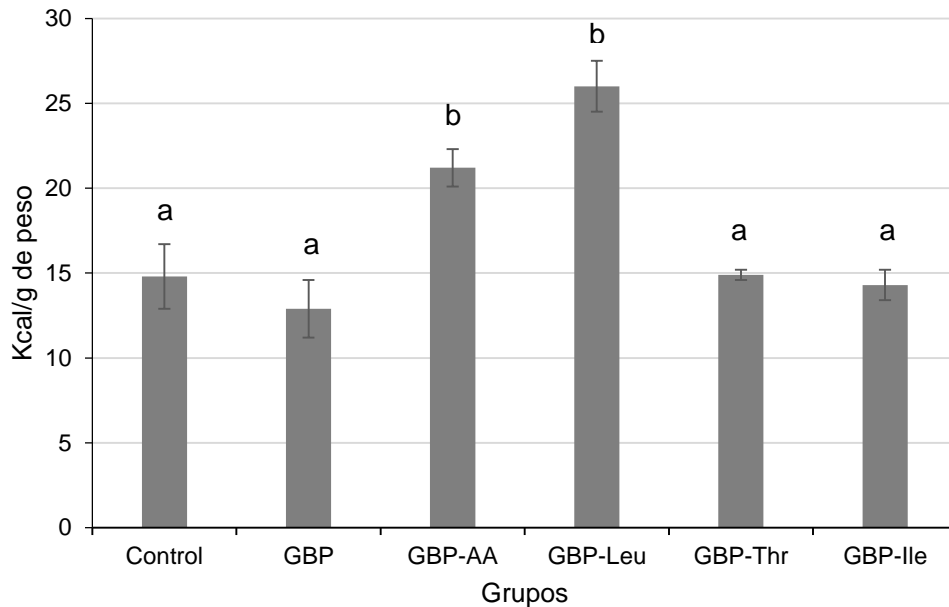


Figura 7. Ingesta de energía de las ratas Wistar durante la gestación.

GBP= grupo bajo en proteína, GBP-AA= grupo bajo en proteína suplementado con aminoácidos esenciales, GBP-Leu= grupo bajo en proteína suplementado con leucina, GBP-Thr= grupo bajo en proteína suplementado con treonina, GBP-Ile= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina. Kcal/g de peso= ingesta de energía por gramo de peso ganado durante la gestación. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett. El símbolo (*) = $p < 0.05$ para la ANOVA.

La ingesta de energía consumida por gramo de peso ganado durante la gestación de las ratas Wistar hembra fue mayor para el GBP-Leu y GBP-AA en comparación con el grupo control (26.0 ± 1.5 Kcal, 21.2 ± 1.1 Kcal, 14.8 ± 1.9 Kcal, $p=0.001$, respectivamente) y el resto de los grupos de estudio, Figura 7. El grupo de ratas hembra control, GBP, GBP-Thr y GBP-Ile tuvieron una ingesta de energía similar durante su gestación, Figura 7.

Las ratas gestantes suplementados con leucina (GBP-Leu) y un mix de aminoácidos esenciales (GBP-AA), registraron un mayor consumo de energía por gramo de peso ganado durante la gestación, sin embargo, la ganancia de peso total fue menor en comparación con el resto de los grupos de estudio. Existe evidencia de que los aminoácidos de cadena ramificada, específicamente la leucina, favorece la síntesis

de proteína muscular con el control de ganancia de peso y composición corporal (Layman, 2003). Un estudio realizado en ratas refiere que existe una interacción entre el aminoácido de cadena ramificada (leucina) y el metabolismo de la insulina y la glucosa, una dieta en leucina reduce la pérdida de tejido magro y aumenta la pérdida de grasa corporal (Layman & Walker, 2006). Por lo que a pesar que el consumo de energía fue mayor, este no favoreció la ganancia de peso en estos grupos de estudio, leucina y mix de aminoácidos.

La diferencia de peso ganado durante la gestación de ratas Wistar hembra fue mayor para el grupo control en la primera y segunda semana en comparación con el GBP-AA ($p=0.001$), Tabla 7. La diferencia total de peso ganado durante toda la gestación fue semejante entre el grupo control, GBP y GBP.Ile, pero mayor en comparación con el GBP-AA, GBP-Leu y GBP-Thr, ($p= 0.001$), Tabla 7.

El promedio de crías en ratas Wistar fue de 10.7 para el grupo control y el GBP en comparación con el resto de los grupos de estudio que oscilan entre 7 y 8 crías por camada, Tabla 7. La proteína en la dieta durante la gestación es necesaria para garantizar un depósito adecuado de proteínas en los tejidos maternos y fetales. Por tal razón en humano el requerimiento aumenta un 58% y en la rata Wistar un 70% durante la gestación. Un estudio realizado en ratas Wistar con restricción proteica (8 g) menciona que el número de crías se afecta por el déficit de proteínas (Gotardo, Dipe, Hueza, & Gorniak, 2017).

El porcentaje de sobrevida de las crías fue menor para el GBP (65.6%), seguido del GBP-AA, GBP-Leu, GBP-Thr y GBP-Ile en comparación con el grupo control que presentó el 100% de sobrevida, Tabla 7. En este trabajo los animales del GBP registraron el mismo número de crías que el grupo control, siendo menor para el resto de los grupos de estudio, sin embargo, la sobrevida de las crías fue menor para todos los grupos de estudio en comparación con el grupo control. Por lo que la restricción de proteínas en ratas gestantes si afecta el número de crías totales al destete (Gotardo et al., 2017).

Tabla 7. Diferencias de peso, ganancia de peso, hemoglobina, albúmina y supervivencia en ratas Wistar hembra durante la gestación y lactancia.

| | Control | GBP | GBP-AA | GBP-Leu | GBP-Thr | GBP-Ile | P |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
| DPGeS1 (g) | 12.8 ± 1.3 ^b | 17.1 ± 2.6 ^a | 10.5 ± 0.8 ^b | 3.7 ± 0.1 ^b | 6.5 ± 0.1 ^b | 13.0 ± 1.4 ^b | 0.001 |
| DPGeS2 (g) | 31.5 ± 0.2 ^a | 37.1 ± 3.1 | 25.3 ± 0.7 ^b | 30.9 ± 0.5 | 23.7 ± 0.5 ^b | 22.3 ± 1.7 ^b | 0.001 |
| DPGeS3 (g) | 50.4 ± 0.8 | 47.8 ± 0.8 | 41.2 ± 0.7 ^b | 35.4 ± 1.4 ^b | 52.8 ± 1.7 | 61.5 ± 1.0 ^a | 0.001 |
| Total (g) | 31.6 ± 0.7 ^a | 34.0 ± 0.4 ^b | 25.7 ± 0.4 ^b | 23.4 ± 0.3 ^b | 27.8 ± 0.7 ^b | 32.3 ± 0.8 | 0.001 |
| No. crías | 10.7 ± 1.1 | 10.7 ± 3.2 | 7.0 ± 1.7 | 7.7 ± 3.0 | 8.0 ± 3.6 | 8.6 ± 2.3 | 0.442 |
| GanPG (g) | 108.1 ± 14.3 | 123.6 ± 9.1 ^a | 78.5 ± 7.8 ^b | 74.2 ± 13.9 ^b | 84.1 ± 21.3 | 106.3 ± 4.8 | 0.004 |
| GanPcría (g/crías) | 10.2 ± 1.5 ^b | 10.3 ± 0.7 ^b | 9.9 ± 0.9 ^b | 9.5 ± 0.1 ^b | 9.7 ± 0.8 ^b | 14.8 ± 1.2 ^a | 0.001 |
| Hb (g/dL) | 19.7 ± 0.1 ^a | 16.4 ± 1.4 | 15.2 ± 0.7 ^b | 16.8 ± 1.1 | 14.6 ± 0.2 ^b | 16.7 ± 0.8 | 0.001 |
| Alb (mg/dL) | 4.2 ± 0.1 | 4.1 ± 0.3 | 3.7 ± 0.3 | 4.3 ± 0.4 | 3.9 ± 0.7 | 4.2 ± 0.1 | 0.098 |
| Sobrevivida (%) | 100 | 65.6 | 76.2 | 43.5 | 58.3 | 69.2 | |

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-AA= grupo bajo en proteína suplementado con aminoácidos esenciales, GBP-Leu= grupo bajo en proteína suplementado con leucina, GBP-Thr= grupo bajo en proteína suplementado con treonina, GBP-Ile= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, DPGeS1= diferencia de peso gestación semana 1, DPGeS2= diferencia de peso gestación semana 2, DPGeS3= diferencia de peso gestación semana 3, GanPG= ganancia de peso en la gestación, GanPcría= ganancia de peso por cría, Hb= hemoglobina al final de la lactancia, Alb= albúmina al final de la lactancia, 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.

La ganancia de peso total durante la gestación fue mayor para el GBP en comparación con el GBP-AA y GBP-Leu (123.6 ± 9.1 g vs 78.5 ± 7.8 g, 74.2 ± 13.9 g, $p=0.004$, respectivamente), Tabla 7. La ganancia de peso por cría fue de 14.8 ± 1.2 g para el GBP-Ile y en el grupo control que fue de 10.2 ± 1.5 g, Tabla 7.

Las ratas Wistar hembra del GBP-AA registraron en promedio 4.5 g/dL menos de hemoglobina en comparación con el grupo control ($p=0.001$), Tabla 7. La depleción proteica de las ratas gestantes tuvo efectos negativos en la concentración de hemoglobina, posiblemente por el incremento en la síntesis de eritrocitos y mayor volumen de sangre que demanda la gestación, que se cubrió en las ratas controles, pero no en las que tenían una dieta baja en proteína con o sin suplemento de algún aminoácido.

El peso de las crías de ratas Wistar hembra al término de la lactancia fue mayor para el grupo control y GBP-Ile en comparación con el GBP-AA (35.2 ± 1.7 g, 32.2 ± 2.7 g vs 20.1 ± 1.6 g, $p= 0.001$, respectivamente) y el resto de los grupos de estudio, Tabla 8 y Tabla 8.1. En este trabajo las crías de madres con restricción proteica presentaron un peso menor al término de la lactancia en comparación con el grupo control, a pesar de la suplementación de aminoácidos esenciales, con excepción de las crías de madres del GBP-Ile, en quienes el peso registrado fue similar al grupo control. Lo observado en las crías puede atribuirse a la restricción proteica durante la gestación y lactancia. La lactancia es un periodo crítico, ya que la calidad y cantidad de la leche determina el estado nutricional futuro de las crías (Gotardo et al., 2017). Un estudio realizado en ratas lactantes con restricción de proteína del 8% refiere que la condición nutricional de la madre influye en el peso corporal de su descendencia, además, también se observa una reducción en la producción de la leche debido a una disminuida síntesis de proteína en la glándula mamaria (Passos, 2000).

La concentración sérica de albúmina en las crías al día 21 de vida fue en promedio de 3.6 ± 0.2 mg/dL para el grupo control y 3.7 ± 0.2 mg/dL para el GBP-Ile, la concentración fue menor para el resto de los grupos de estudio ($p=0.001$), Tabla 8 y Tabla 8.1. Las crías de ratas con restricción proteica registraron una concentración

sérica de albúmina y hemoglobina menor, en comparación con el grupo control y GBP-Ile. La menor concentración de proteínas plasmáticas puede deberse a que una restricción proteica en la dieta trae consigo la reducción de la tasa de recambio del nitrógeno corporal, afectando la estructura y función de las células, tejidos y órganos, debido al aporte insuficiente de aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas estructurales y funcionales como la albúmina y la hemoglobina (González, 2013).

Un estudio realizado en ratas Wistar alimentadas al 75% del requerimiento de nutrientes, refiere que la restricción en el aporte de proteínas, provoca la disminución de valores séricos de las proteínas totales y albúmina, debido a que la albúmina es la principal proteína plasmática (González, 2013). Los resultados en este trabajo son similares al estudio anterior, ya que la concentración sérica de albúmina fue mayor para el grupo control y GBP-Ile, disminuyendo para el resto de los grupos de estudio con y sin suplementación de aminoácidos esenciales.

Como se indica en la Tabla 8 y Tabla 8.1, la concentración de albúmina fue mayor en la crías del GBP-Ile en comparación con el resto de las crías de los grupos bajos en proteína. 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 (Rothschild, Oratz, Mongelli, Fishman, & Schreiber, 1969). Por lo que la suplementación de isoleucina en el GBP-Ile se favoreció por el efecto positivo descrito para este aminoácido esencial.

Las crías del grupo control presentaron el nivel de hemoglobina más alto al día 21 de vida (11.2 ± 0.9 g/dL) en comparación con el GBP, GBP-AA, GBP-Leu, GBP-Thr y GBP-Ile ($p=0.001$), Tabla 8 y Tabla 8.1. En contraparte no se observaron diferencias significativas en la concentración de hemoglobina en las crías suplementadas con isoleucina, leucina, treonina y el mix de aminoácidos. Una limitada ingesta de proteínas es capaz de producir una baja cantidad de globina y por lo tanto de hemoglobina a pesar de que exista un consumo de hierro adecuado (Whipple & Robscheit-Robbins, 1942). Sea descrito que la suplementación de triptófano

incrementa la formación de hemoglobina (Sauberlich & Baumann, 1946), otros aminoácidos como la leucina, metionina y tirosina no tienen efectos positivos en la concentración de hemoglobina (Whipple & Robscheit-Robbins, 1940). Esto indica que la suplementación con aminoácidos tiene poco efecto en la síntesis de hemoglobina, siendo la ingesta total de proteínas el factor más importante.

Tabla 8. Peso, hemoglobina y albúmina de crías de ratas Wistar suplementadas con 7 aminoácidos esenciales al término de la lactancia.

| | Control | GBP | GBP-AA |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Pcrías (g) | 35.2 ± 1.7 ^a | 29.2 ± 2.6 ^b | 20.1 ± 1.6 ^b |
| Hb (g/dL) | 11.2 ± 0.9 ^a | 8.3 ± 0.8 ^b | 9.8 ± 1.1 ^b |
| Alb (mg/dL) | 3.6 ± 0.2 ^a | 2.8 ± 0.1 ^{bd} | 2.6 ± 0.3 ^{bd} |

Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-AA= grupo bajo en proteína suplementado con aminoácidos esenciales, Hb= hemoglobina al final de la lactancia, Alb= albúmina al final de la lactancia. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett.

Tabla 8.1 Peso, hemoglobina y albúmina de crías de ratas Wistar suplementadas leucina, treonina e isoleucina al término de la lactancia. Continuación Tabla 8.

| | GBP-Leu | GBP-Thr | GBP-Ile |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Pcrías (g) | 28.2 ± 1.6 ^b | 22.1 ± 4.5 ^b | 32.2 ± 2.7 |
| Hb (g/dL) | 9.4 ± 1.5 ^b | 6.9 ± 0.9 ^b | 8.6 ± 0.6 ^b |
| Alb (mg/dL) | 3.1 ± 0.3 ^{bd} | 3.0 ± 0.4 ^{bd} | 3.7 ± 0.2 ^{ac} |

GBP-Leu= grupo bajo en proteína suplementado con leucina, GBP-Thr= grupo bajo en proteína suplementado con treonina, GBP-Ile= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, Hb= hemoglobina al final de la lactancia, Alb= albúmina al final de la lactancia. Letras distintas en la misma línea representan diferencias estadísticas entre los grupos, prueba ANOVA, post-test de Bonferroni o T3 de Dunnett.

El peso y longitud promedio de los huesos largos de patas delanteras y traseras de crías de ratas Wistar hembra fue mayor para el grupo control, en comparación con el GBP y el resto de los grupos de estudio ($p=0.001$), Tabla 9. La proteína de la dieta es un nutriente esencial en la salud ósea afectándola de varias formas, al ser un componente de la estructura de la matriz del hueso regulando la concentración del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) y afectando el metabolismo del calcio (absorción) (Lorincz, Manske, & Zernicke, 2009); estas funciones explican la falta de crecimiento (peso y longitud) de los huesos largos de las crías de los grupos bajos en proteína, a pesar de tener una suplementación con aminoácidos esenciales.

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), GBP-AA, GBP-Thr y GBP-Leu, ($p=0.001$), Tabla 9. La longitud de los huesos 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), GBP-AA, GBP-Thr y GBP-Leu, ($p=0.001$), Tabla 9. Se ha publicado en otro estudio que los aminoácidos histidina, serina, tirosina, isoleucina, fenilalanina y lisina disminuyen significativamente en crías de ratas con restricción de proteínas (Fetoui, Mahjoubi-Samet, Guermazi, & Zeghal, 2008), sin embargo, existe poca evidencia de la suplementación con aminoácidos en el crecimiento de huesos largos en rata Wistar.

Estudios refieren que el tripéptido IPP (Isoleucina-Prolina-Prolina), mejora la expresión genética, aumentando la función y el número de osteoblastos, favoreciendo la formación y estructura de la masa ósea. El IPP contribuye positivamente en la masa mineral ósea (Huttunen, Pekkinen, Ahlstrom, & Lamberg-Allardt, 2007). De acuerdo con los resultados de este trabajo, el GBP-Ile presentó mayor peso y longitud de huesos largos en comparación con los otros grupos bajos en proteína, esto debido a la suplementación con isoleucina, a pesar de los efectos positivos obtenidos con la suplementación de isoleucina, estos no fueron suficientes para obtener resultados semejantes a los del grupo control.

Tabla 9. 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-Leu | GBP-Thr | GBP-Ile | p |
|---------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------|
| Húmero | | | | | | | |
| Peso (mg) | 19.6 ± 2.1 ^a | 14.4 ± 1.3 ^b | 10.4 ± 1.1 ^{bd} | 15.6 ± 1.7 ^b | 8.6 ± 2.7 ^{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} | 0.9 ± 0.04 ^{bd} | 0.99 ± 0.1 ^b | 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} | 10.7 ± 0.9 ^b | 6.8 ± 2.0 ^{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} | 1.3 ± 0.1 ^b | 1.2 ± 0.1 ^{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} | 5.0 ± 0.8 ^{bd} | 2.7 ± 0.9 ^{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} | 0.9 ± 0.1 ^{bd} | 0.9 ± 0.8 ^{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} | 19.7 ± 2.7 ^{bd} | 12.9 ± 2.7 ^{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} | 1.3 ± 0.1 ^{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} | 16.1 ± 2.9 ^{bd} | 9.6 ± 2.6 ^{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} | 0.9 ± 0.1 ^{bd} | 0.9 ± 0.7 ^{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-Leu= grupo bajo en proteína suplementado con leucina, GBP-Thr= grupo bajo en proteína suplementado con treonina, 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.

10. Conclusiones

1. La restricción de proteína durante el crecimiento y gestación en ratas Wistar hembra no tiene efectos en la ganancia de peso en comparación con ratas control.
2. La restricción de proteína durante el crecimiento y gestación en ratas Wistar hembra tiene efectos negativos en la concentración de hemoglobina, pero no en la albúmina sérica en comparación con las ratas control.
3. Las crías de ratas Wistar hembra con restricción proteica tienen menor peso al día 22 de vida en comparación con las crías del grupo control, independientemente de que sus madres hayan recibido una suplementación de aminoácidos esenciales durante la gestación y lactancia.
4. Las crías de ratas Wistar hembra con restricción proteica registraron una menor concentración de hemoglobina y albúmina sérica al día 22 de vida en comparación con las crías del grupo control. Con excepción del grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, quienes presentaron una concentración de albúmina sérica semejante al grupo control.
5. Se registró un menor peso y longitud de huesos largos de las patas delanteras y traseras de crías de rata Wistar con restricción proteica en comparación con las crías control. La suplementación con isoleucina durante la gestación y lactancia favoreció el peso y la longitud de estos huesos sin alcanzar los valores registrados por el grupo control.

Este estudio da lugar a la apertura de posibles nuevas investigaciones, considerándose de vital importancia, ya que se hace evidente que la suplementación con isoleucina favorece el crecimiento óseo en crías de ratas Wistar, sin embargo, para hacer esta afirmación en humanos, es necesaria su aplicación y evaluación correspondiente.

11. Referencias bibliográficas

- Alheiros-Lira, M. C., Jurema-Santos, G. C., da-Silva, H. T., da-Silva, A. C., Moreno Senna, S., Ferreira, E. S. W. T., . . . Leandro, C. G. (2017). Effects 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*, 117(6), 796-803. doi: 10.1017/S0007114517000708
- Aschkenasy, A. (1957). On the pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary protein deficiency. *Am J Clin Nutr*, 5(1), 14-25. doi: 10.1093/ajcn/5.1.14
- Ayaso, R., Ghattas, H., Abiad, M., & Obeid, O. (2014). Meal pattern of male rats maintained on amino acid supplemented diets: the effect of tryptophan, lysine, arginine, proline and threonine. *Nutrients*, 6(7), 2509-2522. doi: 10.3390/nu6072509
- Bachmanov, A. A., Bosak, N. P., Glendinning, J. I., Inoue, M., Li, X., Manita, S., . . . Beauchamp, G. K. (2016). Genetics of Amino Acid Taste and Appetite. *Adv Nutr*, 7(4), 806S-822S. doi: 10.3945/an.115.011270
- Bensaid, A., Tome, D., L'Heureux-Bourdon, D., Even, P., Gietzen, D., Morens, C., . . . Fromentin, G. (2003). A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol Behav*, 78(2), 311-320. doi: 10.1016/s0031-9384(02)00977-0
- Bhutta, Z. A., Das, J. K., Rizvi, A., Gaffey, M. F., Walker, N., Horton, S., . . . Child Nutrition Study, G. (2013). Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? *Lancet*, 382(9890), 452-477. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60996-4
- Bonjour, J. P., Rizzoli, R. . (2001). *Bone acquisition in adolescence*. San Diego: Academic Press
- Bonjour, J. P., Schurch, M. A., Chevalley, T., Ammann, P., & Rizzoli, R. (1997). Protein intake, IGF-1 and osteoporosis. *Osteoporos Int*, 7 Suppl 3, S36-42.

-
- Branca, F., & Ferrari, M. (2002). Impact of Micronutrient Deficiencies on Growth: The Stunting Syndrome. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 46(suppl 1)(Suppl. 1), 8-17.
- Burckhardt, P., Dawson-Hughes, B., Weaver, C. (2010). Dietary Protein and Bone Mass Accrual. In R. Rizzoli, Bonjour, J.P., Chevalley, T. (Ed.), *Nutritional Influences on Bone Health* (pp. 1-6). New York Springer.
- Calva, R. (2005). Factores que determinan el crecimiento. In R. Calva (Ed.), *Crecimiento, desarrollo y alimentación del niño* (pp. 44-46). México: McGraw Hill Interamericana.
- Calzada, R. (1998a). Bases neuroendocrinas del crecimiento In R. Calzada (Ed.), *Crecimiento del niño Fundamentos fisiopatológicos* (pp. 25-34). México McGraw-Hill Interamericana.
- Calzada, R. (1998). El crecimiento como fenómeno biológico. In R. Calzada (Ed.), *Crecimiento del niño Fundamentos fisiopatológicos* (pp. 8-9). México McGraw-Hill Interamericana
- Calzada, R. (1998b). Factores que modifican el crecimiento In R. Calzada (Ed.), *Crecimiento del niño Fundamentos Fisiopatológicos* (pp. 55-58). México: McGraw Hill Interamericana. .
- Carnauba, R. A., Baptistella, A. B., Paschoal, V., & Hubscher, G. H. (2017). Diet-Induced Low-Grade Metabolic Acidosis and Clinical Outcomes: A Review. *Nutrients*, 9(6). doi: 10.3390/nu9060538
- Cétola, V. (2000). Albúmina AA. Retrieved Marzo 2019, from http://www.wienerlab.com/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/albumina_aa_sp.pdf.
- Dolan, E., & Sale, C. (2018). Protein and bone health across the lifespan. *Proc Nutr Soc*, 1-11. doi: 10.1017/S0029665118001180

- Fetoui, H., Mahjoubi-Samet, A., Guerhazi, F., & Zeghal, N. (2008). Maternal low-protein diet affects bone mass and mineral metabolism in suckling rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 92(4), 448-455. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00733.x
- Frank Falkner, M. D., M.R., C.D. (1969a). Desarrollo Óseo In K. Rodahl (Ed.), *Desarrollo Humano* (pp. 594-596). Barcelona, España.: Human Development.
- Frank Falkner, M. D., M.R., C.D. (1969b). Genética del desarrollo humano In E. Hunt (Ed.), *Desarrollo Humano* (pp. 91-93). Barcelona, España Human Development.
- González, A., Velazco, L., Díaz-Canel, A., Cabrera, J. (2013). Modificaciones bioquímicas e inmunológicas en ratas desnutridas moderadamente *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 23:1, 9-20.
- Gotardo, A. T., Dipe, V. V., Hueza, I. M., & Gorniak, S. L. (2017). Maternal feed restriction during pregnancy in Wistar rats: Evaluation of offspring using classical and immunoteratology protocols. *Hum Exp Toxicol*, 36(6), 603-615. doi: 10.1177/0960327116660750
- Heaney, R. P. (2007). Bone health. *Am J Clin Nutr*, 85(1), 300S-303S. doi: 10.1093/ajcn/85.1.300S
- Heithaus, P. (2010). SKELETAL SYSTEM. Retrieved 12/10/2018, 2018, from <http://biology.kenyon.edu/courses/biol10/110pdfs/8skeleton.pdf>
- Hendrickx, G., Boudin, E., & Van Hul, W. (2015). A look behind the scenes: the risk and pathogenesis of primary osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol*, 11(8), 462-474. doi: 10.1038/nrrheum.2015.48
- Huttunen, M. M., Pekkinen, M., Ahlstrom, M. E., & Lamberg-Allardt, C. J. (2007). Effects of bioactive peptides isoleucine-proline-proline (IPP), valine-proline-proline (VPP) and leucine-lysine-proline (LKP) on gene expression of osteoblasts differentiated from human mesenchymal stem cells. *Br J Nutr*, 98(4), 780-788. doi: 10.1017/S0007114507744434

-
- Ibarra, L., Valdés, M. (2012). Microarquitectura ósea In M. Villegas, Solis, L. (Ed.), *OSTEOPOROSIS Prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación* (pp. 25-29). México: Trillas.
- Ilich, J. Z., & Kerstetter, J. E. (2000). Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *J Am Coll Nutr*, 19(6), 715-737.
- Insel, P., Turner, E., Ross, D. (2010). Proteins and amino acids: function follows form In E. Turner (Ed.), *Discovering Nutrition* (pp. 211-245). London: Jones & Bartlett Publishers.
- Jacob Filho, W., Lima, C. C., Paunksnis, M. R. R., Silva, A. A., Perilhao, M. S., Caldeira, M., . . . de Souza, R. R. (2018). Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Ageing Male*, 21(2), 145-148. doi: 10.1080/13685538.2017.1350156
- Kampman-van de Hoek, E., Jansman, A. J., van den Borne, J. J., van der Peet-Schwering, C. M., van Beers-Schreurs, H., & Gerrits, W. J. (2016). Dietary Amino Acid Deficiency Reduces the Utilization of Amino Acids for Growth in Growing Pigs after a Period of Poor Health. *J Nutr*, 146(1), 51-58. doi: 10.3945/jn.115.216044
- Kim, M. S., Wu, K. Y., Auyeung, V., Chen, Q., Gruppuso, P. A., & Phornphutkul, C. (2009). Leucine restriction inhibits chondrocyte proliferation and differentiation through mechanisms both dependent and independent of mTOR signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(6), E1374-1382. doi: 10.1152/ajpendo.91018.2008
- Komarek, V. (2000). *Gross Anatomy Anatomy* (pp. 257): Academiz Press.
- Lanham, S. A., Bertram, C., Cooper, C., & Oreffo, R. O. C. (2011). Animal models of maternal nutrition and altered offspring bone structure--bone development across the lifecourse. *European cells & materials*, 22.
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017
-

-
- Layman, D. K. (2003). The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr*, 133(1), 261S-267S. doi: 10.1093/jn/133.1.261S
- Layman, D. K., & Walker, D. A. (2006). Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr*, 136(1 Suppl), 319S-323S. doi: 10.1093/jn/136.1.319S
- Levitsky, M. (2018). Acid-base balance. In M. Levitsky (Ed.), *Pulmonary Physiology* (9th ed., pp. 179-205). London McGraw-Hill Education.
- Liao, X. H., Majithia, A., Huang, X., & Kimmel, A. R. (2008). Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino Acids*, 35(4), 761-770. doi: 10.1007/s00726-008-0100-3
- López, M., Izaguirre, I., Macias, C. (2013). Conceptos básicos del crecimiento y maduración In M. López (Ed.), *Crecimiento y Maduración Física. Bases para el diagnóstico y seguimiento clínico* (pp. 3-6). Venezuela Medica Panamericana
- Lorincz, C., Manske, S. L., & Zernicke, R. (2009). Bone health: part 1, nutrition. *Sports Health*, 1(3), 253-260. doi: 10.1177/1941738109334213
- Lv, C., Liu, S., Xia, J., Xu, L., Cheng, Y., Li, W., . . . Hao, L. (2019). The Mechanism of Dietary Protein Modulation of Bone Metabolism via Alterations in Members of the GH/IGF Axis. *Curr Protein Pept Sci*, 20(2), 115-124. doi: 10.2174/1389203719666180514143828
- MacDonell, R., Hamrick, M. W., & Isales, C. M. (2016). Protein/amino-acid modulation of bone cell function. *Bonekey Rep*, 5, 827. doi: 10.1038/bonekey.2016.58
- Mangano, K. M., Walsh, S. J., Kenny, A. M., Insogna, K. L., & Kerstetter, J. E. (2014). Dietary acid load is associated with lower bone mineral density in men with low intake of dietary calcium. *J Bone Miner Res*, 29(2), 500-506. doi: 10.1002/jbmr.2053
-




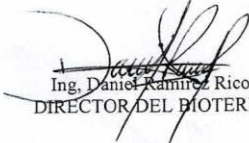
-
- Martínez, R., & Palma, A. (2015). *Cerrando la brecha. Modelo para estimar el costo de erradicar la desnutrición crónica y las deficiencias de micronutrientes*. Santiago, Chile: CEPAL/PMA.
- Oliveira, C., Meneguz-Moreno, R., Aguiar-Oliveira, M., & Barreto-Filho, J. (2011). Rol Emergente del Eje GH/IGF-I en el Control Cardiometabólico. *Arq Bras Cardiol*, 97(5), 434-439.
- Passos, M. C., Ramos, C. . (2000). Short and long effects of malnutrition in rats during lactation on body weight of offspring. *Nutrition Research*, 20(11), 1603-1612.
- Recker, R. R., Davies, K. M., Hinders, S. M., Heaney, R. P., Stegman, M. R., & Kimmel, D. B. (1992). Bone gain in young adult women. *JAMA*, 268(17), 2403-2408.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C., Jr. (1993). 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*, 123(11), 1939-1951. doi: 10.1093/jn/123.11.1939
- Rothschild, M. A., Oratz, M., Mongelli, J., Fishman, L., & Schreiber, S. S. (1969). Amino acid regulation of albumin synthesis. *J Nutr*, 98(4), 395-403. doi: 10.1093/jn/98.4.395
- Sauberlich, H. E., & Baumann, C. A. (1946). The effect of dietary protein upon amino acid excretion by rats and mice. *J Biol Chem*, 166(2), 417-428.
- Saxton, R. A., Knockenhauer, K. E., Wolfson, R. L., Chantranupong, L., Pacold, M. E., Wang, T., . . . Sabatini, D. M. (2016). Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science*, 351(6268), 53-58. doi: 10.1126/science.aad2087
- Semba, R. D., Shardell, M., Sakr Ashour, F. A., Moaddel, R., Trehan, I., Maleta, K. M., . . . Manary, M. J. (2016). Child Stunting is Associated with Low Circulating

-
- Essential Amino Acids. *EBioMedicine*, 6, 246-252. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.030
- Solms, J. (1969). [The taste of amino acids, peptides and proteins]. *Int Z Vitaminforsch*, 39(3), 320-322.
- Thacher, T. D., Aliu, O., Griffin, I. J., Pam, S. D., O'Brien, K. O., Imade, G. E., & Abrams, S. A. (2009). Meals and dephytinization affect calcium and zinc absorption in Nigerian children with rickets. *J Nutr*, 139(5), 926-932. doi: 10.3945/jn.108.101030
- Tian, M., Heng, J., Song, H., Shi, K., Lin, X., Chen, F., . . . Zhang, S. (2019). Dietary Branched-Chain Amino Acids Regulate Food Intake Partly through Intestinal and Hypothalamic Amino Acid Receptors in Piglets. *J Agric Food Chem*, 67(24), 6809-6818. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02381
- Tian, M., Heng, J., Song, H., Zhang, Y., Chen, F., Guan, W., & Zhang, S. (2019). Branched chain amino acids stimulate gut satiety hormone cholecystokinin secretion through activation of the umami taste receptor T1R1/T1R3 using an in vitro porcine jejunum model. *Food Funct*, 10(6), 3356-3367. doi: 10.1039/c9fo00228f
- Valencia, C. d. I. H. G. d. (1990). Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata Parte 2. *Research in Surgery*, 12-20.
- Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., & Gluckman, P. D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(1), E83-87. doi: 10.1152/ajpendo.2000.279.1.E83
- Waterlow, J. C. (1996). *Malnutrición proteico-energética. Alteraciones Metabólicas*: Organización Panamericana de la Salud.
- Whipple, G. H., & Robscheit-Robbins, F. S. (1940). Amino Acids and Hemoglobin Production in Anemia. *J Exp Med*, 71(4), 569-583. doi: 10.1084/jem.71.4.569
-

-
- Whipple, G. H., & Robscheit-Robbins, F. S. (1942). Hemoglobin Production Factors in the Human Liver : Anemias, Hypoproteinemia, Cirrhosis, Pigment Abnormalities, and Pregancy. *J Exp Med*, 76(3), 283-298. doi: 10.1084/jem.76.3.283
- W. H. O. (2015). Levels and Trends in Child Malnutrition. Retrieved 28/09, 2018, from [http://www.who.int/nutgrowthdb/jme_brochure2015.pdf?ua=1]
- W. H. O. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]. Retrieved 28/09/2018, 2018, from <http://www.who.int/iris/handle/10665/39142>
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0

12. Anexos

12.1 Anexo 1: Dictamen de aprobación del CIECUAL.

| |
|--|
|  <p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO COORDINACIÓN ACADÉMICA DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS DIRECCIÓN DEL BIOTERIO COMITÉ INTERNO DE ÉTICA</p>   |
| <p style="text-align: center;">DICTAMEN DE EVALUACIÓN</p> <p style="text-align: center;">DICTAMEN DE EVALUACIÓN</p> |
| <p style="text-align: right;">San Agustín Tlaxiaca, Hgo. a 06 de diciembre del 2018</p> <p>Estimada Dra. Guadalupe López Rodríguez.</p> <p>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 Aprobado, por lo que queda registrado con el Folio CIECUAL/006/2018.</p> <p>Sin más otro particular, aprovechamos la ocasión deseándole el mejor de los éxitos en su proyecto.</p> <p style="text-align: center;">ATENTAMENTE "AMOR, ORDEN y PROGRESO"</p> <p> Dr Luis Delgado Olivares PRESIDENTE DEL CIECUAL</p> <p> Ing. Daniel Ramírez Rico DIRECTOR DEL BIOTERIO</p> |