

# El Desarrollo Histológico del Tejido Óseo en carencia de Riboflavina

MSc Juana Rosa Delgadillo Avila<sup>1</sup>;

Asesores: MSc DMO Guido Ayala Macedo<sup>2</sup>; MSc Justiniano Sotomayor<sup>3</sup>

RESUMEN

El Presente Trabajo de Investigación tuvo como objetivo determinar los cambios Histológicos que ocurren en el fémur y en la mandíbula de la progenie de ratas albinas durante la gestación y la lactancia hasta los 28 días de edad sometidas con dietas de diferentes concentraciones de Riboflavina (B<sub>2</sub>).

Se conformaron 4 grupos de ratas albinas raza Holtzman con capacidad de reproducción y según el requerimiento de Riboflavina: Grupo A (100% de B<sub>2</sub>), Grupo B (50% de B<sub>2</sub>), Grupo C (25% de B<sub>2</sub>) y Grupo D (0% de B<sub>2</sub>). Las crías de las ratas de cada grupo fueron sacrificadas a los 0, 7, 14, 21, y 28 días y se sometieron a un estudio histológico en tinción H.E. y Masson.

Los resultados obtenidos muestran que la deficiencia o la carencia total de B<sub>2</sub>, ocasiona alteraciones en el crecimiento y desarrollo de las ratas crías, manifestándose una menor talla y disminución del peso corporal y microscópicamente revela: que la carencia total de Riboflavina (0%) en la dieta materna ocasiona en el tejido óseo de las crías (Fémur y mandíbula) una población celular menor de osteocitos, osteoblastos, osteoclastos y muy escasa cantidad de fibras colágenas en la matriz ósea, notándose dicha diferencia más marcada a partir de los 7 días en adelante.

**Palabras clave:** Nutrición, Riboflavina, Tejido óseo.

ABSTRACT

The investigation aim is determining the histological changes which appear in the femur and the jaw of the albino rats offspring during the gestation and the nursing, until the 28 days of age having different riboflavin concentrations in the diet.

It was conformed four groups of Holtzman albinos rats with reproductions capacity, according to the demand of riboflavin: Group A (100% of B<sub>2</sub>), Group B (50% of B<sub>2</sub>), Group C (25% of B<sub>2</sub>) and Group D (0% of B<sub>2</sub>). The rats offspring of each group were extracted and sacrificed at the 0, 7, 14, 21 and 28 days from the birth. Then they were submitted a histological studying with Eosin Hematoxylin and Masson Stains.

The deficiency or total lack of B<sub>2</sub>, produced alterations in the offspring growth and development. The obtained results showed: small light and diminution of the corporal weight, and microscopically reveals: for total lack of Riboflavin in the diet (0%), presented reduction on the cellular populations of osteocytes, osteoblastes and osteoclasses and a scare quantify of collagen fibers. That difference is more notorious from the 7 days of age.

**Key words:** Nutrition, Riboflavin, tejido osseous

## INTRODUCCIÓN

La Riboflavina es un nutriente esencial que mantiene las funciones del metabolismo en condiciones normales, actuando como cofactor de reacciones enzimáticas, principalmente en el sistema de transporte de electrones relacionado con la conversión de las oxidaciones de sustratos en energía utilizable.

La B<sub>2</sub> está presente en los tejidos de los mamíferos bajo las formas de Flavín Mononucleótido (FMN) y flavin Adenin Dinucleótido (FAD) actuando como parte de las enzimas denominadas flavoproteínas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas.

Estudios realizados, sobre deficiencia de Riboflavina en humanos manifiestan síntomas como debilidad, fatiga, dolor y sensibilidad en la boca; sensación de quemazón y prurito en los ojos. (21). En la deficiencia más avanzada ocasiona rigidez en la comisura labial y alteraciones en la piel, queilosis, estomatitis angular así como lesiones oculares (10) En animales de experimentación produce alteraciones: en el crecimiento, alopecia, alteraciones de la visión, de la mucosa, malformaciones y en muchos casos sangrados que puede llevar a la muerte. (1,3,4,5,15,16,18, 20,23,25,27,28)

En el Perú, en Zonas Económicamente deprimidas de la costa, sierra (2,6,7,9,17) donde la prevalencia de la desnutrición es alta, la Riboflavina también es baja y sería otro factor que produce alteración sobre el crecimiento y desarrollo del humano.

El Objetivo del Estudio es conocer que sucede con el desarrollo y crecimiento del tejido óseo en animales de experimentación sometidos a dietas con deficiencia o

<sup>1</sup> Profesora del Dpto. Académico de Ciencias Básicas. Facultad de Odontología, UNMSM

<sup>2</sup> Profesor principal Dedicación Exclusiva. Facultad de Medicina. UNMSM.

<sup>3</sup> Profesor. Coordinador del Dpto., Académico de Ciencias Básicas. Facultad Odontología UNMSM

ausencia de Riboflavina desde la gestación hasta el final del destete.

Para cumplir con el objetivo, se realizó estudios histológicos en fémur y mandíbula de ratas desde la etapa fetal hasta los 28 días de edad, contando para esto con técnicas histológicas adecuadas y con un diseño estadístico de acuerdo a los objetivos del estudio. Además se complementó el estudio con la toma de peso y talla corporal de las crías, longitud y grosor de la mandíbula y fémur.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Población y Muestra:** El experimento se llevó a cabo en ratas albinas de raza holtzman. La muestra estuvo constituida inicialmente por 16 ratas hembras con capacidad de reproducción y 4 machos de 3 a 4 meses de edad, con un peso promedio de 235 gr aproximadamente. El trabajo se realizó en el:

- Bioterio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la U.N.M.S.M.;
- El Laboratorio de Histología del Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M.

\* **Metodología:** se desarrollo en 4 fases:

### I) Fase pre-experimental:

- a- Pre-embarazo: selección de 20 ratas holtzman: 16 hembras y 4 machos de 3 a 4 meses de edad
- b- Apareamiento: se colocaron las ratas en jaulas individuales durante 3 a 4 días, 4 hembras por cada macho.
- c- Embarazo: diagnóstico de preñez mediante la presencia de espermatozoides en el tapón vaginal.

**II) Fase Experimental:** Las ratas preñadas previamente codificadas, se ubicaron al azar en jaulas individuales para ser sometidas a la dieta experimental durante la gestación y lactancia. En cada jaula se mantuvo una ración de 100 gramos de dieta (cuadro N°1). Se controló el consumo de dieta, el peso de las ratas madres, así como, de las crías después del nacimiento cada 2 días durante toda la fase experimental.

### III) Fase de Análisis Histológico:

- a- **Recolección de las muestras quirúrgicas:** Se extrajeron al azar 3 ratas para ser sacrificadas a los 0,7,14,21 y 28 días, de acuerdo al tiempo de nacidas, haciendo un total de 60 crías. Después del sacrificio se obtuvo las muestras óseas para su estudio.
- b- **Preparación de cortes Histológicos:** Las muestras de

la región mandibular y el fémur, fueron disecadas para ser descalcificadas, luego se utilizó la coloración de Hematoxilina Eosina (H.E.) para la observación de la población celular (osteocitos, osteoblastos, osteoclastos) y con tricromico de masón para observar fibras colágenas.

- c- **Análisis histológico:** La observación fue posible mediante el uso del microscopio de luz a diferentes aumentos (10x,40x,100x) y el ocular micrométrico dentro de una área de 6,400 micras para la cuantificación celular y la cantidad de fibras colágenas.

### IV) Fase de Análisis Estadístico:

El análisis estadístico de acuerdo a las variables de los datos se realizó utilizando:

- ANAVA para diseños fijos y balanceados con 2 factores: para ver el comportamiento de las medias y las interacciones de los conjuntos(A-B-C-D).
- ANAVA para diseños fijos y balanceado con un factor: contiene prueba de medias de varios grupos, prueba DMS, ANAVA para determinar el mejor polinomio de ajuste de un conjunto de datos, prueba F para probar homogeneidad de varianzas. (14,19).

## RESULTADOS

La información se obtuvo del examen estructural de 140 cortes histológicos de un número igual de bloques de los cuales 60 correspondieron a tejido óseo mandibular, 60 a tejido óseo de fémur y 20 a fibras colágenas.

Los bloques quirúrgicos fueron obtenidos de 60 ratas crías que conformaron los subgrupos de 3 ratas que fueron sacrificadas durante los 0, 7,14, 21 y 28 días.

**Fase Pre-experimental:** No se observó ninguna variación entre los grupos experimentales, siendo el comportamiento similar en todos los grupos.

**Fase Experimental:** Se observaron diferencias en la apariencia física (pelo, piel, tejido ocular) así como en la talla, peso corporal, longitud y grosor de mandíbula y fémur. Fotos N° 1 y 2.

**Fase de Análisis Histológico:** El análisis histológico de los cortes longitudinales y transversales del fémur y de mandíbula demostraron que la dieta de 100% de B<sub>2</sub> y 50% de B<sub>2</sub> (Grupos A-B) poseen un trabeculado óseo de grosor variable con una abundante población celular de osteocitos, osteoblastos y osteoclastos. Predominio de tejido óseo maduro sobre tejido osteoide y una mayor presencia de fibras colágenas que tiñen fuertemente la matriz ósea.

Con la dieta 25% y 0 % de B<sub>2</sub> se observa un trabeculado óseo delgado, con predominio de tejido

osteóide sobre tejido óseo maduro; poca población de osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, y escasa

presencia de fibras colágenas durante todo el experimento. Foto N° 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14.

**CUADRO N° 1:**  
**DIFERENTES DIETAS UTILIZADAS PARA ALIMENTAR LAS RATAS ALBINAS MADRES,**  
**SEGÚN DISEÑO EXPERIMENTAL**

GRUPOS				
	A	B	C	D
<b>NUTRIENTES</b>				
	<b>DIETAS(100g)</b>			
Cascina (g)	10	10	10	10
Metionina (g)	0.3	0.3	0.3	0.3
Mezcla de Minerales (g)	4.0	4.0	4.0	4.0
Celulosa (g)	2.0	2.0	2.0	2.0
Almidón (g)	72.7	72.7	72.7	72.7
Aceite (ml)	10.9	10.9	10.9	10.9
Mezcla de Vitaminas (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
Riboflavina (mg)	0.6	0.3	0.15	0.0
Vitamina E (mg)	20	20	20	20

**CUADRO N° 2:**  
**GRUPO DE ANIMALES SEGÚN DISEÑO EXPERIMENTAL**

APAREAMIENTO	GESTACION	PERIODOS DE ESTUDIO				
		LACTACION			DESTETE	POS- DESTETE
20 RATAS 16 HEMBRAS 4 MACHOS	A 100% B2 (4H) →	A-1 (3)	A-2 (3)	A-3 (3)	A-4 (3)	A-5 (3)
	B 50% B2(4H) H →	B-1 (3)	B-2 (3)	B-3 (3)	B-4 (3)	B-5 (3)
	C 25% B2(4H) →	C-1 (3)	C-2 (3)	C-3 (3)	C-4 (3)	C-5 (3)
	D 0% B2(4H) . →	D-1 (3)	D-2 (3)	D-3 (3)	D-4 (3)	D-5 (3)
← 21 días		0 días	7 días	14 días	21 días	28 días

( ) = nº de animales estudiados

H: Hembras



Foto 1

Crías de 14 días de nacidas con diferentes concentraciones de B<sub>2</sub>.

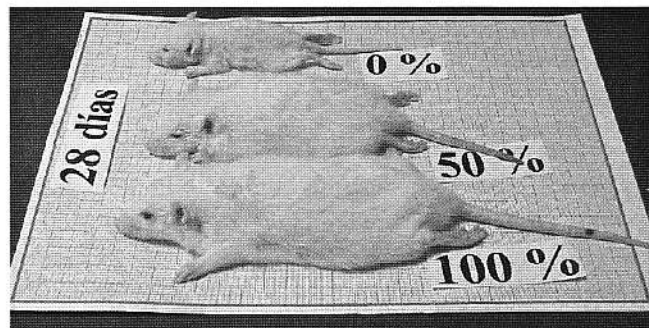


Foto 2

Crías de 28 días de nacidas con diferentes concentraciones de B<sub>2</sub>.

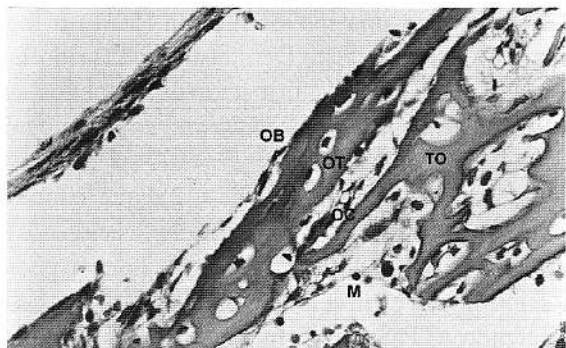


Foto 3

Mandíbula 100% de B<sub>2</sub> a los 0 días

A mayor aumento 40X se aprecia trabeculado óseo con tejido osteoide (TO) y una mayor población de osteocitos (OT). Osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC). Se observa cavidades medulares con células mesenquimales (M).

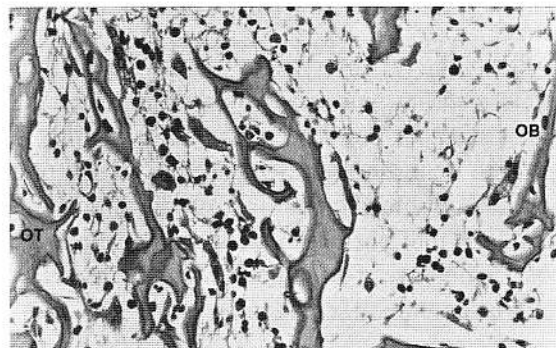


Foto 4

Mandíbula con 0% de B<sub>2</sub> a los 0 días

Corte longitudinal de mandíbula (40X) con escasa presencia de osteocitos (OT) poca actividad de osteoblastos (OB) y osteoclastos



Foto 5

Fémur con 100% de B<sub>2</sub> a los 14 días

Se aprecia trabeculado óseo amplio (40X) con clara diferencia de tejido osteoide de tejido óseo maduro. Hay mayor presencia de osteocitos (OT), moderada de osteoblastos (OB) y escaso osteoclastos (OC)

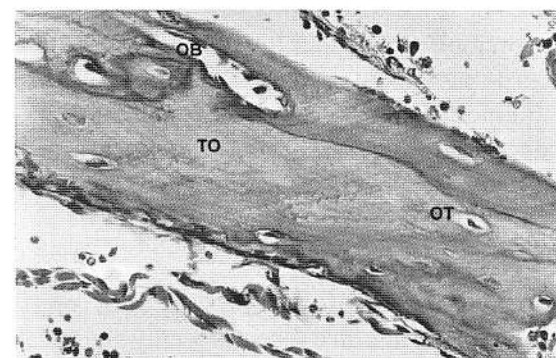


Foto 6

Fémur con 0% de B<sub>2</sub> a los 14 días

Corte longitudinal (40X) donde se aprecia trabecula ósea con predominio de tejido osteoide (TO), con escasa población de osteocito (OT), poca actividad de osteoblastos (OB)

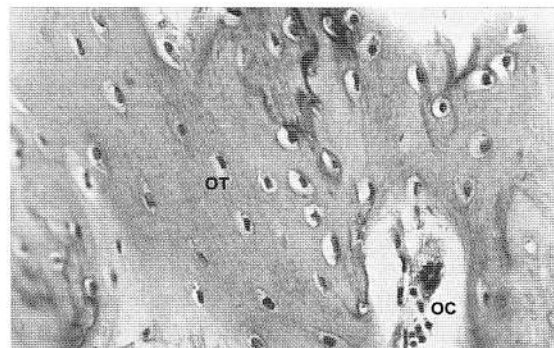


Foto 7

Mandíbula con 100% de B<sub>2</sub> a los 21 días

En corte longitudinal (40X) se observa trabecula amplia con presencia de tejido osteoide entre tejido óseo maduro, con una mayor población de osteocitos (OT). Un osteoclasto (OC) en la laguna de Howsping.

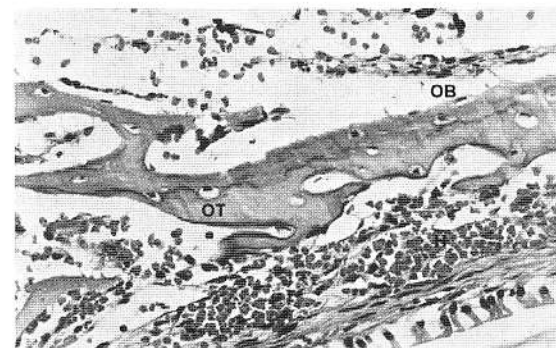


Foto 8

Mandíbula con 0% de B<sub>2</sub> a los 21 días

Se aprecia trabecula ósea delgada (40X) con predominio de tejido osteoide sobre tejido óseo maduro, escasa presencia de osteocitos (OT) y poca actividad osteoblástica (OB). Tejido medular con células de tipo hemopoyetico (H).

## DISCUSIÓN

El presente Estudio demuestra el efecto de la deficiencia o carencia de Riboflavina en la dieta de las ratas gestantes sobre el crecimiento y desarrollo del tejido óseo de las crías, comprobándose que existen modificaciones celulares en relación al número de células y a la cantidad de fibras colágenas presentes en la matriz ósea. Estas alteraciones pueden manifestarse por un retardo y cese de crecimiento corporal; así como otros defectos de apariencia física como: alopecia, alteraciones cutáneas, degeneración del tejido ocular. (5, 11, 20, 22).

En el estudio se observó que las crías del Grupo D (0% de  $B_2$ ) manifiestan un severo retardo en el crecimiento y lesiones cutáneas con respecto al grupo control (100% de  $B_2$ ). Esto demuestra el efecto negativo que tiene la carencia de  $B_2$  sobre el crecimiento de los animales. Las lesiones de la piel por deficiencia de  $B_2$  según Prasad (21) podrían deberse al déficit de FMN que interviene en el entrecruzamiento del colágeno.

### Peso

El peso corporal obtenido en las ratas del experimento concuerda con los obtenidos por Patterson y Bates (22) quienes encontraron que los pesos de las ratas con deficiencia de  $B_2$  mantienen diferencias significativas menores, con el grupo control que contiene dieta de  $B_2$  en proporciones adecuadas a sus requerimientos. El aumento de peso en los grupos con 50% y 100% de  $B_2$  es probablemente por el acumulo de grasa corporal (lipogénesis activa) que se observó durante el sacrificio. Esto no ocurrió en los animales con 0% de  $B_2$ .

### Longitud

La longitud corporal de los Grupos de ratas con 100%, 50% y 25% de  $B_2$  fueron diferentes y muy significativas con respecto al Grupo 0% de  $B_2$ . Observándose la diferencia a partir del día 14. Estos resultados pueden ser corroborados por los trabajos de Prasad, quien manifiesta que la falta de crecimiento longitudinal de los huesos en dietas carentes de  $B_2$  tiene una explicación a nivel molecular, especialmente durante la formación estructural de las fibras colágenas producidos por los osteoblastos, provocando un déficit de fosfato de piridoxal el cual requiere de FMN para su diferenciación(21). Otra causa sería la falta de ATP para sintetizar las fibras colágenas, los mucopolisacáridos y las glucoproteínas. Además, las flavinas también intervienen en el transporte de hidrogeno para la respiración y formar energía (ATP); este proceso no se cumple adecuadamente, entonces la placa de crecimiento de los huesos se detienen ante la falta de energía. Los estudios histológicos en las ratas con deficiencia de  $B_2$  corroboran esta explicación, manifestándose con disminución de la población celular.

(osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) así como, cantidad de fibras colágenas, predominando el tejido Osteoide en el Grupo con 0% de  $B_2$  al ser comparado con el grupo Control. A (100% de  $B_2$ ).

### Osteocitos

La foto N° 4, muestra el efecto que tienen la carencia de riboflavina en la dieta sobre el número de osteocitos. Apreciamos que a una menor ingesta de  $B_2$  (25%) o ausencia (0%) de  $B_2$ , hay un número menor de osteocitos en el hueso mandibular y el fémur comparado al tejido de los animales con una mayor ingesta (50%) o ingesta normal (100%) de  $B_2$ . Esto Demuestra que la riboflavina tiene importancia sobre la formación de osteocitos a nivel de las células osteoblasticas que segregan la matriz ósea. Además, los osteoblastos sintetizan colágenas, proteoglucanos y glucoproteínas (13), que también se ven afectado en deficiencia de  $B_2$ . La explicación nos la da los estudios de Salomón(24), que dice, la función principal de la Riboflavina en la célula es en la respiración celular, produciendo ATP. Si hay deficiencia de  $B_2$  se limitaría la síntesis de energía para la formación de fibras colágenas, proteoglucanos y glucoproteínas.

### Osteoblastos

Son significativos los efectos observados sobre los osteoblastos en el hueso mandibular y el fémur. Durante el embarazo se induce la formación de proteínas captadoras de riboflavina en la rata(20); estas proteínas captadoras intervienen en la transferencia trasplacentaria de riboflavina favoreciendo un mayor aporte al feto(8). La Captación de  $B_2$  durante la vida fetal condicionaría la capacidad de histodiferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos. Al respecto los estudios de Enesco y Leblond(12) sobre crecimiento celular de tejidos en la rata, permiten distinguir tres etapas del crecimiento tisular: a) fase inicial de hiperplasia b) fase de hiperplasia-hipertrofia y c) fase final de hipertrofia celular.

En nuestro Estudio una ingesta normal de  $B_2$  en la rata madre durante el embarazo, provoca que las ratas crías tengan un número normal de osteoblastos a diferencia de las crías con dieta de 25% o ausente de  $B_2$  (0%) donde es menor el número de células. La carencia de riboflavina influye en la disminución del número de osteoblastos porque limita el proceso de división celular en las células osteoprogenitoras(mesenquimales) impidiendo su histodiferenciación. La deficiencia de  $B_2$  influye también en la calidad de componentes orgánicos segregados por los osteoblastos (colágena, glucoproteinas, proteoglucanos), donde se observa un mayor predominio de tejido osteoide (inmaduro) en la matriz ósea de ratas con dieta 0% de  $B_2$  (foto N° 9 y 10). También se puede observar cambios ligeros en el tamaño celular.

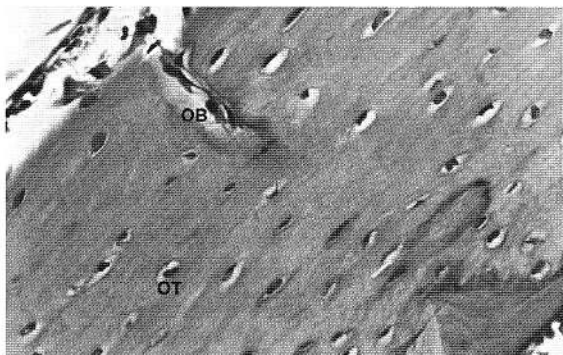


Foto 9

**Mandíbula con 100% de B<sub>2</sub> a los 28 días**

Se observa amplia trabecula ósea (40X) con un mayor predominio de tejido ósea maduro, una mayor población de osteocitos (OT). Alrededor de la trabecula actividad osteoblástica (OB) y la diferencia histológica de osteoblasto en osteocito.



Foto 10

**Mandíbula con 0% de B<sub>2</sub> a los 28 días**

Se aprecia trabeculado óseo (40X) con predominio de tejido osteoide sobre tejido óseo maduro. Escasa presencia de osteocitos (OT). Se observa la capa interna osteogéna.

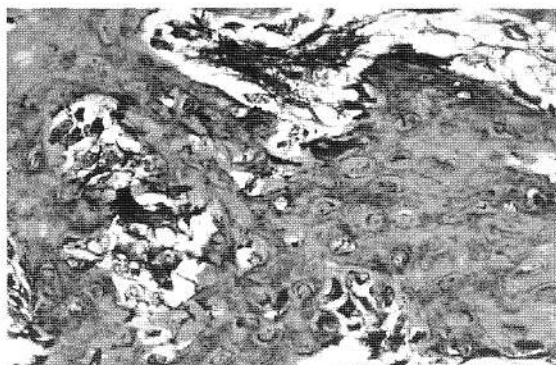


Foto 11

**Mandíbula con 100% de B<sub>2</sub> a los 21 días**

Se aprecia trabecula ósea (40X) con abundantes manojos de fibras colágenas (FC) que tiñen fuertemente la matriz ósea, rodeando tejido medular rico en célula mesenquimal

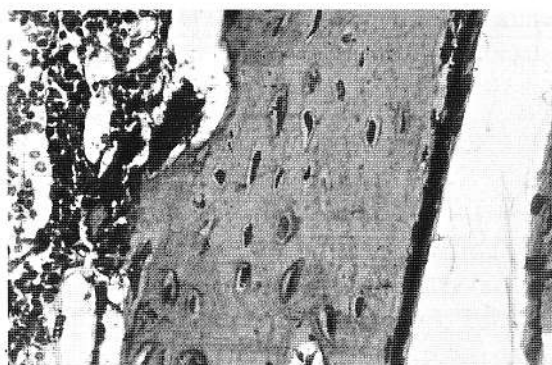


Foto 12

**Mandíbula con 0% de B<sub>2</sub> a los 21 días**

Se observa trabecula ósea con escasa presencia de fibras colágenas, dispersas entre la matriz ósea que la tiñen débilmente. Se aprecia tejido medular con población de eritrocitos

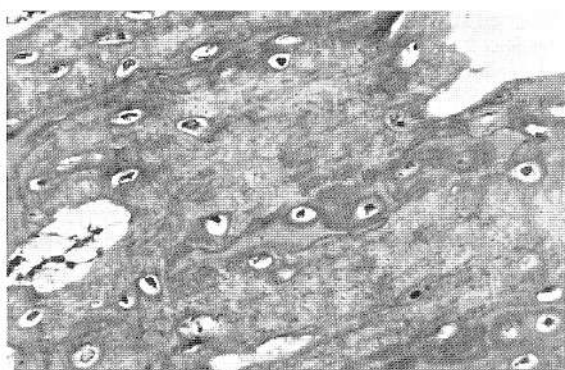


Foto 13

**Fémur con 100% de B<sub>2</sub> a los 21 días**

Corte Longitudinal a la altura del cartilago de crecimiento se aprecia trabecula ósea cuya matriz posee abundante presencia de fibras colágenas.

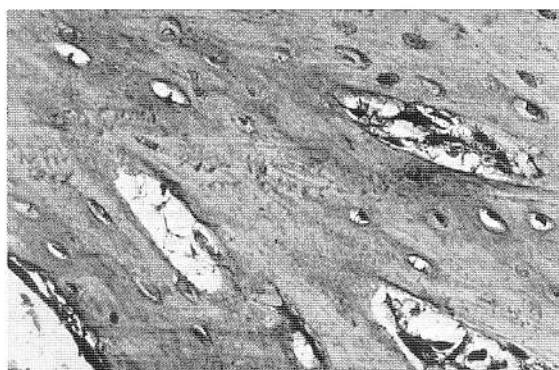


Foto 14

**Fémur con 0% de B<sub>2</sub> a los 21 días**

Se aprecia trabeculado óseo con escasas fibras colágenas que tiñen desigualmente la matriz ósea.

## Osteoclastos

Los osteoclastos cuya actividad celular esta relacionado con la reabsorción ósea, se observan que los grupos de ratas con dietas cuyas concentraciones bajas de B<sub>2</sub> (0% y 25%) tienden a incrementar en el número de osteoclastos a partir del día 21, con el fin de compensar el número escaso de células en el momento del nacimiento y hay una demora en realizar remodelación ósea a través de su actividad osteoclástica en etapas posteriores.

## Fibras colágenas

El estudio nos muestra que las ratas que ingirieron dieta de B<sub>2</sub> normal(100%) durante la gestación y lactancia afectan sobre las crías, presentando un paquete de fibras colágenas en la matriz ósea mucho más organizada y en mayor cantidad comparadas a las ratas que ingirieron menor B<sub>2</sub>. Las células productoras de colágena (osteoblastos) sintetizan fibras colágenas para construir la matriz ósea, observándose que la cantidad de fibras colágenas esta íntimamente relacionada con la concentración de B<sub>2</sub> consumido por la rata madre durante la gestación y lactancia.

## CONCLUSIONES

- 1) La carencia (0% de B<sub>2</sub>) o deficiencia (25%-50% de B<sub>2</sub>) en la dieta materna durante la gestación y lactancia en las ratas, produce en las crías reducción en la población celular de osteocitos, osteoblastos, osteoclastos y fibras colágenas del tejido óseo mandibular y el fémur al ser comparados con ratas que se alimentan con dietas con concentraciones adecuadas de Riboflavina. La Diferenciación es mas marcada a partir de los 7 días pos-natal.
- 2) La deficiencia parcial de Riboflavina (25%) en la dieta materna ocasiona una población celular menor de osteocitos, osteoblastos, osteoclastos y escasa cantidad de fibras colágenas en la matriz ósea de fémur y mandíbula comparada al grupo de ratas que consumieron B<sub>2</sub> de acuerdo a sus requerimientos.
- 3) La deficiencia parcial de Riboflavina (50%) en la dieta materna ocasiona una reducción moderada poco significativa de osteocitos, osteoblastos, osteoclastos y de fibras colágenas comparadas al grupo de ratas que consumieron B<sub>2</sub> de acuerdo a sus requerimientos (100%).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Anderson L.M.V; M. Dibble; E. Turkki; H. Mitchell. (1987): Nutrición y Dieta de Cooper. Traducción José Pecina Hernández. Decimoséptima Edición. Editorial Interamericana. México ,151-153.
2. Ayala, G.; W. Vilchez (1996) Las repercusiones de los Periodos agrícolas y los Pisos agro ecológicos del ande Peruano, sobre el consumo de alimentos y estado nutricional de la población. Empresa Científica Mundi. 1era Edición. Lima Perú.
3. Bates C.; A. Prentice, P. Sutcliffe (1981) Deficiency status in Gambian pregnant and lactating woman and its implication for recommended dietary allowances. *Am J. Clin. Nutr.* 34:928-935.
4. Bates C. J. (1987) Human riboflavin requirements, and metabolic consequences of deficiency in man and animals. *World Rev. Nutr. Diet* 50:215-265.
5. Campodonico C.(1997) La Riboflavina en el crecimiento óseo de ratas albinas. Facultad de odontología. U.N.M.S.M. Tesis para optar el grado de Magister.
6. Castillo G. (1991): Informe Practicas Pre-profesionales de Nutrición aplicada en la comunidad campesina de Barrio Alto Matucana-Huachichirí-Lima. Escuela Académico Profesional de Nutrición. Facultad de Nutrición. UNMSM
7. Cuadri T. La Serna L. (1991) Situación Nutricional en niños menores de 5años de A.H. Sarpento Lores y la Asociación de vivienda Villa Mercedes-San Juan de Luiganchos-Lima. Escuela académico profesional de nutrición. UNMSM.
8. Dancis J.; J. Lechanka and M. Levitz (1988) Placental transport of Riboflavin differential rates of Uptake at maternal and fetal surfaces of the perfused human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158: 204-210.
9. Dávila R., J.Sánchez (1987): Informe de prácticas Pre-profesionales de Nutrición aplicada en comunidades Campesinas de Luquina Grande y Apopata. Escuela Académico Profesional de Nutrición. UNMSM
10. Donald's MC. L.(1993): Nutrición y sus trastornos. Traducción Eliza Cuzenado Tapia. 2da Edición. Editora Manuel Moderno S.A. de C.U. México D.F. Santa fe de Bogotá. pp2.
11. Duerden J, C Bates (1985) of Riboflavin deficiency en lipid metabolism of liver on brown adipose tissue of suckling rat pups. *Br.J. Nutr.* 53: 107- 115.
12. Enesco y Leblond CP. (1962) Increase in cell number as factor in grow of the organs and tissues of the young male rat. *J. Embryol. Exp. Morph.* 10: 530-562.
13. Gardner LP, L.J. Hiatt. (1997) Histología, Texto y Atlas. Traducción De Santiago Sapita. Renard. Primera Edición en Español. MC Graw- Hill Interamericana. Pág. 119-135.
14. Kerlinger A. (1982) Investigación del comportamiento. Técnicas y Metodología 2da Edición Traducido al Español por Dr. Rafael Blengio. José Carmen Pecina. Nueva Editorial Interamericana. México D.F. Pág. 50-63, 424-436
15. Leminger A. (1978) Bioquímica. Traducido por Fernando Calvet Prats. 2da Edición. Editora Omega s. A. Barcelona España. Pp. 341-501.
16. López R., J. Schwartz, J. Cooperman. (1980): Riboflavin deficiency in an adolescent Population in New York City *Am J. Clin. Nutr.* 33:1283-1286.
17. Medina P.; M. Vera (1991) Estudio alimentario Nutricional del Caserío de Cashacoto Huancabamba Región Grau-Piura. EAPN-FN-UNMSM.
18. Merrill BW., JA Froehlich, and D.B. MC. Curmick. (1979): Purification of Riboflavin-binding. Proteins from bovine plasma and discovery of a pregnancy- specific Riboflavin binding. *J. Biol. Chem.*, 254: 9362-9364.
19. Montgomery De. (1991) Diseño y Análisis de Experimentos. Traducido por lic. Jaime Delgado Saldívar. Grupo Editorial Ibero América S.A. México D.F. pag. 45-52
20. Muniyappa K. And PR. Adiga (1980) Isolation and characterization of a Riboflavin- Binding Protein from pregnant-rat Serum *Biochem J.* 186: 537-540.
21. Prasad R, Lakshmi A, V. Hanji. MS. (1983): Impaired collagen maturity in Vitamina B2 y deficiency. Probable Molecular bases of skin lesions. *BiochemMed.* 30:333-341.
22. Patterson B., C Bates (1989): Riboflavin deficiency, metabolic rat and brown adipose tissue function in suckling and weaning rats. *Br. J. Nutr.* 61: 475-483.
23. Rivlin RS. Conocimientos Actuales sobre Nutrición (1997) ILSI (Instituto Internacional de Ciencias de la vida) Editado por Ekard E. Ziegler y L.J. Filer. Traducido por la OPS Washington E.V.A. pag 177-182.
24. Salomón EP, Ca. Villee, PM. Davis (1987) Biología Trad. Ramón Efrizando Mata. Filito. Interamericana 1era Edición México. Pp. 208-220.
25. Sauberlich, H.E. (1984): Implications of nutritional status on human biochemistry, physiology and health. *Clin Biochem.* 17:132-142.
26. Shafer W. G., BM. Levy (1989) Tratado de Patología Bueal. Traduc. María de Lourdes Hernandez. Edit. Interamericana. 4ta Edición. Mexico. pp: 676-677.
27. Visweswariah S. S. and Adiga (1987): Purification of a circulatory Riboflavin carrier protein from pregnant bonnet monkey (M. Radiata). Comparison with chicken egg. *Vitamin Carrier Biochim Biophys. Acta* 915:141-148.
28. Wada y, I Kondo, C. Takura (1996): Perinheral Neuropathy on dietary Riboflavin deficiency in racing pigeons. *Kamikawa Livestach hygiene service center Asahikawa, Japon Feb.* 58 (2):161-3.