



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA  
E EN DIETAS DE RANAS TORO (*LITHOBATES  
CATESBEIANUS*) EN ETAPA LARVARIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

**CAROLINA OCAÑA MENDOZA**

Asesores:

**MVZ Drc MPA Carlos Gutiérrez Olvera**  
**Mtra en DO MVZ Alheli Tatiana Lugo García**



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A todos los animales de laboratorio utilizados en investigación y enseñanza,  
gracias a los cuales hemos logrado ser mejores profesionistas.*



*“El sol es débil cuando  
se eleva primero, y  
cobra fuerza y coraje a  
medida que avanza el  
día”. Charles Dickens*

## AGRADECIMIENTO



A Sharon, por convencerme de hacer tesis,  
A mis padres, por darme ánimos todos los días,  
A Pablo, por acompañarme y aconsejarme con amor,  
A Martha, por apoyarme en lo que estaba en sus manos,  
A Betsy y Gilberto, por liberarme del estrés de vez en cuando,  
A la demás gente y amigos, que aportaron su granito de arena en mi trabajo.

# CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
2.1. Ranicultura en México y el mundo .....	2
2.2. Generalidades de la rana toro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ).....	4
2.2.1. Clasificación taxonómica.....	6
2.2.2. Distribución y hábitat.....	7
2.2.3. Ciclo de vida de rana toro .....	7
2.2.3.1. Metamorfosis .....	10
2.2.4. Alimentación .....	12
2.2.4.1. Antioxidantes .....	14
2.2.4.1.1. Vitamina E .....	15
2.3. Estrés oxidativo.....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
5.1. Objetivo general .....	20
5.2. Objetivos específicos .....	20
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
6.1. Primer periodo .....	21
6.1.1. Colecta de muestras .....	21
6.1.2. Análisis de laboratorio.....	21
6.1.2.1. Análisis químico proximal.....	21
6.1.2.2. Extracción de vitamina E.....	22
6.1.3. Procedimiento en la elaboración de las dietas .....	23
6.2. Segundo periodo.....	24
6.2.1. Procedencia de los organismos .....	24
6.2.2. Sujetos de estudio.....	24
6.2.3. Ubicación de la fase experimental.....	25
6.2.4. Diseño experimental .....	25
6.2.5. Alojamiento de los organismos.....	26
6.2.6. Alimentación .....	28
6.2.7. Biometrías y pesaje.....	28
6.2.8. Análisis estadístico.....	29

<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
7.1. Análisis Químico Proximal.....	30
7.2. Extracción y cuantificación de vitamina E.....	30
7.3. Peso.....	32
7.4. Longitud total .....	33
7.5. Índice de masa corporal .....	34
7.6. Tasa de metamorfosis.....	35
7.7. Mortalidad total y mortalidad en la metamorfosis.....	35
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	<b>44</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de rana. Mostrando en el eje horizontal los años del 2006 al 2012 y en el eje vertical las toneladas de cada país en ese año (FAO, 2009; citado por SENASICA, 2016).	3
Figura 2. Producción nacional acuícola de rana toro en kilogramos, por diferentes estados y entidades mexicanas, en el 2017 (SENASICA, 2021; citado por CONAPESCA, 2017).	3
Figura 3. <i>Lithobates catesbeianus</i> . A y B: adultos con diferentes coloraciones; C: sub adulto; D: renacuajo (CAR, 2018)	5
Figura 4. Ciclo de vida, fases de desarrollo zootécnico de <i>Lithobates catesbeianus</i> . Imagen hecha por Carolina Ocaña.	9
Figura 5. Estructura de los isómeros de la Vitamina E (Sánchez, 2016).	15
Figura 6. Representación de alberca de plástico inflable, con capacidad de 400 litro y 4 termostatos en el piso de la alberca	26
Figura 7. Representación de bloque con 5 envases; cada envase con una capacidad de un litro de agua, donde se contendrá a un individuo experimental, 5 individuos por bloque	27
Figura 8. Distribución de los sujetos de experimento por tratamiento e identificación numérica	27
Figura 9. Curva de calibración de vitamina E	31
Figura 10. Cromatograma de la mezcla estándar de $\alpha$ -tocoferol. Eje horizontal, tiempo en minutos; eje vertical, mili-unidades de absorbancia (mAU).	31
Figura 11. Cromatograma de las muestras de alimento para tilapia. Eje horizontal, tiempo en minutos; eje vertical, mili-unidades de absorbancia (mAU).	31
Figura 12. Ganancia de peso promedio (en gramos) por grupo experimental, a lo largo del experimento. Mediciones en el día 0, 22, 37, 50, 57, 72 y 87 (eje horizontal). Grupo 1 representa el control, grupo 2 representa el grupo con dosis	

media de vitamina E y el grupo 3 representa el grupo con dosis alta de vitamina E. \_\_\_\_\_33

Figura 13. Longitud total promedio por grupo experimental, a lo largo del experimento. Mediciones en el día 0, 22, 37, 50, 57, 72 y 87 (eje horizontal). Grupo 1 representa el control, grupo 2 representa el grupo con dosis media de vitamina E y el grupo 3 representa el grupo con dosis alta de vitamina E. \_\_\_\_34

Figura 14. Índice de masa corporal promedio por grupo experimental, a lo largo del experimento. Mediciones en el día 0, 22, 37, 50, 57, 72 y 87 (eje horizontal). Grupo 1 representa el control, grupo 2 representa el grupo con dosis media de vitamina E y el grupo 3 representa el grupo con dosis alta de vitamina E. \_\_\_\_35



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de rana toro, de acuerdo con IUCN (2009). _____	6
Cuadro 2. Problemas más comunes de los renacuajos, su causa y su solución (Tegnofrog,1995; citado por Castro, 2001). _____	9
Cuadro 3. Características de los principales eventos de la metamorfosis en renacuajos de rana toro (Flores, 1999; citado por Castro, 2001) _____	11
Cuadro 4. Niveles recomendados de vitamina E (Mantenimientos para adultos) _____	23
Cuadro 5. Factores de conversión de las fuentes de vitamina E, Bioequivalencias. (Instituto Linus Pauling, 2015). _____	24
Cuadro 6. Análisis químico proximal del alimento comercial en base seca y base húmeda (g/100g). _____	30
Cuadro 7. Peso promedio por grupo experimental a lo largo del tiempo. _____	32
Cuadro 8. Longitud total promedio en centímetros, por grupo experimental a lo largo del tiempo. _____	33
Cuadro 9. Índice de masa corporal promedio por grupo experimental a lo largo del tiempo. _____	34
Cuadro 10. Tasa de metamorfosis por grupo experimental. _____	35
Cuadro 11. Mortalidad total y mortalidad en la metamorfosis _____	36
Cuadro 12. Análisis garantizado reportado en la etiqueta del alimento utilizado. _____	36
Cuadro 13. Fuentes de proteína y niveles recomendados por diferentes autores (Pelegrín E., 2004). _____	37
Cuadro 14. Composición de aminoácidos esenciales en músculo de rana toro, harina de calamar y harina de pollo. _____	38

## 1. RESUMEN

OCAÑA MENDOZA CAROLINA. Efecto de la suplementación de vitamina E en dieta de ranas toro (*Lithobates catesbeianus*) en etapa larvaria. (Bajo la dirección de: MVZ Drc MPA Carlos Gutiérrez Olvera y Mtra en DO MVZ Alheli Tatiana Lugo García)

La ranicultura en la actualidad ha demostrado ser una actividad alternativa de producción al sector agropecuario, debido a que existe un mercado potencial para su carne y para algunos subproductos que se obtienen de este anfibio. Una mala nutrición en la etapa larvaria de rana toro, ya sea por falta de proteínas o de antioxidantes dietéticos, puede reducir el crecimiento y el desarrollo de las larvas. Se ha demostrado que los antioxidantes dietéticos confieren una variedad de beneficios a través de su capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo (mayor inmunocompetencia y menor susceptibilidad a enfermedades).

Al suplementar la dieta de los renacuajos con vitamina E podría mejorar el desarrollo en la fase larvaria (aumentando peso y talla de los imagos) y alcanzar el desarrollo pre-metamórfico con mayor rapidez.

En esta investigación se realizó AQP a los alimentos y cuantificó la cantidad de vitamina E, para conocer su aporte nutricional. Se adicionó vitamina E en dos concentraciones diferentes (4.56 mg/100g y 9.12mg/100g) en alimento de tilapia, dieta que se administró durante cuatro meses y se evaluó el efecto en el desarrollo de los renacuajos realizando biometrías; se midió la longitud, peso, se calculó índice de masa corporal, además de analizar la mortalidad total y dentro del grupo que entró a metamorfosis.

El alimento de tilapia analizado no contenía vitamina E, y la adición de vitamina no obtuvo efectos significativos estadísticamente a las dosis utilizadas, tanto en peso, talla e IMC, sin embargo, disminuyó la mortalidad.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Ranicultura en México y el mundo

La ranicultura es una actividad productiva que se inserta dentro del contexto de la acuicultura dedicada al cultivo o cría de rana en cautiverio. La ranicultura ha demostrado ser una actividad alternativa de producción al sector agropecuario, debido a que existe un mercado potencial para su carne y para algunos subproductos que se obtienen de este anfibio (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

Estudios de nutrición destacan que la carne de rana es una alternativa sana, recomendada por los especialistas para diabéticos y personas con trastornos del colesterol (Fioranelli *et al.*, 2004). Las “ancas” son las piezas más apreciadas para el consumo humano (Coppo, 2003).

Los primeros registros de la introducción de la rana toro en México datan de 1853, pero no es hasta 1925 donde inicia realmente la ranicultura. El desarrollo de la fauna acuática promovió un programa de diseminación de especies de ranas con mayor importancia comercial, con objeto de establecer nuevas poblaciones susceptibles a la producción (*Lithobates montezumae*, *L. megapoda* y *L. catesbeianus*) (Instituto Nacional de Pesca, 2012). Al respecto, se menciona que entre los principales países productores de rana (*L. catesbeianus*) están: China, Brasil, Malasia, México, Argentina y Singapur (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015; citado por Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016) (Figura 1).

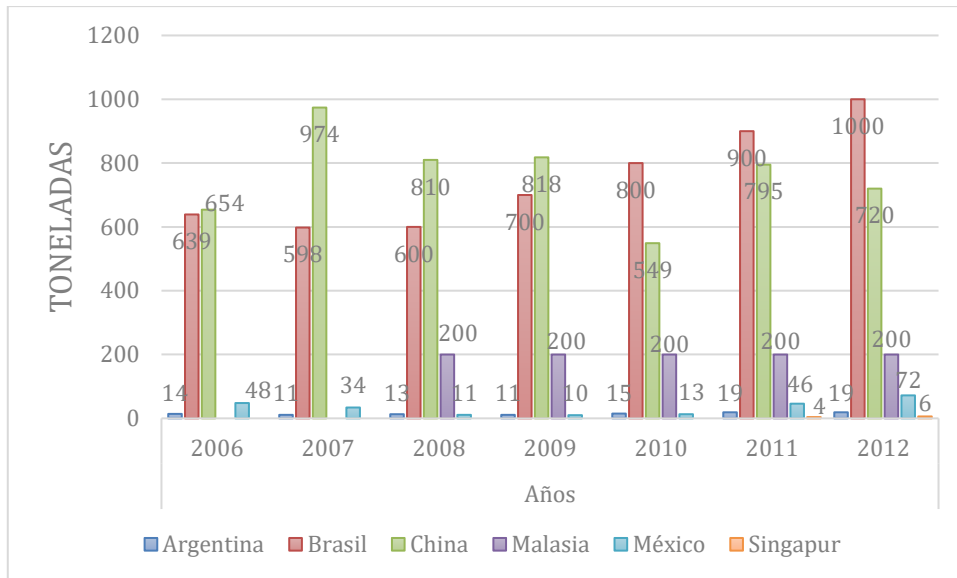


Figura 1. Principales países productores de rana. Mostrando en el eje horizontal los años del 2006 al 2012 y en el eje vertical las toneladas de cada país en ese año (FAO, 2009; citado por SENASICA, 2016).

En México la especie *Lithobates catesbeianus* es la principal especie para consumo y cuenta con un rendimiento de aproximadamente 228 toneladas anuales, con un valor de más de 10 millones de pesos, siendo Michoacán uno de los principales estados productores, al registrar más de 200 toneladas anuales, con un valor de producción de 6.8 millones de pesos (SENASICA, 2021; citado por CONAPESCA, 2017) (Figura 2).

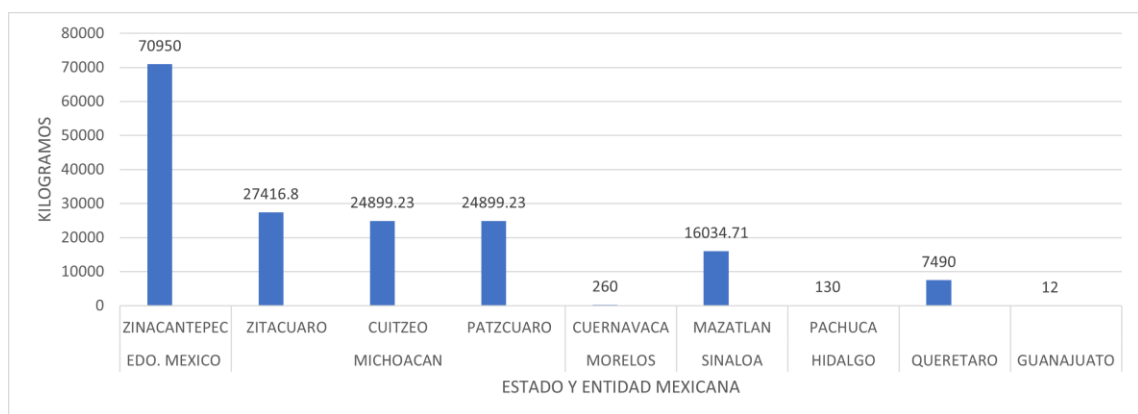


Figura 2. Producción nacional acuícola de rana toro en kilogramos, por diferentes estados y entidades mexicanas, en el 2017 (SENASICA, 2021; citado por CONAPESCA, 2017).

## 2.2. Generalidades de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*)

Los anfibios son un grupo de vertebrados que se distinguen como grupo monofilético por presentar las siguientes características comunes en morfología externa: piel lisa y muy vascularizada sin protección de escamas, plumas o pelo, que facilita el intercambio de gases; incluye glándulas mucosas y lechosas que humectan la piel, que pueden secretar toxinas, con función de mecanismo de defensa; huevos sin membranas extraembrionarias, los cuales dependen de ambientes húmedos para evitar la desecación (Parra *et al.*, 2014).

Actualmente los anfibios se clasifican en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras y tritones) y Gymnophiona (cecilias) (Halliday y Adler, 2007). Cada orden presenta características específicas en algunos aspectos de su morfología e historia natural.

El orden Anura está compuesto por 6,200 especies (Frost, 2013) y 6,233 (AmphibiaWeb, 2015), es el más abundante y diversificado de los anfibios vivientes. Las especies de este grupo se encuentran en hábitats acuáticos, terrestres, fosoriales y arborícolas en prácticamente casi todos los continentes (Halliday y Adler, 2007). Los organismos de este grupo presentan una longitud hocico-cloaca de 1 a más de 30 cm. Las extremidades posteriores son largas, el tronco corto y no presentan cola (Parra *et al.*, 2014)

Los anuros pueden presentar diferencias morfológicas dependiendo de su forma de vida. En México, por ejemplo, los anuros semiacuáticos del género *Lithobates* tienen la cabeza puntiaguda, cuerpo hidrodinámico y extremidades posteriores muy largas con dígitos largos y palmeados. Todos los dedos de sus patas traseras presentan membranas interdigitales (Parra *et al.*, 2014).

*Lithobates catesbeianus* es un anfibio de gran tamaño, de entre 10 y 20 cm de longitud del hocico a la cloaca y un peso entre 60 y 900 g (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 2018) o, según Coppo, hasta una longitud máxima de 43 cm y 2.5 kg de peso (2003). Su cabeza es ancha y plana, presenta un pliegue de piel a cada lado que corre desde detrás del ojo hasta el tímpano, bordeándolo. La especie puede variar de color oliva oscuro a verde pálido. La superficie ventral es de color crema con variaciones en amarillo o gris y puede

presentar manchas irregulares difusas de color verde pálido en la región de la garganta o en toda la superficie ventral. La superficie dorsal es de color verdoso oscuro, verde oliva hasta amarillo, con manchas o puntos negros. (CAR, 2018) (Figura 3).



Figura 3. *Lithobates catesbeianus*. A y B: adultos con diferentes coloraciones; C: sub adulto; D: renacuajo (CAR, 2018)

La madurez sexual dependerá del medio en el que se desarrollen ya que los factores ambientales (fotoperiodo, temperatura y humedad), influyen en el crecimiento. Por lo general las hembras la alcanzan de 2 a 3 años y los machos de 1 a 2 años; se tiene registro de que, en hábitats fríos, la rana toro alcanza su madurez de 2 a 4 años, mientras que en climas cálidos la alcanzan en 1 año, esta información cambia con respecto a organismos de vida libre y en cautiverio (AmphibiaWeb, 2015).

Las principales características sexuales secundarias, en machos son: coloración amarilla en la región gular, diámetro del tímpano de dos a tres veces más grande que el tamaño de su ojo y presencia de callo nupcial. Mientras que, las hembras, tienen del mismo tamaño que su ojo, coloración gular blanca (Alonso, 1997).

Son de hábitos nocturnos, y es común que emitan sonidos que dependerán de la situación en que se encuentre. Los machos emiten un sonido semejante al de un toro (de ahí deriva su nombre “rana toro”), es característico cuando están en periodo de reproducción; la llamada de apareamiento tiene una nota que dura

0.8 segundos a una frecuencia de 1,0 kHz (AmphibiaWeb, 2015). Las hembras emiten sonidos distintos al de los machos, por lo general son sonidos de alerta contra depredadores (AmphibiaWeb, 2015).

Las ranas son animales poiquiloterms, es decir que su temperatura depende del medio que las rodea (CAR, 2018). Su temperatura corporal usualmente se sitúa 1°C por arriba de la ambiental (Coppo, 2003). Todo el proceso productivo tiene valores óptimos entre los 25°C y 28°C. La experiencia ha demostrado que a pesar de que las ranas resisten temperaturas extremas, a nivel de criadero son letales las variaciones muy bruscas en cortos períodos de tiempo, así como las temperaturas intermedias en torno a los 10 - 15°C. (Mazzoni 2001; CAR, 2018).

### 2.2.1. Clasificación taxonómica

Fue reclasificada en el 2006, pasando de *Rana catesbeiana* a *Lithobates catesbeianus* (Frost *et al*, 2006). La clasificación taxonómica es la siguiente (Cuadro 1):

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de rana toro, de acuerdo con IUCN (2009).

Reino	• Animalia
Filo	• Chordata
Clase	• Amphibia
Orden	• Anura
Familia	• Ranidae
Género	• <i>Lithobates</i>
Especie	• <i>catesbeianus</i> . Shaw, 1802.

Nombre común: En Estados Unidos es comúnmente conocida como “american bullfrog”, “bullfrog” o “common bullfrog”, en México se conoce como “rana toro americana” o “rana toro” (Rangel, 2017), apelativo que se debe al dimorfismo laríngeo que presentan los macho (Carrión, 2010).

### **2.2.2. Distribución y hábitat**

La rana toro (*L. catesbeianus*) es originaria de Norteamérica, que comprende el este de los Estados Unidos, sur de Canadá, como límite norte y en el límite sur, se distribuye en el norte de México hasta los estados de Veracruz, Hidalgo y Puebla (INAPESCA, 2012).

En la naturaleza, el hábitat característico de la rana toro lo constituyen cuerpos de agua lénticos y someros, con suelos altamente orgánicos que presentan vegetación acuática sumergida o emergente (Castro, 2001).

### **2.2.3. Ciclo de vida de rana toro**

En una producción ranícola el desarrollo comprende una etapa acuática o larvaria, que comienza con la deposición de los huevos en cuerpos de agua, el desarrollo del embrión, la etapa de larva (6 mg de peso, alimentación endógena), y termina con la de renacuajo (1 g de peso, respiración branquial, corazón de dos cavidades y alimentación a base de plancton, algas y microorganismos). Luego de atravesar varios estadios, por metamorfosis, hasta transformarse en imago, iniciando la etapa terrestre de su ontogénesis y alcanzando la madurez sexual aproximadamente a los ocho meses, cuando las hembras pesan unos 200 g y los machos unos 250 g (Coppo, 2003). El tiempo de cultivo es de 5 meses y en sistemas de producción continua 4 meses (INAPESCA, 2012).

En el caso de la etapa larvaria, la literatura las identifica con las siglas “G0, G1, G2, G3 y G4” (derivado de la palabra del portugués “girino” = renacuajo). De acuerdo con el ciclo de vida zootécnico, las características de cada fase son:

- G0 o embrión: durante el desarrollo embrionario, previo a la eclosión (Rangel, 2017). La hembra desova de diez mil a veinte mil huevos cuya incubación requiere alrededor de siete días (Coppo, 2003). Los huevos se retiran al menos 12 horas luego de la puesta, colocándolos en agua de iguales condiciones de temperatura y pH. La eclosión se produce en promedio al tercer día (Mazzoni, 2001).
- G1 o larva inicial: se denomina así después de la eclosión, sus características principales es que carecen de aparato digestivo propio,



aún no hay absorción de alimento exógenos y presentan branquias externas (Rangel, 2017).

- G2 o renacuajo: ausencia de vitelo (fue consumida totalmente), branquias interiorizadas, boca y sistema digestivo bien desarrollado y demanda de alimento del exterior (Rangel, 2017).
- G3: Comienza a brotar las extremidades inferiores (región próxima a la cola), se da inicio a la metamorfosis. Conforme su desarrollo se recomienda separarse a otro sector (Rangel, 2017).
- G4 o clímax metamórfico: aquí surgen las extremidades superiores formados al interior del cuerpo, rompen la piel y salen al exterior, la cola comienza a reabsorberse y la boca se alarga; esta fase termina cuando la cola desaparece y la boca se abre (Rangel, 2017). El peso final del renacuajo variará en función de diversos factores ambientales y de manejo. Se recomienda la producción de renacuajos de pesos superiores a 10 g para así obtener imagos cuyo peso supere los 7 g (Mazzoni, 2001).
- Imago: Metamorfosis completa, los organismos demandan alimento exterior, sus hábitos alimenticios cambian. En cuanto los organismos rebasan los 50 gramos de peso, entonces se deja de dominar imagos y pasan al sector de engorda inicial. El tamaño del imago, es decir de la ranita recién metamorfoseada, es un factor fundamental para tener en cuenta al encarar el engorde de ranas en forma correcta (Mazzoni, 2001).
- Rana: Abarcan los estadios juvenil y adulto y se ubican en el sector de reproducción o engorda. Para imagos de 10 g aproximadamente, el ciclo hasta faena con un mínimo de 200 g de peso vivo tiene una duración promedio de 120 días (entre 25 y 30°C) (Figura 4).

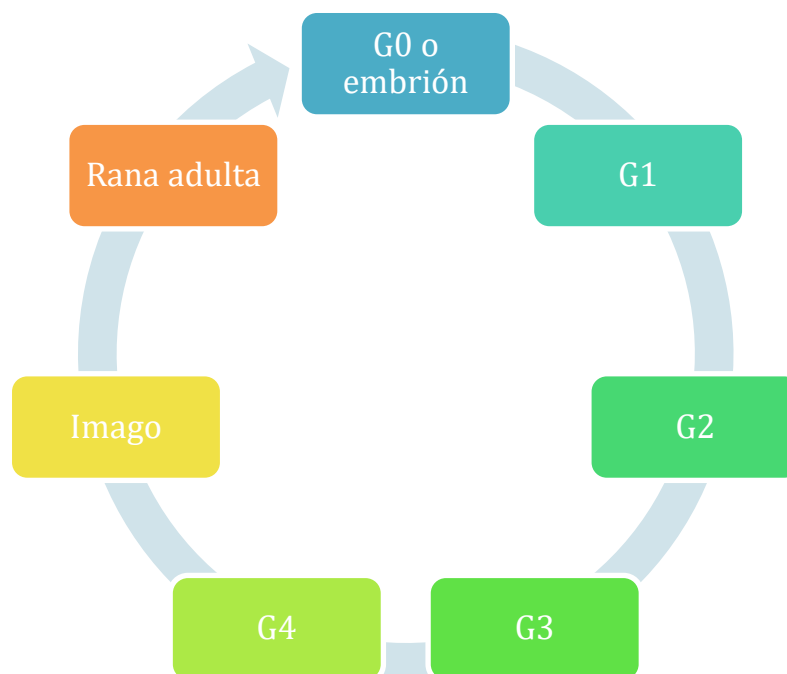


Figura 4. Ciclo de vida, fases de desarrollo zootécnico de *Lithobates catesbeianus*. Imagen hecha por Carolina Ocaña.

El tiempo entre cada fase de desarrollo, dependerá de las condiciones en que se encuentre y la disponibilidad de alimento, por ejemplo, en cautiverio y bajo condiciones controladas, puede alcanzar su ciclo de huevo a adulto en 7 meses, mientras que en vida libre (su hábitat original) completa su ciclo de vida en 4 años (Cribb, *et al.*, 2013). En el Cuadro 2 se resumen los principales problemas que se pueden encontrar dentro de la etapa de renacuajos.

Cuadro 2. Problemas más comunes de los renacuajos, su causa y su solución (Tegnofrog, 1995; citado por Castro, 2001).

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
Herida del cuerpo	Manipulación brusca	Manejo adecuado
Muerte brusca del lote	Cambios bruscos de temperatura, sustancias tóxicas	Control de temperatura, recambio del agua
Manchas blancas en piel	Parásitos	Fármacos

### 2.2.3.1. **Metamorfosis**

La metamorfosis implica cambios como resorción de la cola, aparición de patas delanteras, desaparición de las branquias, desarrollo de párpados y tímpanos, ensanchamiento de la boca y crecimiento de la lengua, que –fija por delante– será desplegada (disparada) para atrapar insectos. No menos importantes serán los cambios conductuales y bioquímicos, necesarios para hacer frente al cambio de vida (acuática por terrestre). El crecimiento oviductal es estrógeno dependiente y la metamorfosis parece depender de la tiroxina (T4), con su correspondiente estimulación hipofisaria (Coppo, 2003).

El crecimiento radial de los huesos largos está bajo el comando del cartílago epifisario; en la superficie perióstica puede verificarse actividad de fosfatasa alcalina. En los músculos, el fosfógeno energético es la fosfocreatina, filogenéticamente más avanzada que la fosforil–arginina de especies inferiores. La urea parece ser necesaria para la normal contractilidad del músculo esquelético de los anuros (Coppo, 2003).

La prolactina aumenta el transporte activo de sodio a través de la piel de renacuajos de rana toro y el mismo efecto se registra durante su metamorfosis hacia estadíos adultos (Coppo, 2003).

En el cuadro 3 se resumen los principales eventos de desarrollo en la metamorfosis de renacuajos de rana toro (Castro, 2001).

Cuadro 3. Características de los principales eventos de la metamorfosis en renacuajos de rana toro (Flores, 1999; citado por Castro, 2001)

<b>Evento</b>	<b>Fase biológica</b>	<b>Tiempo aproximado posterior a amplexo</b>	<b>Fases para fines prácticos</b>	<b>Características relevantes</b>
Fecundación del huevo	Embrionaria o G0	0	I	Determina la viabilidad del huevo
Eclosión	Larvaria o G1	2-3 días	II	Alimentación autógena
Conversión a renacuajo	Pre metamórfica o G2	5-8 días	III	Inicia la alimentación externa, por lo que nadan y filtran continuamente
Aparición de los discos bucales	Pre metamórfica o G2	20-35 días	IV	Domina la asimilación de proteína animal, raspa pared y come en el fondo. Incremento de competencia intraespecífica por alimento y espacio
Aparición de miembros posteriores	Pre metamórfica o G3	50-100 días	V	Presencia de tejido pulmonar. Capacidad de respiración dérmica y bucal. Reducción del nivel de ingesta de alimentos
Aparición de miembros anteriores*	Clímax metamórfico o G4	55-120 días	VI	Respiración pulmonar y dérmica. Cesan su alimentación y reducen su actividad. Requieren de sustrato fuera del agua

\*Aquí el esqueleto ya se definió completamente, es una ranita de 4 a 5 cm, de largo corporal (Castro, 2001; Flores, 1999).

#### **2.2.4. Alimentación**

Con la excepción de unas pocas especies, la mayoría de los larvalanuranos han sido históricamente agrupados como alimentadores acuáticos, omnívoros o herbívoros (Latney, 2014). Desde el punto de vista alimentario el renacuajo se comportaría como vegetariano (plantas acuáticas) (Coppo, 2003). Se han identificado 5 tipos de renacuajos según la preferencia dietética. En los renacuajos micrófagos que se alimentan en suspensión, el agua se sifonea activamente hacia la cavidad bucal y se dirige sobre las placas filtrantes cubiertas de mucosa en la faringe, llamadas incautación branquial. Esta estructura filtrante puede eliminar bacterias, protozoos y plancton del agua; sin embargo, también se puede utilizar para alimentarse de material más grande (Latney, 2014).

Los labios están compuestos por un pico de queratina y un disco oral, cubiertos de dentículos de queratina, que rodean la boca. Los dentículos raspan el alimento de la vegetación o los restos de animales, y los tamices branquiales extraen los desechos orgánicos de la boca para su consumo (Latney, 2014).

La comida filtrada es transportada por los cilios hacia el esófago y el estómago y no ocurre peristaltismo. El estómago sirve como unidad de almacenamiento de alimentos y existe una pequeña dilatación al final del esófago. La digestión se produce en el intestino delgado alargado y estrecho, que está muy rizado dentro del celoma. El estómago de las larvas se ensancha y alarga durante la metamorfosis y se produce un desarrollo glandular extenso a medida que el intestino medio se acorta y ensancha en el adulto (Coppo, 2003; Latney, 2014).

La transición ontogenética de los hábitos de alimentación incluye filtrado de fitoplancton, ramoneo de algas bentónicas, detritofagia y un cambio gradual hacia la ingestión de proteína animal, antes de alcanzar el clímax metamórfico cuando la alimentación se hace brevemente autogéna. Después de la absorción de la cola, las ranitas se vuelven carnívoras (FAO, 2009).

Otros renacuajos se han clasificado como alimentadores oportunistas y experimentan cambios de nicho ontogenéticos basados en recursos. En un estudio que evaluó la ecología de alimentación de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*), la rana de madera (*Lithobates sylvaticus*), rana leopardo

(*Lithobates pipens*) y la rana verde (*Lithobates clamitans*), se mostró cierto grado de carnivoría entre todas las especies. Los renacuajos de rana toro y, hasta cierto punto, los renacuajos de rana de madera funcionaban eficazmente como depredadores primarios en la red trófica del estanque (Latney, 2014). Se observaron grados variables de omnivoría en los renacuajos, ya que las ranas verdes consumían más materia animal que las ranas leopardo y las ranas de madera de dosel abierto. Esta evidencia sugiere que algunos pueden adaptarse a la depredación macrófaga y cambiar efectivamente la dinámica de la red trófica del estanque (Latney, 2014).

Muchas larvas de anfibios consumen algas que pueden contener una variedad de antioxidantes dietéticos, especialmente pigmentos carotenoides y compuestos polifenólicos (Goiris *et al.*, 2012; Christaki *et al.*, 2013; Szuroczki, 2019). La ingestión de antioxidantes que se encuentran naturalmente en muchas especies de algas de las que se alimentan las larvas de anfibios les permiten mantener su crecimiento (Szuroczki, 2019). Por ejemplo, se sabe que las larvas de anfibios de varios géneros consumen *Chlorella* (Seale *et al.*, 1980), un tipo común de alga que se encuentra en los humedales y estanques de América del Norte (Wehr *et al.*, 2003) cuyo contenido de carotenoides se ha encontrado en un rango de 250 a 3040  $\mu\text{g} / \text{g}$  (Goiris *et al.*, 2012; Szuroczki, 2019). Por lo tanto, las algas pueden proporcionar una fuente natural de antioxidantes que pueden desempeñar un papel importante en la mitigación de los factores ambientales que aumentan el estrés oxidativo (Szuroczki, 2019).

La vitamina E es un potente antioxidante lipofílico que elimina las especies reactivas de oxígeno y protege los lípidos de la peroxidación, es esencial para la protección de la membrana celular y estimula el sistema inmunológico (Szuroczki, 2019).

Se ha reportado que las necesidades nutritivas de los renacuajos son: 20% de proteínas (10% de origen animal y 10% de origen vegetal) al inicio de la fase como renacuajo y hasta 40% de proteínas, siendo el 20% de origen animal y los otros 20% de origen vegetal, al final de la fase como renacuajo, con un consumo de alimento que se encuentra alrededor del 13% de su peso vivo (PV), dividida en 4 veces al día. Suele estar bien pulverizada (0,42mm). Posee 0,91 U.I de

calcio y 5300 U.I. de yodo (que comanda la metamorfosis). De un modo general, ese consumo varía de 6 a 18% (Castro, 2001). También se menciona que en la etapa de renacuajos se registra cierto grado de coprofagia, especialmente en criaderos de ranas (Coppo, 2003).

#### 2.2.4.1. **Antioxidantes**

Los antioxidantes dietéticos consisten principalmente en cuatro grupos principales que se encuentran comúnmente en los alimentos: vitamina C, vitamina E, carotenoides y compuestos polifenólicos (Catoni *et al.*, 2008; Szuroczki *et al.*, 2016).

Entre los beneficios reportados de los antioxidantes dietéticos se encuentran aumentos en la inmunocompetencia (Chew, 1993; Hughes, 1999), una reducción de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas (Bendich, 1989; Horak *et al.*, 2001) y ralentización del envejecimiento (Ames *et al.*, 1993; Driver *et al.*, 2003; Szuroczki *et al.*, 2016).

La ventaja clave para la salud de los antioxidantes radica en su capacidad para reducir las formas químicamente reactivas de oxígeno y nitrógeno, a menudo denominadas radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS), que son moléculas potencialmente dañinas con las que todos los organismos vivos deben lidiar. Varias funciones fisiológicas clave, por ejemplo, señalización química, desintoxicación, conversión de energía y la respuesta inmune inicial, dependen de los radicales libres (Chew *et al.*, 2004; Catoni *et al.*, 2008; Szuroczki *et al.*, 2016), pero una sobreproducción / sobreexposición causa estrés oxidativo, lo que resulta en daño celular y tisular, envejecimiento prematuro y enfermedades degenerativas (Catoni *et al.*, 2008; Birben *et al.*, 2012; Szuroczki *et al.*, 2016).

Existen otros beneficios conferidos por el consumo de alimentos ricos en antioxidantes además de contrarrestar el estrés oxidativo, con funciones conocidas en la mediación de los efectos de los disruptores hormonales, inhibiendo la proliferación celular dañina, atrapando compuestos mutagénicos electrofílicos, regulando el metabolismo celular y promoviendo el crecimiento y el desarrollo (Von Lintig, 2010; Szuroczki, 2018).

### 2.2.4.1.1. Vitamina E

La vitamina E es un miembro típico de la familia de los antioxidantes solubles en grasa, y su forma más abundante y biológicamente activa es el  $\alpha$ -tocoferol (TOC) (Márquez, 2002). El término vitamina E es utilizado para designar un grupo de 8 isómeros naturales de tocoferoles y tocotrienoles (Figura 5). Los tocoferoles derivan del tocol, que tiene un anillo aromático, llamado cromano con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide (Sánchez, 2016). Si la cadena es saturada corresponderán a los tocoferoles y si es insaturada a los tocotrienos. Estos 8 isómeros varían según el grupo que se encuentre en la posición 5,7 y 8 del anillo central de cromanol (Sánchez, 2016).

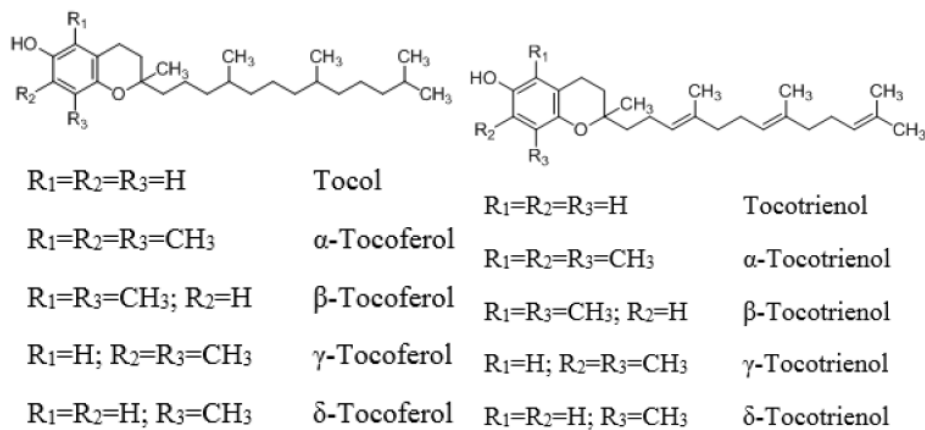


Figura 5. Estructura de los isómeros de la Vitamina E (Sánchez, 2016).

Como nutriente antioxidante, se ha informado que la vitamina E previene el daño de los radicales libres y las reacciones oxidativas en cadena, y juega un papel importante en la reducción del estrés oxidativo (Singh *et al.*, 2005; Jiang, 2019). Otras propiedades de esta vitamina son: inhibir la síntesis de prostaglandinas y la agregación plaquetaria; su déficit aumenta la posibilidad de que ocurra hemólisis en los eritrocitos; inhibir la actividad de ciertas enzimas como la creatinina kinasa y la xantina oxidasa. Estas propiedades de la vitamina E son las que relacionan su deficiencia con enfermedades como las cataratas, cáncer, diabetes, Alzheimer, etc., (Sánchez, 2016).

Más allá de su función antioxidante, la vitamina E también ha sido involucrada en la regulación de la síntesis de ADN, la expresión genética, el metabolismo mitocondrial y en la proliferación y diferenciación celular. El  $\alpha$ -tocoferol tiene la



mayor actividad biológica y es la forma de vitamina E más ampliamente disponible en los alimentos (Márquez, *et al.*, 2002).

Si bien los efectos sobre la salud de los antioxidantes dietéticos se han estudiado y caracterizado ampliamente en el sistema de los mamíferos (Bendich, 1996; Amar *et al.*, 2000; Szuroczki *et al.*, 2016), relativamente poco se sabe acerca de su importancia para la función inmunológica, desarrollo y la salud de los anfibios, especialmente las etapas larvarias (Szuroczki *et al.*, 2016).

La deficiencia de vitamina E puede presentarse de manera diferente dependiendo de la especie. Estos síntomas de deficiencia pueden incluir anemia, miocardiopatía, encefalomalacia y degeneración nerviosa en algunos animales. En reptiles, los síntomas de deficiencia que se notifican con mayor frecuencia son esteatitis, necrosis grasa y degeneración muscular (Dierenfeld, 1989). Específicamente, en las tortugas, la deficiencia de vitamina E puede causar anorexia y nódulos subcutáneos (Donoghue, 2006). Se sabe poco sobre la deficiencia de vitamina E en los anfibios (Freel, 2019).

A menudo definida únicamente como la vitamina antioxidante del cuerpo, las necesidades de vitamina E se miden comúnmente como  $\alpha$ -tocoferol, por lo que 42 mmol / kg es esencial en dietas que contienen menos del 10% de grasa, lo que representa un contenido de vitamina E de 27 UI / kg de dieta o 18 mg / kg (Freel, 2019).

Muchos comederos de invertebrados cumplen con este requisito, incluida la mosca doméstica adulta (29,7 mg / kg), los grillos adultos (19,7 mg / kg), los gusanos de cera (13,3 mg / kg) y los gusanos de mantequilla (13,0 mg / kg). Sin embargo, la disponibilidad de vitamina E depende de la cantidad, el tipo de grasa de la dieta y los isómeros de vitamina E. Los informes de hipovitaminosis E en insectívoros cautivos son raros; Se ha informado de deficiencias de vitamina E en animales de zoológico que se mantuvieron con una dieta de 50 mg a 200 mg de tocoferol por kilogramo de alimento, esto, excede significativamente la dieta de 18 mg de tocoferol por kg, sugerida por los mínimos de la National Research Council (NRC) para el crecimiento en ratas (Latney, 2014).

### 2.3. Estrés oxidativo

Se ha sugerido que los estados redox intracelulares tienen un papel causal en el desarrollo temprano de los organismos (Harvey *et al.*, 2002; Jiang, 2019). La alteración en el sistema celular prooxidante-antioxidante podría resultar en una mayor producción de radicales libres y peróxidos y conducir a resultados desfavorables para el desarrollo embrionario como consecuencia de la lesión de macromoléculas, incluidas proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Jiang, 2019).

Se sabe que la producción excesiva de ROS induce estrés oxidativo y daña las proteínas, el ADN, los lípidos y otros componentes vitales de las células (Schieber *et al.*, 2014; Jiang, 2019).

Para mantener el estado redox fisiológico, las células han desarrollado varios mecanismos de defensa biológica contra el estrés oxidativo causado por los radicales libres. Uno de los mecanismos de defensa básicos son las enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), así como otras enzimas relacionadas, como la glutatión transferasa (GST). Estas enzimas pueden degradar eficazmente los radicales libres y los productos activos derivados de los radicales libres (López *et al.*, 2007; Jiang, 2019). Los antioxidantes tienen una serie de funciones biológicas para proteger a los organismos contra la oxidación de lípidos y prevenir reacciones en cadena oxidativas y, por lo tanto, pueden neutralizar los radicales libres y atenuar el estrés oxidativo (Abdollahi *et al.*, 2004; Jiang, 2019). La vitamina E es importantes para que los organismos mantengan sus actividades normales y también son fundamentales para proteger contra el daño oxidativo (Zaidi *et al.*, 2004; Jiang, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En general, se sabe menos acerca de las necesidades dietéticas de los anfibios larvales y renacuajos que de los adultos y los principales enfoques de la investigación han sido sobre las condiciones ambientales. Los alimentos y la temperatura adecuados y apropiados (agua y/o aire) parecen ser los dos factores principales para la sobrevivencia de las larvas (McWilliams, 2008).

Los estudios sugieren que una mala nutrición, ya sea por falta de proteínas o de antioxidantes dietéticos beneficiosos, puede afectar negativamente la función inmunológica de los anfibios y, en última instancia, reducir el crecimiento, el desarrollo y la resistencia a los patógenos de las larvas (Szuroczki *et al.*, 2016).

Los hábitos de alimentación de los renacuajos; incluye filtrado de fitoplancton, ramoneo de algas bentónicas, detritofagia, y un cambio gradual hacia la ingestión de proteína animal (FAO, 2009). Por lo tanto, es probable que las diversas formas de algas consumidas por los renacuajos contengan una amplia variedad de antioxidantes dietético y que estos sean potencialmente beneficiosos (Christaki *et al.*, 2013; Szuroczki *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que los antioxidantes dietéticos en ranas toro, confieren una variedad de beneficios a través de su capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo, incluida una mayor inmunocompetencia y una menor susceptibilidad a enfermedades infecciosas y no infecciosas (Szuroczki *et al.*, 2016).

Las tasas de crecimiento rápido se han relacionado con un mayor estrés oxidativo, ya que los animales tienden a aumentar su demanda de oxígeno en tales circunstancias (Stoks *et al.*, 2006; Szuroczki *et al.*, 2016), y esto se ha relacionado con un aumento en la producción de ROS (Loft *et al.*, 1994). Un aumento de la inmunocompetencia, mediado por los antioxidantes de la dieta, puede afectar el crecimiento al aumentar la disponibilidad de recursos para la construcción de proteínas y la adquisición de nutrientes, lo que provoca un aumento general en la cantidad de energía disponible para el crecimiento (Ogilvy *et al.*, 2012; Szuroczki *et al.*, 2016). Los antioxidantes de la dieta aumentan la función inmunológica al destruir el exceso de ROS, acoplando así un circuito de retroalimentación positiva donde el aumento de ROS causado por el crecimiento

rápido es contrarrestado por los antioxidantes de la dieta (Benzie, 2003; Szuroczki *et al.*, 2016).

Es importante destacar que los antioxidantes dietéticos como el  $\beta$ -caroteno y las vitaminas E y C afectan el crecimiento en otros taxones (mamíferos, aves) (Cucco *et al.*, 2006; Szuroczki *et al.*, 2016) y específicamente el  $\beta$ -caroteno y la vitamina E, tienen un efecto positivo en algunos aspectos de la función inmunológica en las larvas de anfibios (Szuroczki *et al.*, 2016).

Comprender el papel de los antioxidantes, como la vitamina E, en la dieta ayudará a entender cómo los organismos mantienen su crecimiento mientras contrarrestan los efectos negativos del estrés oxidativo inducido por el medio ambiente (es decir, la sobreproducción de radicales libres), (Szuroczki *et al.*, 2016).

Los compuestos dietéticos naturales, incluidos los antioxidantes que confieren propiedades beneficiosas para la salud o características de refuerzo inmunológico, pueden ser un área importante de investigación (Szuroczki *et al.*, 2016).

## **4. HIPÓTESIS**

Al suplementar vitamina E a la dieta de los renacuajos y suministrarla a grupos de prueba, mejorará su desarrollo en la fase larvaria (aumentando peso y talla de los imagos) y alcanzarán su desarrollo pre-metamórfico con mayor rapidez.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

El presente trabajo pretende determinar el efecto de la adición de vitamina E en la dieta de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) en la fase de renacuajo, con diferentes niveles de inclusión de vitamina E en el alimento. Específicamente, renacuajos provenientes de la producción “Frog Style”, situada en Yautepec, Morelos.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Realizar un Análisis Químico Proximal (AQP) y extraer vitamina E para determinar el contenido nutricional de la dieta actualmente ofrecida a los renacuajos de rana toro en la granja “Frog Style”, con el fin de conocer las concentraciones de vitamina E presentes en el alimento y tener un punto de referencia para poder suplementar la dieta.
- Suplementar con vitamina E las dietas que se administrarán a los renacuajos. Agregando vitamina E al alimento comercial proporcionado en dicho lugar, para poder hacer un alimento con dosis conocidas de vitamina E.
- Evaluar el desarrollo en la etapa pre-metamorfosis de los grupos de renacuajos utilizando los registros obtenidos durante los tratamientos y las biometrías finales de los imagos.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

La realización del estudio se concentró en dos etapas, la primera concierne a la fase de laboratorio (primer periodo), que se llevó a cabo en los Laboratorios del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

La segunda etapa, corresponde a la fase experimental (segundo periodo), donde los animales se mantuvieron alojados en un domicilio particular; ubicado en la Ciudad de México, en la Alcaldía Xochimilco.

### **6.1. Primer periodo**

#### **6.1.1. Colecta de muestras**

Para realizar el análisis químico proximal (AQP) y extraer la vitamina E de la dieta ofrecida a los renacuajos, se tomó 1 kg de muestra del alimento comercial utilizado para la alimentación de las ranas toro, en específico la etapa de renacuajo (alimento para tilapia de la marca “El pedregal” extruido semiflotante con partículas menores a 0.4 mm) y la etiqueta del alimento. Proporcionado por el criadero “Frog Style” en la localidad de Yautepec, Morelos.

#### **6.1.2. Análisis de laboratorio**

##### **6.1.2.1. Análisis químico proximal**

Las muestras del alimento comercial de tilapia, con un tamaño de partícula menor a 0.4 mm, se sometieron a un Análisis Químico Proximal (AQP), siguiendo los procedimientos descritos por la Association of Official Analytical Chemists, AOAC (AOAC, 2015). Se realizaron las siguientes determinaciones: contenido de humedad (934.01), proteína cruda (2001.11), extracto etéreo (920.39), fibra cruda (962.09) y cenizas (942.05). La determinación de carbohidratos se realizó al final por diferencia, restando al 100% los resultados obtenidos de humedad, proteína, lípidos, fibra y cenizas.

### 6.1.2.2. **Extracción de vitamina E.**

#### **Elaboración de soluciones estándar.**

Se preparó una solución madre de  $\alpha$ -tocoferol con metanol a una concentración de 580 $\mu$ g/mL. Utilizando la solución madre se prepararon diluciones a 100 $\mu$ g/mL, 200 $\mu$ g/mL, 300 $\mu$ g/mL y 400 $\mu$ g/mL. Las diluciones fueron guardadas en viales ámbar apropiados para la inyección dentro de la columna de HPLC (Márquez, 2002).

#### **Extracción.**

Se pesó 20g de la muestra de alimento por triplicado, a cada muestra de 20g se le agregó 50mL de metanol y se agitó. Posteriormente se centrifugaron a 4000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, se recuperó la fase acuosa, a la cual se le volvió agregar 50mL de metanol y se repitió el proceso de agitación, centrifugación y recuperación de la fase acuosa dos veces más (Shüep, 1997; Márquez, 2002).

#### **Evaporación y dilución.**

La fase acuosa fue evaporada utilizando un evaporador rotatorio bajo un vacío parcial y a una temperatura de 60°C (Márquez, 2002).

El residuo fue reconstituido en 3mL de metanol HPLC, y se tomó 1mL que fue filtrado en acrodisco con tamaño de poro de 0.45 $\mu$ m y recuperado en un vial ámbar apropiado para la inyección dentro de la columna de HPLC (Márquez, 2002).

#### **Cromatografía líquida de alta resolución**

Las soluciones obtenidas se analizaron por el método de cromatografía líquida de alta resolución, siguiendo los protocolos descritos por Sunarić, para posteriormente hacer la cuantificación de vitamina E. Se hizo la curva de calibración con las diluciones de los estándares y se obtuvo el resultado de las muestras de alimento de tilapia (2017).

Los análisis del alimento fueron procesados en los Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 6.1.3. Procedimiento en la elaboración de las dietas

La dosificación de vitamina E se basó en un animal con altos requerimientos de vitamina E, en este caso el gato, con la literatura que recomienda la FEDIAF, siendo esta también la más alta, en comparación de la NRC y la AAFCO. En el siguiente Cuadro 4 se muestran los requerimientos de vitamina E en gatos, tanto para la NRC y AAFCO como para FEDIAF.

Cuadro 4. Niveles recomendados de vitamina E (Mantenimientos para adultos).

<b>Especie</b>	<b>NRC (cantidades recomendadas)</b>	<b>AAFCO</b>	<b>FEDIAF</b>
<b>Gato*</b>	38 UI	30 UI	50.7 UI

AAFCO. Association of American Feed Control Officials; NRC, National Research Council; UI, unidades internacionales; FEDIAF, The European pet Food Industry. \* Los estimados son por kg de alimento conteniendo 4000kcal/kg.

Para la elaboración de las dietas experimentales, el alimento seco de tilapia marca “El pedregal”, microtek peces extruido 0.4, con tamaño de partícula inferiores a 250  $\mu\text{m}$ , se mezclaron con el aceite de vitamina E (dl-  $\alpha$ -tocoferol), hasta su completa homogeneización (Cuadro 5). Se preparo 500 gramos de alimento para cada grupo.

Donde al hacer la conversión de unidades internacionales a miligramos, a los 500 gramos de alimento comercial se le agrego:

- Dosis media de vitamina E: 22.8 mg de dl-  $\alpha$ - tocoferol
- Dosis alta de vitamina E: 45.6 mg de dl-  $\alpha$ -tocoferol

Fueron almacenados en botes de plástico bajo sombra a una temperatura menor de 20°C.



Cuadro 5. Factores de conversión de las fuentes de vitamina E, Bioequivalencias. (Instituto Linus Pauling, 2015).

Fuentes de vitamina E Bioequivalencias			Actividad de vitamina E
dl- $\alpha$ -tocoferil acetato	1 mg	=	1 UI
d- $\alpha$ -tocoferol	1 mg	=	1.49 UI
d- $\alpha$ -tocoferol-acetato 1	1 mg	=	1.36 UI
dl- $\alpha$ -tocoferol	1 mg	=	1.10 UI
dl-beta-tocoferol	1 mg	=	0.33 UI
dl-delta-tocoferol	1 mg	=	0.25 UI
dl-gamma-tocoferol	1 mg	=	0.01 UI

## 6.2. Segundo periodo

### 6.2.1. Procedencia de los organismos

Los sujetos para el estudio fueron obtenidos del criadero “Frog Style” en la localidad de Yautepec, Morelos.

El municipio de Yautepec es uno de los 36 municipios que integran el estado de Morelos: Se localiza en la zona norte del estado, tiene una elevación de 1,221 msnm y su temperatura se encuentra en un rango de 14 °C como mínima y 35 °C como máxima, teniendo un promedio de 23 °C.

### 6.2.2. Sujetos de estudio

Por razones propias de la granja, solo se pudieron otorgar 47 ejemplares de renacuajos (*Lithobates catesbeianus*) estos ejemplares fueron identificados con números del 1 al 47 y se registró sus pesos individualmente, luego se mantuvieron una semana en cuarentena, para posteriormente iniciar con los tratamientos experimentales, al terminar la cuarentena se volvieron a registrar los pesos y etapa en la que se encontraban, de los ejemplares visiblemente sanos y se retiraron los decesos que ocurrieron durante la cuarentena, para los cuales se mantuvieron 38 ejemplares, que se encontraban en la etapa pre-

metamórfica, G2 o fase III, indicando la conversión a renacuajo y su inicio a la alimentación exógena, necesaria para el experimento.

Fueron pesados en una balanza analítica digital de 0.1 mg de precisión, estableciendo parámetros de inicio, buscando ejemplares en buen estado de salud y fenotípicamente homogéneos. Los renacuajos capturados tuvieron un peso promedio de 0.639 gramos.

### **6.2.3. Ubicación de la fase experimental**

El desarrollo experimental se realizó en un domicilio particular ubicado en: Calle 5 de mayo, Colonia barrio Xaltocan, Xochimilco, CP 16090, Ciudad de México. Donde fueron alojados en una estancia con las siguientes características: Las instalaciones se encuentran al aire libre, con techo de lámina y piso de concreto, teniendo sol y sombra a lo largo del día.

Xochimilco es una de las 16 demarcaciones de la Ciudad de México. Se localiza en el sureste de la capital, tiene una altura de 2,274 msnm y su temperatura se encuentra en un rango de 5 °C como mínima y 27 °C como máxima, con un promedio de 11 °C.

### **6.2.4. Diseño experimental**

Los 38 individuos fueron identificados aleatoriamente por medio de números (1-47) y colocados en peceras individualmente.

Cada tratamiento fue conformado por 3 bloques de 3 a 5 ejemplares cada uno, teniendo en total 12 a 13 unidades experimentales por tratamiento. Estos individuos fueron alimentados durante 3 meses.

Se utilizó un control (Alimento para Tilapia "El pedregal", actualmente ofrecido) y dos tratamientos experimentales identificados de acuerdo con la cantidad de vitamina E:

- a) Control, 100% de alimento comercial.
- b) Dieta con dosis baja de vitamina E: dosis de 4.56 mg/100g de alimento
- c) Dieta con dosis alta de vitamina E: dosis de 9.12 mg/100g de alimento.

### 6.2.5. Alojamiento de los organismos

Se utilizó una alberca inflable de 1 metro de diámetro y 30 cm de altura, con un volumen de 400 litros. En el piso de la alberca se encontraban colocados 4 termostatos (150 watts) manteniendo la temperatura en un rango de 22-28 °C. De los cuales, se desconectaban dos durante el día (Figura 6).

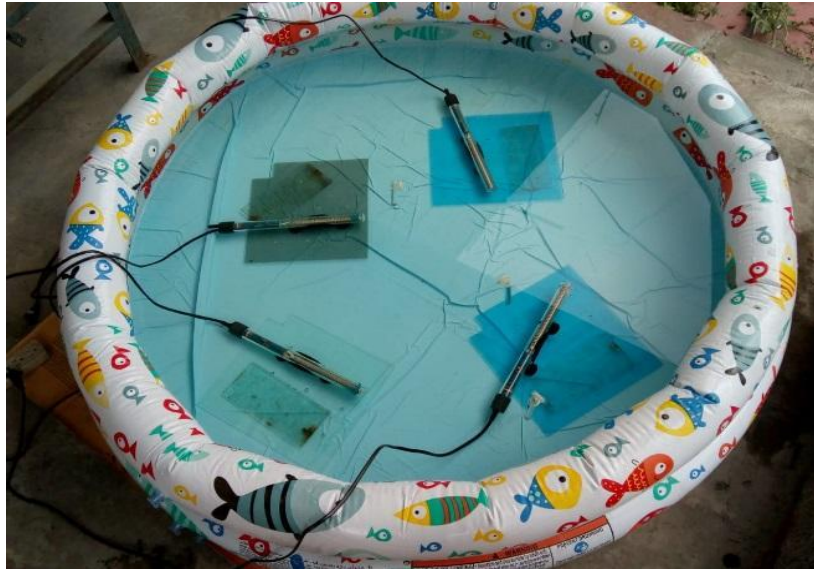


Figura 6. Representación de alberca de plástico inflable, con capacidad de 400 litro y 4 termostatos en el piso de la alberca

Cada renacuajo se encontraba distribuido aleatoriamente en envases de plástico transparente con volumen de 1 litro, acomodados e identificados individualmente, respetando una densidad de 1 ejemplar por medio litro mínimo, cumpliendo con la densidad sugerida por Hayashi (Hayashi, 2004).

Se hicieron bloques de 5 envases, que hacían la función de lancha (Figura 7), teniendo en total 3 bloques por tratamiento.

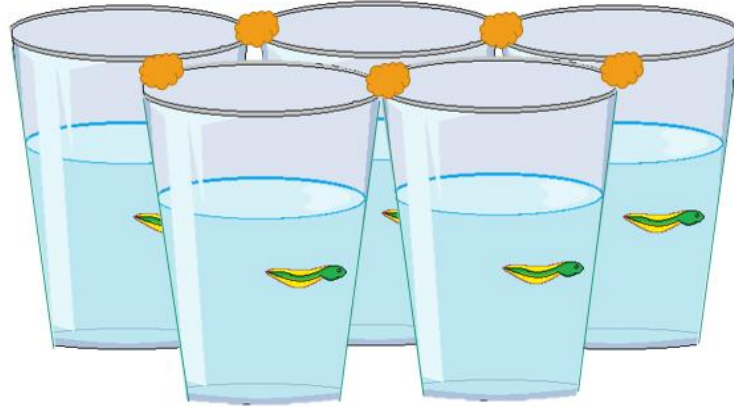


Figura 7. Representación de bloque con 5 envases; cada envase con una capacidad de un litro de agua, donde se contendrá a un individuo experimental, 5 individuos por bloque

Los individuos fueron acomodados aleatoriamente entre tratamientos y entre bloques (Figura 8). Los bloques flotaban dentro de la alberca lo que provocó un calentamiento indirecto del agua por medio de convección térmica, manteniendo a todos los individuos a la misma temperatura. De igual forma, se les colocó tres termómetros acuáticos para registrar la temperatura.

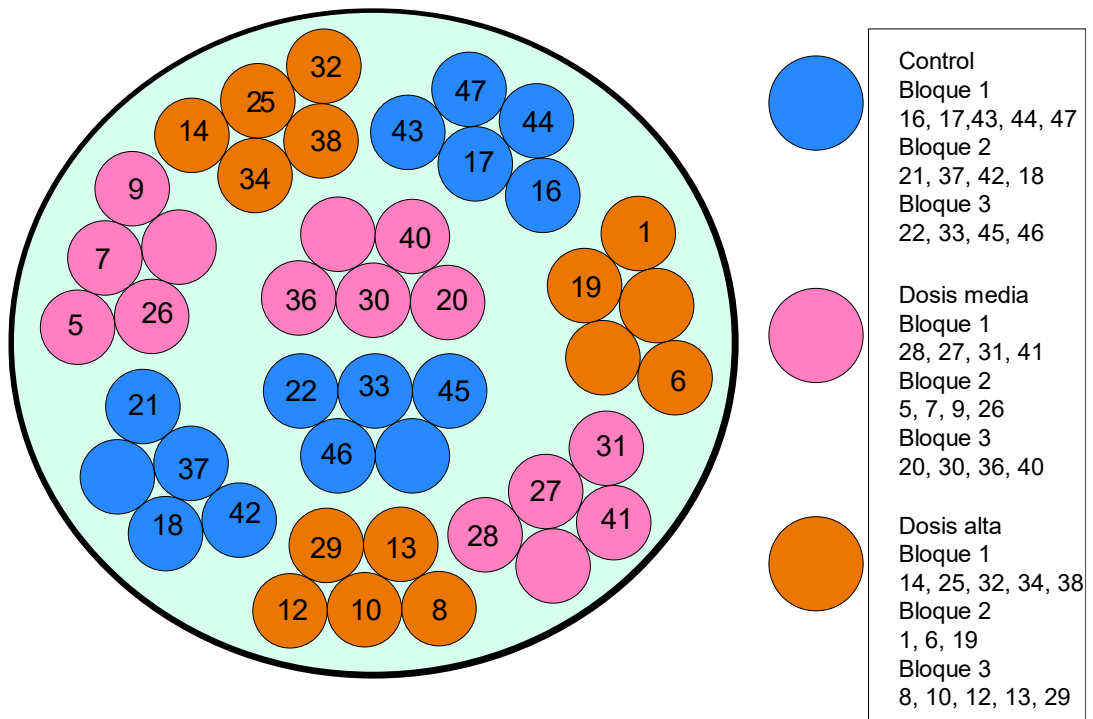


Figura 8. Distribución de los sujetos de experimento por tratamiento e identificación numérica

El estado de salud de los animales se verificaba mediante la observación de un nado sincronizado de los mismos y su vitalidad.

La limpieza se realizó cada tercer día, con un recambio del 80% de agua. El agua por colocar fue tratada con anticloro, azul de metileno y mantenida a una temperatura de 25°C. En una bitácora se registró: Semana, fecha, día, temperatura, alimentación, limpieza y observaciones.

### **6.2.6. Alimentación**

Toda la comida (tratamientos) se mezcló hasta obtener un polvo fino, después se mantuvo en almacenamiento dentro de botes opacos, y en un rango de temperatura de 10-22 °C. Solo se abrían a la hora de alimentar a los renacuajos agregándolo a los estanques donde inicialmente flotó, para luego hundirse, permitiendo que los renacuajos se alimentaran *ad libitum*.

### **6.2.7. Biometrías y pesaje**

El experimento inició el 16 de enero del 2020. Durante el experimento se hicieron siete mediciones, empezando con el día 0 (16/01/2020) y posteriores mediciones a los días 22 (07/02/2020), 36 (21/02/2020), 50 (06/03/2020), 57 (13/03/2020), 72 (28/03/2020) y 87 (12/04/2020). En esos días fueron pesados, medidos y se determinaba el estadio de metamorfosis a cada uno de los animales.

Las biometrías que se realizaron fueron:

1. Longitud total (LT): Desde el hocico hasta la punta de cola en centímetros.
2. Peso total (PT): En gramos
3. Índice de masa corporal (IMC): Relación entre el peso y la longitud total del renacuajo.

Los marcadores que se tomaron en cuenta fueron:

1. Tasa de metamorfosis (TM): Marcando el inicio de la metamorfosis (presencia de miembros posteriores), por grupo experimental.
2. Mortalidad Total (M): Calculada por grupo experimental.

3. Mortalidad dentro de la metamorfosis (MM): Calculada por grupo experimental, contemplando solo a los sujetos que iniciaron metamorfosis.

Se determinó la tasa de metamorfosis (TM), a través de la relación entre el número de animales metamorfoseados y el total de animales.

### **6.2.8. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza multivariado en un arreglo de un diseño completamente aleatorizado, de un solo factor con medidas repetidas (MANOVA). Donde el factor son los grupos (control, dosis media y dosis baja de vitamina E), la variable respuesta es el peso, longitud total e IMC.

Se utilizó un nivel de significación del 5% (0.05), las hipótesis fueron: hipótesis nula ( $H_0$ ): las medias serán iguales, e hipótesis alternativa ( $H_a$ ): Al menos una de las medias será diferente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis Químico Proximal

En el Cuadro 6 se presentan los resultados en base húmeda y base seca de: humedad, extracto etéreo, proteína cruda, fibra cruda, cenizas y por diferencia los carbohidratos, obtenidos del alimento comercial ofrecido a los renacuajos y el cual se utilizó como base para la alimentación en la fase de experimentación.

Cuadro 6. Análisis químico proximal del alimento comercial en base seca y base húmeda (g/100g).

	Alimento de Tilapia	
	Base seca	Base húmeda
Materia seca	100	93.84
Humedad	0	6.16
Proteína cruda	47.54	44.61
Extracto etéreo	19.83	18.61
Fibra cruda	1.56	1.46
Carbohidratos	19.52	18.32
Cenizas	11.55	10.84

### 7.2. Extracción y cuantificación de vitamina E

Siguiendo los protocolos de extracción de vitamina E, se prosiguió a utilizar el método de cromatografía de alta resolución para obtener, inicialmente, la curva de calibración con los estándares (Figura 9).

Posteriormente se obtuvo las concentraciones de vitamina E en el alimento de tilapia, en la Figura 10 se puede observar el cromatograma de un estándar de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). Y en la Figura 11 se puede observar el cromatograma de la muestra de alimento de tilapia, donde se puede ver ausencia de la curva específica de vitamina E.

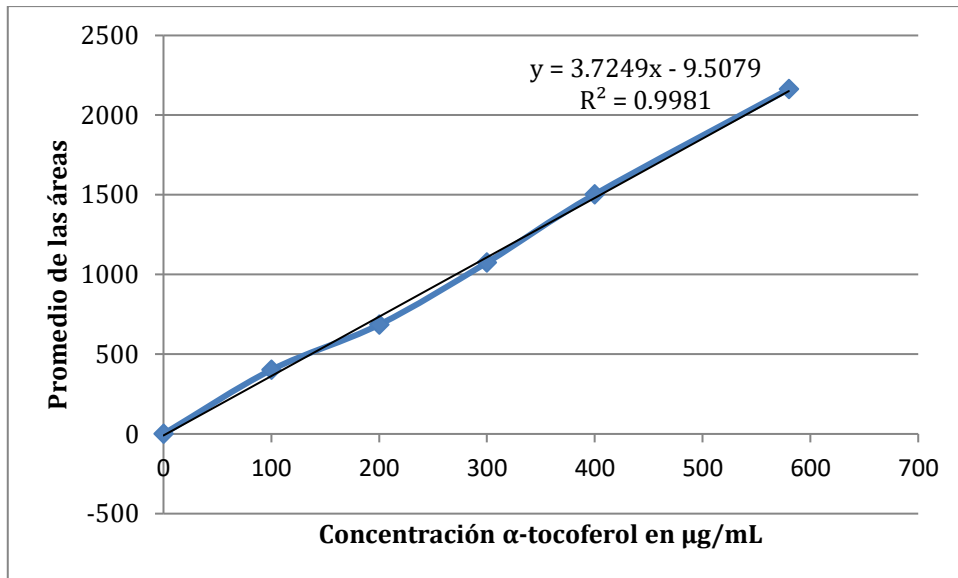


Figura 9. Curva de calibración de vitamina E

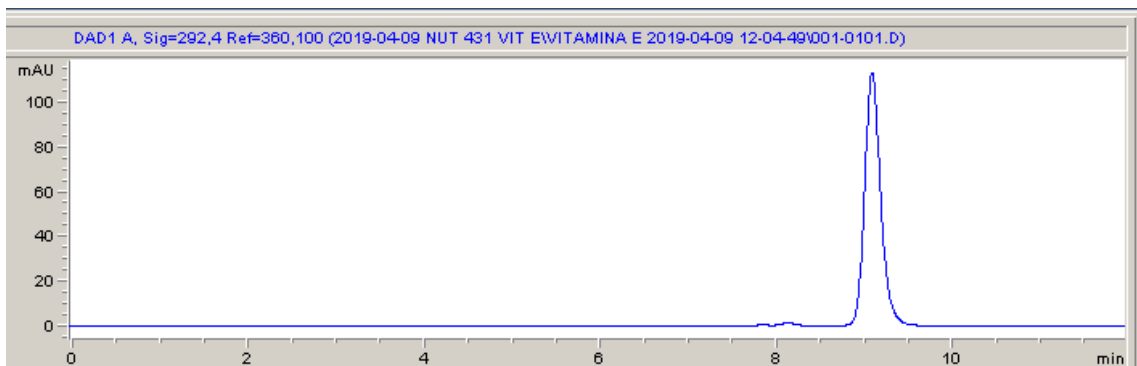


Figura 10. Cromatograma de la mezcla estándar de  $\alpha$ -tocoferol. Eje horizontal, tiempo en minutos; eje vertical, mili-unidades de absorbancia (mAU).



Figura 11. Cromatograma de las muestras de alimento para tilapia. Eje horizontal, tiempo en minutos; eje vertical, mili-unidades de absorbancia (mAU).



### 7.3. Peso

Cada tratamiento fue acomodado aleatoriamente (control, renacuajos alimentados con dosis media de vitamina E y renacuajos alimentados con dosis alta de vitamina E), los cuales contenían 13, 12 y 13 individuos respectivamente. Se les tomaron como medidas morfométricas el peso total, longitud total e Índice de masa corporal (relación entre el peso y la longitud de cada renacuajo), fueron registrados los días: 0, 22, 36, 50, 57, 72 y 85, y de estas medidas se obtuvieron respectivos promedios.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el peso entre los diferentes tratamientos ( $P=0.8566$ ), ni en la interacción tiempo y tratamiento (0.2258); únicamente se observa un cambio significativo a través del tiempo ( $p=0.0001$ ) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Peso promedio por grupo experimental a lo largo del tiempo.

Día	0	22	36	50	57	72	85
<b>Grupo 1 Control</b>	1.31	2.64	3.26	3.48	3.44	3.94	4.24
<b>Grupo 2 Dosis media VE</b>	1.45	2.52	3.13	3.49	3.36	3.66	4.03
<b>Grupo 3 Dosis alta VE</b>	1.42	2.23	3.08	3.44	3.4	3.75	3.97
<b>Promedio</b>	1.39	2.47	3.16	3.47	3.4	3.78	4.08

Los ejemplares del grupo experimental que consumían la dieta control fueron los que tuvieron un mayor aumento de peso en la última medición (día 85), los que consumían la dieta con dosis alta de vitamina E registraron el menor aumento de peso, como se representa en la siguiente gráfica. (Figura 12).

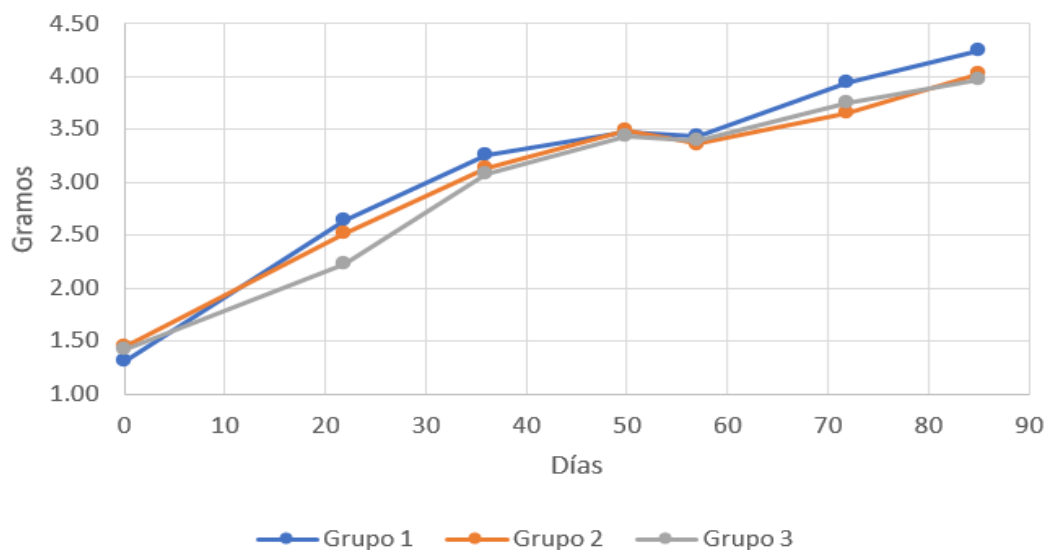


Figura 12. Ganancia de peso promedio (en gramos) por grupo experimental, a lo largo del experimento. Mediciones en el día 0, 22, 37, 50, 57, 72 y 87 (eje horizontal). Grupo 1 representa el control, grupo 2 representa el grupo con dosis media de vitamina E y el grupo 3 representa el grupo con dosis alta de vitamina E.

#### 7.4. Longitud total

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la longitud total entre los diferentes tratamientos ( $P=0.9819$ ), ni en la interacción tiempo y tratamiento ( $P=0.1495$ ); únicamente se observa un cambio significativo a través del tiempo ( $P=0.0001$ ) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Longitud total promedio en centímetros, por grupo experimental a lo largo del tiempo.

Día	0	22	36	50	57	72	85
<b>Grupo 1 Control</b>	6.32	6.89	7.53	7.75	7.71	7.94	8.16
<b>Grupo 2 Dosis media VE</b>	6.35	6.83	7.67	7.7	7.18	8.03	8.49
<b>Grupo 3 Dosis alta VE</b>	6.25	6.62	7.22	7.7	7.38	8.11	8.34
<b>Promedio</b>	6.31	6.78	7.47	7.72	7.42	8.03	8.33

Los ejemplares del grupo experimental que consumían la dieta con dosis media de vitamina E fueron los que tuvieron un mayor crecimiento en la variable longitud total, los que consumían la dieta control registraron el menor crecimiento, como se representa en la siguiente gráfica (Figura 13).

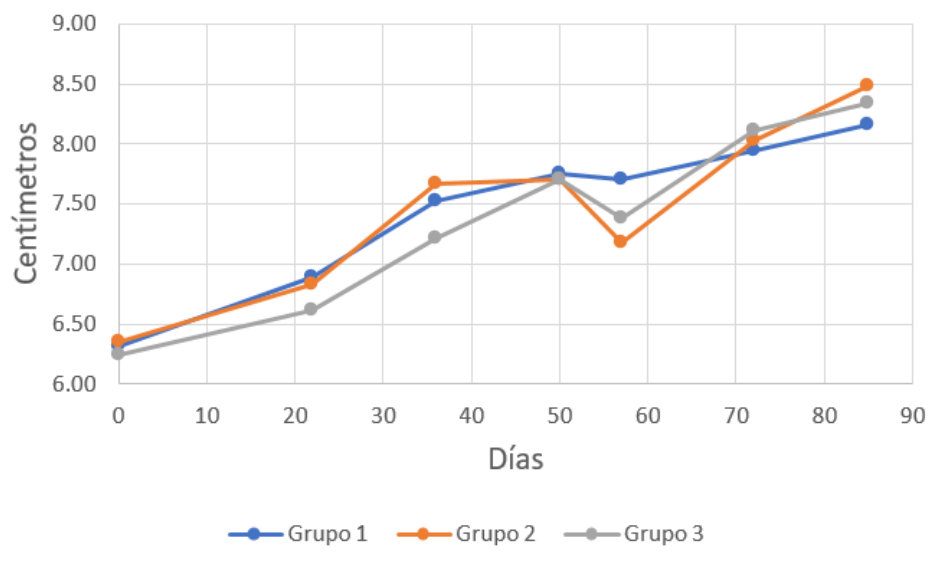


Figura 13. Longitud total promedio por grupo experimental, a lo largo del experimento. Mediciones en el día 0, 22, 37, 50, 57, 72 y 87 (eje horizontal). Grupo 1 representa el control, grupo 2 representa el grupo con dosis media de vitamina E y el grupo 3 representa el grupo con dosis alta de vitamina E.

## 7.5. Índice de masa corporal

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para índice de masa corporal entre los diferentes tratamientos ( $P=0.8258$ ), ni en la interacción tiempo y tratamiento ( $P=0.4286$ ); únicamente se observa un cambio significativo a través del tiempo ( $P=0.0001$ ) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Índice de masa corporal promedio por grupo experimental a lo largo del tiempo.

Día	0	22	36	50	57	72	85
<b>Grupo 1 Control</b>	0.202	0.374	0.425	0.444	0.441	0.489	0.510
<b>Grupo 2 Dosis media VE</b>	0.225	0.361	0.402	0.450	0.511	0.473	0.475
<b>Grupo 3 Dosis alta VE</b>	0.226	0.332	0.420	0.441	0.469	0.479	0.472
<b>Promedio</b>	0.218	0.356	0.416	0.445	0.474	0.480	0.485

Los ejemplares del grupo experimental que consumían la dieta control fueron los que tuvieron un mayor índice de masa corporal, los que consumían la dieta con dosis alta de vitamina E registraron el menor índice de masa corporal, como se representa en la siguiente gráfica (Figura 14).

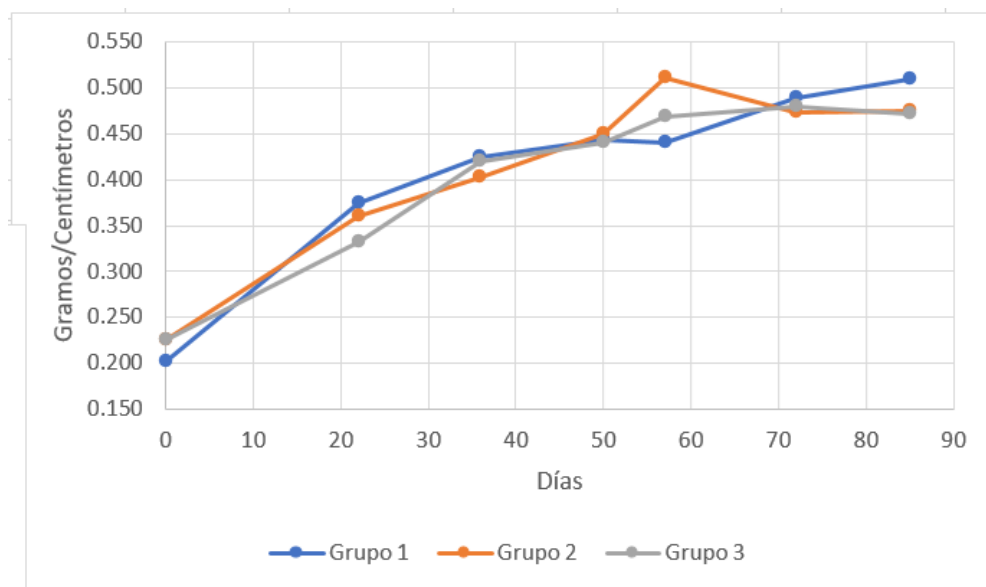


Figura 14. Índice de masa corporal promedio por grupo experimental, a lo largo del experimento. Mediciones en el día 0, 22, 37, 50, 57, 72 y 87 (eje horizontal). Grupo 1 representa el control, grupo 2 representa el grupo con dosis media de vitamina E y el grupo 3 representa el grupo con dosis alta de vitamina E.

## 7.6. Tasa de metamorfosis

El proceso de metamorfosis fue medido a lo largo del tiempo, contabilizando cualitativamente los caracteres que marcan el inicio de la metamorfosis, esto es la presencia de patas traseras. Siendo el grupo de dosis altas de vitamina E, el único en lograr, que desde el día 57 de experimentación, el 100% de los sujetos entraran en metamorfosis, y el único grupo en conseguir el 100%, el grupo control fue el que obtuvo una menor tasa de metamorfosis (Cuadro 10).

Cuadro 10. Tasa de metamorfosis por grupo experimental.

Día	0	22	36	50	57	72	85
<b>Grupo 1 Control</b>	0.000	53.85%	84.62%	84.62%	84.62%	92.31%	92.31%
<b>Grupo 2 Dosis media VE</b>	0.000	66.67%	66.67%	66.67%	91.67%	91.67%	91.67%
<b>Grupo 3 Dosis alta VE</b>	0.000	69.23%	92.31%	92.31%	100%	100%	100%

## 7.7. Mortalidad total y mortalidad en la metamorfosis

A lo largo del experimento se registraron los decesos, con ello se pudo obtener la mortalidad total por grupo experimental, el grupo con la mayor mortalidad fue

el control con un 38.46% de mortalidad final y el que obtuvo menor mortalidad fue el grupo de dosis alta de vitamina E con 23.07% (Cuadro 11).

Para poder calcular la mortalidad en la metamorfosis lo que se tomó en cuenta fue la cantidad de sujetos que entraron en proceso de metamorfosis y de estos cuantos fallecieron. Lo que da como resultado que el grupo con mayor mortalidad en la metamorfosis fue el grupo control (41.66%) y el que se encontró con menor mortalidad fue el grupo de dosis alta de vitamina E (23.07%) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Mortalidad total y mortalidad en la metamorfosis

	<b>Mortalidad</b>	<b>Mortalidad en la metamorfosis</b>
<b>Grupo 1 Control</b>	38.46%	41.66%
<b>Grupo 2 Dosis media VE</b>	25.00%	36.36%
<b>Grupo 3 Dosis alta VE</b>	23.07%	23.07%

## 8. DISCUSIÓN

El alimento El Pedregal “Microtek Peces extruido” cumplió con los valores reportados en el análisis garantizado de su etiqueta, a excepción de los valores de fibra cruda (máximo 1.2%) y proteína cruda (mínimo 50%) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis garantizado reportado en la etiqueta del alimento utilizado.

<b>Tipo de alimento</b>		<b>Análisis garantizado %</b>				
Nombre	Tamaño (mm)	Proteína (mín)	Grasa (mín)	Fibra (máx)	Cenizas (máx)	Humedad (máx)
Microtek Peces extruido	<0.4	50	16	1.2	11	10
Resultados		44.61	18.61	1.46	10.84	6.16

Como se ha comentado, los requerimientos nutricionales para los renacuajos de rana toro varían dependiendo la etapa pre-metamorfica en la que se encuentren. Conforme se comienza el proceso de metamorfosis, su tracto digestivo se va adaptando y modificando hasta finalizar siendo un organismo carnívoro. Durante el proceso, su alimentación suele consistir en una gran variedad de proteína de

origen vegetal inicialmente, para posterior ser completamente de origen animal, además de pasar por dos ocasiones de alimentación autógena (al eclosionar y al final de la metamorfosis) (FAO, 2009). Considerando lo anterior es de importancia tener en cuenta que, dentro de la etapa de renacuajo a rana, aportar una sola dieta no es lo más recomendado. Las dietas se deben ir adecuando a la etapa en la que se encuentran.

Los requerimientos de proteínas descritos en varios estudios sobre rana toro, se han estimado a partir de curvas de dosis-respuesta, proponiendo la cantidad mínima de proteína en la dieta que resultó en un crecimiento máximo (Cuadro 13) (Pelegrín, 2004), por lo que algunos de estos valores requeridos se han sobreestimado debido a una consideración inadecuada de factores dietéticos como: la concentración de energía de la dieta, el perfil de aminoácidos de la proteína de la dieta y la digestibilidad de la proteína de la dieta (Halver y Hardy, 2002).

Cuadro 13. Fuentes de proteína y niveles recomendados por diferentes autores (Pelegrín E., 2004).

Fuentes de proteína animal	Niveles de proteína (%)	Referencias
Harina de pescado	20-50	Fontanello <i>et al.</i> , 1982
Harina de pescado	40	Lima, 1988
-	33	Mazzoni, 1988
Harina de pescado	44.61	Carmona, 1996
Harina de calamar	20	Pelegrín, 2004

Las diferencias en las necesidades de proteína, hasta ahora reportadas por los diferentes autores que trabajaron con renacuajos de la misma especie, pueden ser debidas a la variabilidad en las fuentes proteicas en los estudios realizados y al estadio de desarrollo de los animales, lo que dificulta la comparación de los resultados (Pelegrín, 2004). Se plantea que la calidad de las fuentes proteicas empleadas en un alimento, es un elemento que facilita optimizar los niveles de inclusión, facilitando la digestibilidad del mismo (Pelegrín, 2004).

La calidad de la proteína en los ingredientes alimenticios depende de la composición de aminoácidos que la caracteriza y de la disponibilidad biológica de los mismos. En general, mientras más se aproxime el patrón de aminoácidos

esenciales de la proteína a los requerimientos dietéticos de aminoácidos esenciales de la especie en cuestión, mayor será su valor nutricional y utilización (Tacon, 1989).

Se debe considerar también, que los porcentajes antes mencionados se determinaron utilizando fuentes proteicas altamente digestibles y con buenos perfiles de aminoácidos. La dieta en vida libre de las larvas está compuesta en gran parte filtrado de fitoplancton y ramoneo de algas bentónicas (FAO, 2009); por lo que en cautiverio requiere una dieta cuyas fuentes de proteína tengan altos porcentajes de digestibilidad y un adecuado balance de aminoácidos. Por ejemplo, la harina de calamar cubre casi en su totalidad el espectro de aminoácidos esenciales presentes en el músculo de la rana toro, a diferencia de la harina de pollo, que es el principal ingrediente en el alimento de tilapia (Cuadro 14). Los principales ingredientes del alimento "Microtek extruido 0.4" aparte de la harina de pollo son: harina de sangre, pasta de soya, trigo y sus subproductos, aceite de pescado, lecitina de soya; con los que podemos considerar que el perfil de aminoácidos y la digestibilidad de la proteína que este alimento proporciona, se encuentran por debajo de los requerimientos de los renacuajos de rana toro.

Cuadro 14. Composición de aminoácidos esenciales en músculo de rana toro, harina de calamar y harina de pollo.

Aminoácidos (g /100 g muestra)	Rana Toro <sup>1</sup>	Calamar <sup>2</sup>	Harina de pollo <sup>3</sup>
Lisina	6.1	8.0	1.99
Leucina	5.9	7.7	-
Arginina	4.7	7.2	3.02
Valina	3.2	4.4	2.11
Isoleucina	3.1	4.9	1.76
Histidina	1.5	2.1	-
Treonina	3.3	5.1	1.7
Metionina	2.1	2.9	0.71
Fenilalanina	3.0	5.9	-
Triptófano	2.4	3.8	0.36
Cisteína	0.6	0.7	-

<sup>1</sup> Tomado de Massat, 1990; <sup>2</sup> Tacón, 1989; <sup>3</sup> Creswell, 2001.

Hay que resaltar que en producciones intensivas de ranas toros, el alimento concentrado para tilapia no es el principal recomendado (SEDER, 2005),

generalmente se utiliza un alimento con proteína de mejor calidad, que, aunque no hay uno específico para ranas toro, suele utilizarse el alimento para trucha con buenos resultados.

También hay que recalcar la importancia de las características intrínsecas del estanque y de las condiciones ambientales, como el alimento propio del estanque (algas, fitoplancton etc.) y el control de los factores fisicoquímicos (calidad de agua, temperatura, cantidad de luz, incluso la competencia por el espacio). Al no haber un control de algunos de estos factores podría verse afectada negativamente la metamorfosis (SEDER, 2005).

Como se pudo observar en el análisis de extracción de vitamina E, el alimento analizado "el pedregal extruido peces 0.4" no contenía vitamina E, sin embargo, no se podría asegurar que la marca o el tipo de alimento, en efecto, no contenga vitamina E, ya que se tendría que hacer más análisis en otros lotes, o descartar un mal manejo de almacenaje posterior a la adquisición del alimento (tiempo de almacenaje, luz, humedad). Se recomendaría hacer un análisis más detallado del alimento, para poder verificar la ausencia de vitamina E, y quizá otras vitaminas o minerales. Al ser el único alimento proporcionado en muchas producciones, podría estar causando deficiencias, afectando el rendimiento de la producción acuícola y ranícola (crecimiento, sobrevivencia, ganancias de peso, reproducción), en este caso.

En la producción Frog Style, habían comentado la presencia de renacuajos que al llegar a la metamorfosis no se podía concluir por la ausencia de miembros delanteros, esta malformación suele reportarse en producciones ranícolas que son alimentadas exclusivamente con alimento comercial, provocando deficiencias en la dieta (SEDER, 2005). Tomando en cuanto los resultados obtenidos en el análisis de vitamina, podemos concluir que la presencia de las malformaciones en la producción Frog Style es causa por una mala alimentación, al administrar alimento comercial para tilapia como único aporte, en la etapa de renacuajos.

En los estudios de Szuroczki, la dosis de  $\alpha$ -tocoferol que utilizaron en sus experimentos fueron de 2081  $\mu\text{g/g}$  (208.1 mg/100 g) (Szuroczki, *et al.*, 2016) y



1200 µg/g (120 mg/100 g) (Szuroczki, *et al.*, 2018) respectivamente, lo cual deja muy por debajo las dosis que se manejaron en el presente estudio, para poder ver un efecto. Aun así, se pudieron observar posibles efectos de la vitamina E tanto en la sobrevivencia dentro de la metamorfosis como el índice de inicio de metamorfosis, ya que en este estudio la dosis de 9.22 mg/100g alimento (dosis alta manejada) presentó mejores resultados en los indicadores anteriores. En otro estudio se mencionó que no hubo efectos de vitamina E hasta una dosis de 0.1mg/L (100 µg / L) que fue su dosis más alta (Jiang, 2019).

Los resultados de Szuroczki sugirieron que los antioxidantes de la dieta, específicamente la vitamina E, tienen un efecto positivo en el sistema inmunológico y la condición de los renacuajos, lo que les permite afrontar mejor una variedad de factores de estrés ambientales, una deficiencia en los nutrientes dentro de la dieta utilizada es causante de estrés y puede ser este antioxidante lo que marcó una ventaja en la sobrevivencia y capacidad de afrontar la metamorfosis de mejor manera (2019). Esto destaca la necesidad de investigar más a fondo el papel de estos compuestos, en varios aspectos de la salud de los renacuajos, particularmente a nivel fisiológico.

Incluso, Szuroczki menciona que la capacidad de los antioxidantes dietéticos para contrarrestar los efectos nocivos de los estresores abióticos y bióticos aumenta la posibilidad de su ingestión selectiva cuando sea necesario, es decir, la automedicación (2019), lo cual les da importancia a otros alimentos disponibles en sus estanques ricos en antioxidantes a parte de lo que se puede aportar con la dieta comercial.

Debido a que a los renacuajos se les permitió alimentarse *ad libitum*, es teóricamente posible que aquellos que recibieron dietas control y con niveles medios de antioxidantes comieran el doble de alimentos que los de tratamientos de alto nivel. En particular, esto representaría el doble de la ingesta calórica y presumiblemente resultaría en un mayor crecimiento / ganancia de masa en esos renacuajos, pudiendo explicar porque los pesos del control superaban al grupo de dosis alta (Szuroczki *et al.*, 2016).

El estadio en el que se inició el experimento fue G2 (día 0) y se puede observar que a los 57 días el grupo de dosis alta (9.22 mg/100 g) obtuvo el 100% de inicio de metamorfosis. Considerando que del amplexo al estadio G2 se mantuvieron en las condiciones correctas, los renacuajos tardaron hasta 35 días en llegar al estadio en el que fueron seleccionados para el experimento, sumando los días, fueron 92 días para conseguir llegar al estadio G3 dando inicio a la metamorfosis.

Según Castro, los miembros inferiores suelen presentarse entre los 50-100 días posterior al amplexo, y casi inmediatamente después, entre los días 55-120 surgen los miembros delanteros (2001), consiguiendo que el grupo de dosis 9.22 mg/ 100 g, este dentro de los parámetros descritos, sin embargo, en anfibios la metamorfosis es muy independiente al tiempo, ya que los factores que realmente intervienen son dependientes a las condiciones ambientales en las que se encuentren los renacuajos, si los renacuajos no están en un lugar que cumpla con las características, pueden mantenerse como renacuajos hasta un año, esperando encontrar las condiciones idóneas para la metamorfosis, la temperatura es uno de los factores más importantes (Amphibia, 2015).

El clima es tal vez uno de los factores más importantes y determinantes para el rápido desarrollo de la especie; por lo que los climas templados o calientes, con aguas que fluctúen entre los 20 y 33° C serán los más indicados para la siembra o la instalación de cultivo de ranas; a temperaturas mucho menores solo suelen retardar el crecimiento y la metamorfosis o incluso inhibirla (SEDER, 2005). Por esta razón uno de los factores que hay que darle más importancia en este estudio en particular, es la temperatura, ya que el presente estudio se realizó en invierno, que, aunque se mantuvieron la mayor parte del tiempo en el rango recomendado por la literatura, gracias a los calentadores, al hacer mediciones o cambios de agua, se podría resentir el cambio, además de difícilmente llegar a rangos medios o altos de temperatura. Lo que pudo afectar nuestros resultados. Este junto demás factores ambientales pudieron ser capaces de modificar los resultados, se recomendaría repetir el estudio en otra época del año, así como controlar la mayor cantidad de factores.

Los tamaños de muestra para esta prueba también pueden haber impedido nuestra capacidad para detectar más efectos de la dieta (Szuroczki *et al.*, 2016)

ya que no se consideran las diferencias como estadísticamente significativas (los p valores son grandes ( $p > 0,05$ ), pero eso no quiere decir que no lo sean desde un punto de vista clínico. Esto es especialmente cierto cuando las muestras en estudio son pequeñas (Barón, 2007).

## 9. CONCLUSIÓN

El alimento para tilapia al contener como principal ingrediente a la harina de pollo, podemos considerar que el perfil de aminoácidos y la digestibilidad de la proteína que este alimento proporciona, se encuentran por debajo de los requerimientos de los renacuajos de rana toro.

La suplementación de vitamina E en este estudio, no aportó diferencias significativas estadísticamente en los parámetros biométricos, sin embargo, visualmente se pudo observar una mayor supervivencia de aquellos grupos suplementados con vitamina E. Esto se puede deber a dosis de vitamina E utilizadas por debajo de la dosis efecto.

No obstante, posibles factores en la realización del proyecto, como, el tipo de alimentación *ad libitum*, alimento con aporte nutricional bajo, mal almacenaje del alimento, dosis bajas de inclusión de vitamina E, o errores en las mediciones, así como un número reducido de muestras etc., pudieron afectar el resultado. Se recomendaría repetir el estudio utilizando dosis mayores, como se menciona en otras literaturas, y disminuyendo factores de error, incluyendo factores ambientales.

Dada la importancia de la alimentación en esta etapa deben considerarse prácticas de manejo básicas que satisfagan mejor los requisitos nutricionales de los anfibios en los programas de cría en cautividad, incluyendo los complementos naturales que se encuentran en un estanque naturales, como las algas, que proporcionan parte importante de los nutrimentos.

## 10. REFERENCIAS

1. Abdollahi M. Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar S. y Rezaiee, A., (2004). "Pesticides and oxidative stress: a review" en *Medical Science Monitor* 10 (6) RA141-RA147
2. Allen, M.B. Thomas, D.M., Fries, L. y Goodwin, T.W., (1964). "The carotenoids of algae: pigments from some Cryptomonads, a Heterokont and some Rhodophyceae" en *J Gen Microbiol.* 34, pp 259-267.
3. Alonso, M., (1997). *Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermiacão em rã-touro, Rana catesbeiana Shaw, 1802.* Tesis de doctorado. San Pablo. Universidad de São Paulo.
4. Altig, R., Whiles, M.R. y Taylor, C., (2007). "What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats" en *Freshwater Biology.* 52, pp 386-395.
5. Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N. y Watanabe, T., (2000). "Effects of dietary betacarotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*". *Fisheries Science.* 66, pp 1068-1075.
6. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. y Hagen, T., (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging" *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.* 90, pp 7915-7922.
7. AOAC, (2015). *Association of Official Analytical Chemists.* 15a ed, Official Methods of Analysis. 15a ed.
8. Barón, F., (2007). *Instrucciones sobre cómo presentar la estadística en un trabajo científico,* UMA. España.
9. Bendich, A., (1989). "Carotenoids and the immune response" en *Journal of nutrition* 119, pp 112-115.
10. Bendich, A., (1996). "Antioxidant vitamins and human immune responses" en Litwack, G. (Ed.) *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications.* Academic Press Inc., San Diego, pp. 35-62.
11. Benzie, I., (2003). "Evolution of dietary antioxidants" en *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 136, pp 113-126.
12. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. y Kalayci, O., (2012). "Oxidative stress and antioxidant defense" en *World Allergy Organ. J.* 5, pp 9-19.
13. Carmona C., Olvera M. A., Rodríguez M. y Flores A., (1996) "Estimation of the protein requirement for bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles, and its effect on metamorphosis ratio" en *Aquaculture.* Vol 141 pp 223-31

14. Carrión P., Carrión, F., Costa, G. y Costa, J., (2010). *Plan para el mejoramiento de la producción y comercialización de rana catesbeiana en la anfigranja rana bonita para el período 2010-2014*. Tesis de maestría. Ecuador. Universidad nacional de Loja.
15. Catoni, C., Peters, A. y Schaefer, H., (2008). "Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants" en *Animal Behaviour*. 76, pp 1107-1119.
16. Castro, F. W., (2001). *Estudio de factibilidad para la producción y exportación de rana toro (Rana catesbeiana Shaw)*. Tesis de licenciatura. Honduras. ZAMORANO, Gestión de Agronegocios.
17. Chew, B. P., (1993). "Role of carotenoids in the immune-response" en *Journal of Dairy Science*. 76, pp 2804-2811.
18. Chew, B. P. y Park, J., (2004). "Carotenoid action on the immune response" en *Journal Nutrition*. 134, pp 257-261S.
19. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P., (2013). "Functional properties of carotenoids originating from algae" en *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93, pp 5-11.
20. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA), (2017). "Ranicultura produce 228 toneladas anuales con valor superior a 10 mdp" [En línea]. México, disponible en: <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/ranicultura-produce-228-toneladas-anuales-con-valor-superior-a-10-mdp> (Acceso: 8 noviembre 2019)
21. Coppo, J., (2003). "El medio interno de la "rana toro" (Rana catesbeiana, Shaw 1802)" en *Revista Veterinaria*, 14 (1), pp. 25-41.
22. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR), (2018). "Plan de Prevención, Control y Manejo (PPCM) de Rana Toro (Rana catesbeiana) en la Jurisdicción CAR" en *Dirección de recursos naturales*. [En línea] Bogotá, Colombia, disponible en: <https://www.car.gov.co/uploads/files/5b9034317f619.pdf> (Acceso: 10 noviembre 2019)
23. Creswell, D. y Swick, R.A., (2001). "Formulating with digestible amino acids" en *Asian Poultry Magazine*. Vol 9.
24. Cribb, A., Afonso, A. y Monástico, C., (2013). *Manual Técnico de Ranicultura*. Rio de Janeiro: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).
25. Cuco, M., Guasco, B., Malacarne G. y Ottonelli, R.,(2006). "Effects of beta-carotene supplementation on chick growth, immune status and behaviour in the grey partridge *Perdix perdix*" en *Behavioural Processes* 73, pp 325–332.

26. Dierenfeld, E. S., (1989). "Vitamin E deficiency in zoo reptiles, birds, and ungulates" en *Proceedings of the Nutrition Society*, 56 (3). Pp 989-999.
27. Donoghue, S., (2006). *Nutrition. En Reptile Medicine and Surgery*. 2da edición. Marder D. R., Elsevier Saunders, pp 289-290.
28. Driver, C. y Georgeou, A., (2003). "Variable effects of vitamin E on *Drosophila* longevity" en *Biogerontology*. 4, pp 91–95.
29. Fioranelli, S., Bernardis, A.C., Barboza, N. N., Mussart, N. B. y Coppo, J. A., (2004). *Efectos de diferentes dietas sobre composición química de la carne de rana toro (*Rana catesbeiana*)*. Argentina, Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de ciencias.
30. Flores, A.N., (1999). *Cultivo Intensivo de Rana Toro*. Yucatán, México. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. p 43.
31. Fontanello D., Arruda H., Mandelli J. y Reis J. M., (1982). "Desenvolvimento ponderal de girinos de ra-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), criados com racao de diferentes niveis proteicos" en *Boletim do Instituto de Pesca*. Vol 9, pp 125-9
32. Freel, T., (2019). *Cane Toad (*Rhinella marina*) Vitamina A, Vitamina E and Carotenoid Kinetics whit Potencial Stress Measure*. Tesis maestría en ciencias. Universidad estatal de Carolina del norte.
33. Frost, D., (2013). "Amphibian Species of the World: an Online References". Version 5.6. en *Electronic Database accessible at American Museum of Natural History*. [En línea] New York, USA, disponible en: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/> (Acceso: 4 noviembre 2021)
34. Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J. y De Cooman, L., (2012). "Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content". en *Journal of Applied Phycology*. 24, pp 1477-1486.
35. Gutierrez Olvera, C. y Cossio Carpintero, K. (2014) *Manual de nutrición y alimentación de perros y gatos*. México: FMVZ - UNAM.
36. Halliday, T. y Adler, K., (2007). *La gran enciclopedia de los anfibios y reptiles*. Madrid. Libsa, p 240.
37. Halver, J. E. y Hardy, R. W. (2002) *Fish nutrition*. 3a ed, California, USA, Academic Press - Elsevier Science.
38. Harvey A., Kind K. y Thompson, J., (2002). "REDOX regulation of early embryo development" en *Reproduction*. Vol. 123 (4) pp 479–486. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230479>
39. Hayashi, C., Soares, C., Gaidioli, E., Rossetto, V., Furuya, B., y Boscolo, R., (2004). "Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw,

- 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede” en *Bras.Zootec*, 33(1).
40. Horak, P., Ots, I., Vellau, H., Spottiswoode, C. y Møller, A.P., (2001). “Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits” en *Oecologia* 126, pp 166-173.
41. Hughes, D.A., (1999). “Effects of carotenoids on human immune function” en *Proceedings of the Nutrition Society*. 58, pp 713-718.
42. Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA), (2012). “Rana Toro” en *Acuacultura*. México, disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-rana-toro> (Acceso: 4 noviembre 2019)
43. International Union for Conservation of Nature (IUCN), (2006). “Global Amphibian Assessment”. Disponible en: <http://www.globalamphibians.org> (Acceso: 1 agosto 2021)
44. Instituto Linus Pauling, (2015). “Vitamina E”. Universidad estatal de Oregon, USA, disponible en: <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/vitamina-E> (Acceso: 22 diciembre 2021)
45. Jiang, L., Chen, A., Niu, F., Zhang, Y., (2019). “Antioxidant vitamin E protects embryos of *Xenopus tropicalis* against lambda-cyhalothrin induced embryotoxicity” en *Investigación en ciencias ambientales y contaminación*. Vol. 26 pp 21629–21640
46. Latney, L. y Clayton, L., (2014). “Updates on Amphibian Nutrition and nutritive Value of Common Feeder Insects” en *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. Vol 17 (3) pp 347-367.
47. Lima S. L., Agostinho C. A., (1988). *A criação de rãs*. Rural Colecao de Agricultor, Pequenos animais. Río de Janeiro: Publicacoes Globo.
48. Loft, S., Astrup, A., Buemann, B. y Poulsen, H.E., (1994). “Oxidative DNA-damage correlates with oxygen-consumption in humans” en *The FASEB Journal*. 8, pp 534-537.
49. López O., Hernández, A., Rodriguez, L. y Gil, F., (2007) “Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides” en *Toxicology Letters*. Vol 171 (3) pp 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.05.004>
50. Márquez, M., Yépez, C. E., Sutil-Naranjo, R. y Rincón, M., (2002). “Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E” en *Investigación Clínica*, 43(3), pp. 191-204.
51. Massat C. y Álvarez, J., (1990). *El libro de la cría de ranas*. Buenos Aires: PuntoSur S.R.L.



52. Matthew, L., Dierenfeld, E. y Fitzpatrick, M., (1998). "Nutrient Composition of Whole Green Frogs, *Rana clamitans* and Southern Toads, *Bufo terrestris*" en *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. Vol. 8(3), pp. 17-20.
53. Mazzoni, R., (2001). *Ranicultura, manual básico para inversores*. Proyecto ranicultura DINARA/IIP. Uruguay: Montevideo.
54. Mazzoni R. y Carnevia D., (1988). Estado actual de la ranicultura en Uruguay. Paper presented at *VI Encontro Nacional de Ranicultura*, Rio de Janeiro, Brasil. pp 117-182
55. McWilliams, D. A., (2008). Nutrition Recommendation for some Captive Amphibian Species (Anura and Caudata). Garn Narg
56. Ogilvy, V., Preziosi, R., (2012). "Can carotenoids mediate the potentially harmful effects of ultraviolet light in *Silurana (Xenopus) tropicalis* larvae?" en *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 96, pp 693-699.
57. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), (2009). "*Rana catesbeiana*. In Cultured aquatic species fact sheets" en *división de pesca y acuicultura*. [En línea] México, disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana\\_catesbeiana/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/es) (Acceso: 23 septiembre 2019)
58. Padmore, J., (2005). "Animal feed" en Chaper, E. (ed.), *Official methods of analysis*. 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Maryland, USA, pp 69-91.
59. Parra, G., Flores, O. y Mendoza, C., (2014). "Biodiversidad de anfibios en México" en *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Suplo. 85:S460-S466.
60. Pelegrín E., (2004). "Efecto de diferentes niveles de proteína en la dieta de renacuajos de Rana Toro (*Rana catesbeiana*)" en *Comunicación científica*, pp 557-565
61. Rangel, M., (2017). *Protocolo para la reproducción, incubación y crecimiento de Rana Toro Americana (Lithobate catesbeianus Shaw, 1802), en condiciones controladas en México*. Tesis de maestría. México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
62. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), (2015). "La ranicultura una opción en acuicultura" en *Agricultura y desarrollo rural*. [En línea]. México, disponible en: <https://sader.jalisco.gob.mx/fomento-acuicola-y-pesquero-e-inocuidad/691> (Acceso: 20 septiembre 2019)
63. Sanchez, L., (2016). *Desarrollo e implementación de métodos analíticos para la determinación y cuantificación de vitamina A, E y C en jugos y productos lácteos*

- usando cromatografía líquida de alta eficiencia con detectores ultravioleta visible multivariable. Tesis licenciatura. Universidad industrial de Santander. Colombia.
64. Schieber, M. y Chandel, N., (2014). "ROS function in redox signaling and oxidative stress" en *Current Biology* 24(10): R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
65. Seale, D. y Beckvar, N., (1980). "The comparative ability of Anuran larvae (Genera: *Hyla*, *Bufo* and *Rana*) to ingest suspended blue-green algae" en *Copeia* 1980, 493-503.
66. Secretaria de desarrollo rural (SEDER), (2005). "Manual para el cultivo de rana toro (rana catesbeiana)". [En línea] Nayarit, México, disponible en: **¡Error! Referencia de hipervínculo no válida.** (Acceso: 20 septiembre 2019)
67. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), (2016). "Manual de buenas prácticas de producción acuícola de rana toro". [En línea] México, disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/buenas-practicas-de-produccion-acuicola-de-rana-de-toro> (Acceso: 22 septiembre 2019)
68. Shüep, W., (1997). *Análisis de vitaminas en los alimentos*. en Morón, C., Zacarías, I., De Pablo, S., (ed.). *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Santiago, Chile. Disponible en: <http://www.fao.org/3/AH833S00.htm#Contents> (Acceso: 9 diciembre 2019)
69. Singh, U., Devaraj, S. y Jialal, I., (2005) Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*. 25(1):151–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132446>
70. Stoks, R., Block M. y McPeck, M., (2006). "Physiological costs of compensatory growth in a damselfly" en *Ecology* 87, pp 1566–1574.
71. Sunarić, S., Lalić, J. y Spasić, A., (2017). "Simultaneous Determination of Alpha-Tocopherol and Alpha-Tocopheryl Acetate in Dairy Products, Plant Milks and Health Supplements by Using SPE and HPLC Method" en *Food Analytical Methods*. Vol. 10 pp 3886–3901. DOI 10.1007/s12161-017-0943-x
72. Szuroczki D., Koprivnikar J. y Baker, R., (2016). "Dietary antioxidants enhance immunocompetence in larval amphibians" en *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 201, 182–188. Elsevier. Canada
73. Szuroczki D., Koprivnikar J. y Baker, R., (2018). "Effects of dietary antioxidants and environmental stressors on immune function and condition in *Lithobates* (*Rana*) *sylvaticus*" <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.017>
74. Tacon A., (1989). *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Proyecto Aquila II*. Documento de Campo No. 4

75. Toshiaki, H., (2004). "Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan" en *University Farm*, Facultad de agricultura, Ehime Universidad, Japón, pp 799-2 424.
76. Vitt, L. y Caldwell, J., (2009). *Herpetology an introductory biology of amphibians and reptiles*. Burlington, Massachusetts. Academic Press, 697 p.
77. Von Lintig, J., (2010). "Colors with functions: elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism" en *Annual Review of Nutrition*. 30, 35-56
78. Wehr, J. y Sheath, R., (2003). "Freshwater habitats of algae" en Wehr, J. y R. Sheath, (Eds), *Freshwater Algae of North America*. Academic Press, San Diego, pp. 11-57.
79. Zaidi S. y Banu, N., (2004). "Antioxidant potential of vitamins A, e and C in modulating oxidative stress in rat brain" en *Clinica Chimica Acta*. 340(1-2):229-233. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.11.003>