



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTO DE DOS DIETAS DE DIFERENTE ORIGEN
PROTEICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y DENSIDAD ÓSEA
EN *Xenopus laevis*”**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ALITZIN PAMELA CRUZ CÁZARES

ASESOR

DRA. CARLA GARCÍA MORALES

CO-ASESOR

DRA LETICIA BUENDIA GONZÁLEZ



TOLUCA, MÉXICO JULIO DE 2021

TABLA DE CONTENIDOS

Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Resumen	vi
Capítulo I: Introducción y antecedentes	1
La Nutrición	1
Los nutrientes.....	2
Clasificación bioquímica: Composición y propiedades	3
Dieta.....	10
El omnivorismo	11
Dieta carnívora y pescetarianismo	13
Vegetarianismo.....	14
Modelos de estudio en la investigación: <i>Xenopus laevis</i>	19
Características físicas generales de <i>X. laevis</i>	20
Reproducción y genética de <i>X. laevis</i>	21
Capítulo II: Justificación	24
Objetivos	24
General:.....	24
Específicos:	24
Hipótesis	25
Capitulo III: Métodos	26
Sexado de organismos por PCR	26
Extracción de ADN.....	26
Optimización de PCR punto final	27
Optimización de PCR multiplex.....	28

Sexado de organismos juveniles.....	29
Formulación de dietas experimentales	30
Formación de grupos.....	31
Alimentación y crecimiento	32
Establecimiento del número Hounsfield en órganos de <i>X. laevis</i> :.....	33
Capítulo IV: Resultados y discusión	35
Pruebas moleculares para sexado	35
Efecto de las dietas sobre parámetros de crecimiento de <i>X. laevis</i>	46
Efecto de las dietas sobre densidad ósea en <i>X. laevis</i>	62
Tomografía Computacional y unidades Hounsfield.....	68
Capítulo VI: Conclusiones y Perspectivas	71
Referencias.....	73
Anexo 1. Resultados BLAST	81
Anexo 2. PCRs virtuales para determinar el tamaño del amplicón	86

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los aminoácidos por la capacidad de síntesis en el cuerpo humano ...	8
Tabla 2. Primers identificados para GDS en <i>X. laevis</i>	36
Tabla 3. Resumen de resultados BLAST y PCR virtual.....	37
Tabla 4. Concentración y calidad de ADNg control con los diferentes métodos de extracción ..	41
Tabla 5. Comparativo de análisis bromatológicos en alimentos elaborados.....	47
Tabla 6. Valores promedio de parámetros de crecimiento en peso entre dietas (tratamientos) y sexos	50
Tabla 7. Unidades Hounsfield promedio de órganos de <i>X. laevis</i> y humano.	70

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de un aminoácido.....	7
Figura 2. Macho juvenil albino <i>X. laevis</i>	20
Figura 3. Individuos albinos juveniles y adultos de <i>X. laevis</i>	35
Figura 4. Representación esquemática de loci específico de Z y W en <i>X. laevis</i> cromosoma 2L (XLA2L).....	39
Figura 5. Recolección de sangre total de zona interdigital de <i>X. laevis</i>	40
Figura 6. Optimización de Tm de dm-w.....	42
Figura 7. Productos de PCR	43
Figura 8. Optimización de PCR multiplex para sexado genético	44
Figura 9. PCR multiplex	44
Figura 10. Sexado de individuos <i>X. laevis</i> juveniles	45
Figura 11. Peso promedio hembras juveniles	49
Figura 12. Peso promedio machos juveniles	49
Figura 13. LHC promedio hembras juveniles	51
Figura 14. LHC promedio machos juveniles	52
Figura 15. Organismos hembra juveniles.....	53
Figura 16. Individuos machos juveniles.....	54
Figura 17. Peso individuos adultos.....	55
Figura 18. LHC individuos adultos.....	56
Figura 20. Ilustración de proceso de determinación de densidad ósea de fémur.	63
Figura 21. Densidad Ósea promedio de hueso cortical de fémur en organismos experimentales	64
Figura 22. Macho y hembra adultos <i>X. laevis</i> escaneados por mamógrafo.....	69
Figura 23. Proceso de análisis de HU de órganos de <i>X. laevis</i>	69
Figura 24. DM-W (Fwd).....	81

Figura 25. DM-W (Rev)	81
Figura 26. W specific 1 (Fwd).....	81
Figura 27. W specific 1 (Rev)	82
Figura 28. W specific 3 (Fwd).....	82
Figura 29. W specific 3 (Rev)	82
Figura 30. DMRT1 (Fwd)	83
Figura 31. DMRT1 (Rev).....	83
Figura 32. Z specific 1 (Fwd).....	84
Figura 33. Z specific 1 (Rev)	85
Figura 34. Z specific 2 (Fwd).....	85
Figura 35. Z specific 2 (Rev)	85
Figura 36. PCR de DM-W	86
Figura 37. PCR de W-specific 1	86
Figura 38. PCR de W-specific 3.....	87
Figura 39. PCR de DMRT1 (mRNA)	87
Figura 40. PCR de DMRT1 (DNA)	88
Figura 41. PCR de Z-specific 1	88

Resumen

La cultura de la dieta ha cambiado en los últimos años, permitiendo que una gran parte de la población diversifique sus hábitos, y que dietas como el vegetarianismo se extiendan más en regiones anteriormente dominadas por las dietas omnívoras altas en consumo de carne, grasas y azúcares. La sustitución del origen de nutrientes es necesaria para lograr una nutrición adecuada y el organismo cumpla satisfactoriamente sus funciones, siendo la proteína uno de los nutrientes más importantes. Generalmente, la proteína vegetal ha sido catalogada de baja calidad pues esta no provee la cantidad necesaria de aminoácidos esenciales, sin embargo, en los últimos años se determinó que la soya, es una planta capaz de proporcionar a la dieta una proteína de alta calidad en la alimentación.

Los efectos que tiene la sustitución del origen de los nutrientes han sido analizados mayormente en humanos, pero también existe una gran variedad de modelos de estudio que pueden proporcionar información relevante sobre dichos efectos. *Xenopus laevis*, es un modelo con grandes aportes en aspectos de reproducción y genética, aunque otros elementos acerca de su ciclo de vida han sido dejados de lado; ante tales precedentes, este trabajo evaluó el efecto que tiene el origen proteico de la dieta (vegetal y animal) en el desarrollo, crecimiento y salud ósea de *X. laevis*, empleando técnicas no invasivas y no letales para el estudio y seguimiento de los organismos.

Se realizó una optimización de la técnica de determinación del sexo por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final en individuos juveniles. Durante el periodo de alimentación experimental se realizó un seguimiento de los parámetros de desarrollo de los organismos [peso y longitud Hocico-Cloaca (LHC)] para evaluar el efecto de la dieta y mediante tomografías computarizadas (CT) se determinó la densidad ósea de fémur de los organismos experimentales. Las unidades Hounsfield (HU) de los órganos de *X. laevis* fueron determinadas usando los órganos diseccionados de un macho y hembra adultos.

Del sexado genético de 17 individuos juveniles se distinguieron 7 hembras y 10 machos. Se formaron 6 grupos (3 dietas, 2 sexos) experimentales con pesos y tallas similares y después de 16 semanas de alimentación se observaron diferencias de crecimiento en los individuos de la dieta carnívora y omnívora con respecto a los individuos de la dieta vegetariana. Los análisis estadísticos no demostraron diferencias significativas entre las dietas experimentales en machos y en hembras en las variables de peso final y LHC, ni en los parámetros de ganancia de peso y

tasa de crecimiento, sin embargo, se distinguieron tendencias visuales que sugieren el efecto negativo de la proteína de soya en el aumento de peso y el retraso del crecimiento en la longitud.

Los efectos sobre la densidad ósea de los organismos demuestran que existe una mayor densidad ósea en los organismos que fueron sometidos a la dieta omnívora y carnívora en comparación con la obtenida de los organismos con dieta vegetariana, pues existe una relación directa entre el peso y talla (medidas morfométricas) con la densidad ósea, pero no se puede determinar que el efecto generado sea dependiente de la proteína.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que existe una tendencia de crecimiento superior en la dieta carnívora y omnívora que sugiere que a pesar de la disponibilidad similar de proteína en los alimentos experimentales, existen aspectos fisiológicos en el organismo que no permiten el total aprovechamiento de los nutrientes, entre ellos la preferencia por los distintos alimentos suministrados a los organismos y la presencia de anti-nutrientes en la soya que pueden reducir en gran proporción el aprovechamiento de la proteína y otros nutrientes importantes para el crecimiento como el calcio.

Capítulo I: Introducción y antecedentes

En los últimos años, con la creciente preocupación por las enfermedades crónicas como la obesidad, las tendencias de alimentación se han diversificado, no solo porque el acceso a una extensa variedad de alimentos es cada vez más sencillo, sino además, porque gracias a la información sobre la importancia de una correcta alimentación para una buena salud se ha logrado una mayor conciencia sobre la elección adecuada de los elementos integrativos de la dieta, de tal forma que estos cumplan sus funciones energéticas y sensoriales. Una tendencia social muy recurrente en los últimos años en relación con la selección del alimento es el vegetarianismo, un movimiento dietético que ha demostrado ofrecer beneficios a la salud y que ha sido adoptado no solo por sus ventajas nutricionales sino además por el apoyo a la sustentabilidad del ambiente y el respeto a los derechos animales y la religión. A pesar de los beneficios que demuestra la dieta vegetariana y el apoyo que ha tenido de profesionales de la salud, al ser una dieta que excluye elementos dietéticos provenientes de cualquier fuente animal considerada de calidad, ésta debe ser adecuadamente planeada para que el cuerpo realice todas sus funciones correctamente.

La proteína es uno de los nutrientes con más funciones en el organismo, por lo que es fundamental hacer la correcta sustitución de su fuente de consumo en la dieta. La proteína vegetal generalmente es considerada como de baja calidad, debido a que no proporciona todos los aminoácidos esenciales, sin embargo, existen algunas fuentes vegetales como la soya que proporcionan proteína de alta calidad y además ha demostrado sus beneficios en humanos adultos. A pesar de la basta cantidad de estudios sobre los beneficios de la dieta vegetariana en adultos ([Craig y Mangels \(2009\)](#); [Key et al., 2006](#); [Lietzmann, \(2005\)](#); [Rojas-Allende et al., \(2017\)](#)), no se ha estudiado a profundidad si la alimentación con proteína vegetal de personas en una etapa activa de desarrollo podría repercutir en la reproducción y crecimiento de estos, por lo que realizar estudios con organismos modelo para identificar los efectos que tiene el origen proteico de la dieta en el crecimiento resulta de gran importancia.

La Nutrición

La nutrición es la ciencia de los alimentos, los nutrientes y las sustancias en ellos, y está encargada de estudiar el proceso por el cual un organismo obtiene las sustancias necesarias

para cubrir la mayoría de sus necesidades fisiológicas a través del alimento. La nutrición incluye un conjunto de eventos involuntarios e inconscientes que se encargan de obtener, asimilar y metabolizar las sustancias ingeridas para ser utilizados como energía o para ser incorporados a las distintas estructuras corporales ([Vega Franco e Iñarritu Pérez, 2010](#); [Vértice, 2010](#)). La nutrición es un conjunto de fenómenos que no solo incluye procesos químicos, fisiológicos, biológicos y celulares encargados de ingerir, digerir, absorber, transportar, utilizar y eliminar las distintas sustancias obtenidas del alimento, sino además considera los eventos por los cuales se logra este proceso de obtención y sus consecuencias, como lo son aspectos sociales, económicos y culturales que en conjunto actúan e interactúan en relación con la salud y la enfermedad ([Casanueva y Bourges-Rodríguez, 2008](#); [Téllez Villagómez, 2014](#); [Vega Franco e Iñarritu Pérez, 2010](#)).

La alimentación, como primera etapa de la nutrición es un proceso que contempla una serie de actos voluntarios y consientes que cumplen con la función de elegir, preparar e ingerir alimentos que proporcionen al cuerpo los nutrientes necesarios y los cuales dependen de los requerimientos nutricionales individuales. La demanda de nutrientes no es igual para todos, pues ésta sufre modificaciones por diversos factores como la edad, sexo, estado fisiológico, composición corporal, actividad física y características particulares de cada individuo. La alimentación y la salud tienen una estrecha relación, por lo que, que un individuo tenga una buena alimentación es decisiva en el correcto crecimiento y el desarrollo físico e intelectual ([Bourges-Rodríguez, 2008](#); [Calañas-Continente et al., 2017](#); [Ortega y Requejo, 2015](#); [Vértice, 2010](#)).

Los nutrientes

Puede entenderse como nutriente o nutrimento a toda aquella sustancia química asimilable necesaria para la vida y la funcionalidad de los organismos. El cuerpo es capaz de producir pequeñas cantidades de algunos nutrientes, sin embargo, la mayoría de éstos deben ser obtenidos de los alimentos consumidos para cumplir sus funciones al metabolizarse, transformarse y organizarse ([Roth, 2007](#); [Vértice, 2010](#)). Cada nutriente cumple al menos una de sus tres funciones y por lo tanto pueden ser clasificados de acuerdo con éstas:

1. Función energética: suministran energía al cuerpo a través de procesos oxidativos.
2. Función estructural: proporcionan los materiales que se requieren para la formación de las estructuras corporales. Esta función es la encargada del crecimiento, cuidado y renovación de los tejidos.

3. Función reguladora: provee las sustancias necesarias para llevar a cabo el metabolismo celular, los procesos corporales y su regulación.

Los distintos nutrientes son importantes para cumplir con su función asignada, sin embargo, no actúan de manera individual, sino que es necesaria la interacción con otros nutrientes para cumplir su función con eficacia ([Ortega y Requejo, 2015](#); [Téllez Villagómez, 2014](#)). Existe otra clasificación entre ellos tomando en cuenta el criterio de la disponibilidad, dentro de la cual existen 3 tipos: a) Nutrientes esenciales: son aquellos que el cuerpo necesita para sus funciones, pero no puede sintetizar, por lo que es necesario obtenerlos de los alimentos en los que se encuentran; b) nutrientes no esenciales: el organismo es capaz de producirlos o sintetizarlos por sí mismo a través de otras sustancias; y c) nutrientes condicionalmente esenciales: en la mayoría de las situaciones el cuerpo es capaz de sintetizar la cantidad suficiente de estos nutrientes, sin embargo en circunstancias especiales es necesario su consumo pues no se produce la cantidad óptima. Esta clasificación es comúnmente utilizada en términos de nutrición, sin embargo, no es un criterio adecuado de clasificación general, ya que está basado en las características del consumidor y no en el nutrimento, sin embargo, para consideraciones de la alimentación en diferentes organismos, no solamente del ser humano, es importante tener en cuenta los nutrimentos que cada uno necesita dentro de su dieta ([Casanueva y Bourges-Rodríguez, 2008](#); [Lutz y Przytulski, 2011](#)).

Clasificación bioquímica: Composición y propiedades

Por último, es necesario clasificar a los nutrimentos de acuerdo con su tipo, entre los que se encuentran seis grupos:

1. Agua

El agua es vital para la supervivencia ya que constituye la mayor parte del cuerpo humano, además de ser un nutriente que consumimos en su forma pura. Más de la mitad del peso corporal es agua, debido a que está presente en diversas partes y cavidades del cuerpo (células, sangre, vasos linfáticos, tejidos: muscular, grasa y óseo). La ingesta de la cantidad adecuada de agua permite el correcto funcionamiento del cuerpo al realizar sus labores: dar forma al cuerpo, mantener el equilibrio de los fluidos dentro y fuera de las células, regulación de los impulsos

nerviosos, la temperatura corporal, las contracciones musculares, el transporte de nutrientes y la excreción de sustancias de desecho ([Lutz y Przytulski, 2011](#); [Thompson et al., 2008](#)).

En el cuerpo el agua se comparte entre tejidos y es reutilizada para diversas tareas, por lo que la ingesta requerida de agua para el cuerpo puede ser variable debido a que guarda relación con la ingesta energética, la actividad física diaria, la sudoración, el consumo de solutos en la dieta, el estado fisiológico y la edad. La ingesta recomendada diaria de agua es de 1.5 L aproximadamente ([Lutz y Przytulski, 2011](#); [Salas-Salvadó et al., 2014](#)).

2. *Minerales*

Los minerales son elementos inorgánicos que han demostrado cumplir con una función bioquímica o fisiológica en el cuerpo y además no son degradados durante la digestión o cuando son utilizados durante el cumplimiento de sus funciones. Dentro de sus funciones tanto catalíticas como estructurales están la regulación metabólica, intervención en el proceso de producción de energía, mantenimiento y reparación de tejidos, la síntesis de hemoglobina en la sangre, la protección de daño oxidativo, el equilibrio hidroelectrónico y ácido-base, la regulación génica, la respuesta inmune y la estructura celular ([Casanueva y Bourges-Rodríguez, 2008](#); [Lutz y Przytulski, 2011](#); [Salas-Salvadó et al., 2014](#)).

Los nutrientes minerales que deben ser consumidos en la dieta de acuerdo con su concentración son ([Téllez Villagómez, 2014](#)):

I. Macroelementos: Calcio, Fósforo, Magnesio, Sodio, Potasio, Cloro, Azufre

II. Microelementos: Cobre, Cobalto, Hierro, Manganeso, Flúor, Zinc, Cromo, Yodo, Níquel, Estaño, Vanadio, Molibdeno, Silicio y Selenio.

3. *Vitaminas*

Las vitaminas son sustancias orgánicas no energéticas ni estructurales, que contribuyen a la regulación de procesos fisiológicos del cuerpo; el cuerpo las necesita en pequeñas cantidades para el metabolismo, el crecimiento y el mantenimiento normales, pues estas actúan como reguladores de los procesos metabólicos como la liberación energética de los carbohidratos, lípidos y proteínas y además como coenzimas en los sistemas enzimáticos. Las vitaminas son muy específicas en los que a su función se refiere, ya que los procesos corporales en los que

participan no aceptan intercambio de moléculas para cumplir con su función, si no que cada vitamina es la única molécula capaz de desencadenar el proceso ([Lutz y Przytulski, 2011](#); [Thompson et al., 2008](#)). Las vitaminas a diferencia de los demás nutrientes son muy sensibles y se degradan fácilmente. Son susceptibles al calor, la luz, la exposición al aire y entornos alcalinos. Las vitaminas pueden clasificarse en función de su solubilidad, importante para determinar cómo se almacenan, procesan y utilizan:

- I. Liposolubles: van al hígado para su posterior uso. Entre ellas están las vitaminas A, E, D y K
- II. Hidrosolubles: Son absorbidas en la pared intestinal y pasan directamente al torrente sanguíneo para ser transportadas a donde son requeridas. Entre ellas se encuentran las ocho vitaminas del complejo B y la vitamina C

4. Carbohidratos

Son compuestos orgánicos provenientes en su mayoría de la fotosíntesis de las plantas, y por tanto la fuente principal de obtención son productos vegetales. Como su nombre lo indica, su estructura química contiene carbono, hidrogeno y oxígeno (CHO); en estos compuestos la proporción de hidrogeno y oxígeno es igual a la del agua (2 átomos de hidrógeno por cada átomo de oxígeno) ([Téllez Villagómez, 2014](#); [Thompson et al., 2008](#)).

Los carbohidratos constituyen la mayor fuente de energía en la alimentación humana por 2 razones: a) en una dieta equilibrada proporcionan del 50 al 70% del valor calórico total requerido y b) se degradan con rapidez y como consecuencia, estos son utilizados de inmediato. Se dividen por su complejidad en ([Lutz y Przytulski, 2011](#); [Téllez Villagómez, 2014](#); [Thompson et al., 2008](#)):

- I. Simples, conocidos comúnmente como azúcares:
 - a. Monosacáridos: Son las moléculas con la estructura química más sencilla, pero raras veces son encontrados libres en la naturaleza; los más importantes son las hexosas: glucosa, galactosa, fructosa y ribosa.
 - b. Disacáridos: Es la unión de dos moléculas de monosacáridos, que al unirse liberan una molécula de agua. Las más importantes son: sacarosa, lactosa y maltosa.
- II. Complejos: Cualquiera que tenga 3 o más moléculas. Estos pueden componerse de monosacáridos y disacáridos.

- a. Oligosacáridos: Conformados de entre 3 a 10 moléculas de monosacáridos. Entre ellos se encuentra la rafinosa y la estaquiosa.
- b. Polisacáridos: Contienen una cantidad superior de monosacáridos. Pueden llegar a ser cadenas de miles de moléculas unidas entre sí. Las más importantes son el almidón, el glucógeno y la fibra.

5. Grasas (lípidos)

Son compuestos energéticos diversos que en su estructura molecular contienen carbono, hidrogeno y oxígeno al igual que los carbohidratos, sin embargo, la proporción de oxígeno respecto al carbono e hidrogeno en los lípidos es menor, lo que les permite agruparse más fuertemente y por tanto proporcionar mayor cantidad de energía. Los lípidos proporcionan más del doble de energía que proporcionan los carbohidratos y las proteínas ([Téllez Villagómez, 2014; Thompson et al., 2008](#)).

Su composición química y sus propiedades son muy variadas, ya que a pesar de que su unidad estructural básica es el glicerol, éste puede estar unido a 1, 2 o 3 moléculas de ácidos grasos, y lo que da origen a sus distintos nombres: glicérido, diglicérido, o triglicérido, según sea la cantidad de ácidos grasos contenidos en su estructura. Los lípidos son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos; en la mayoría de los animales se almacenan en cadenas saturadas llamadas grasas y en las plantas de forma insaturada en forma de aceites ([Lutz y Przytulski, 2011; Téllez Villagómez, 2014](#)).

6. Proteínas

Las proteínas y péptidos son compuestos orgánicos complejos que se encuentran en todas las células de los seres vivos y son componentes esenciales de los tejidos. Así como los carbohidratos y los lípidos, las proteínas contienen carbono, hidrogeno y oxígeno en su estructura, pero, además junto con el nitrógeno se agrupan en diferentes bloques denominados aminoácidos, conformados por un átomo de carbono central unido a 4 grupos: un grupo amino, un grupo ácido, un átomo de hidrogeno y una cadena lateral llamada grupo R que puede variar en su estructura (fig. 1).

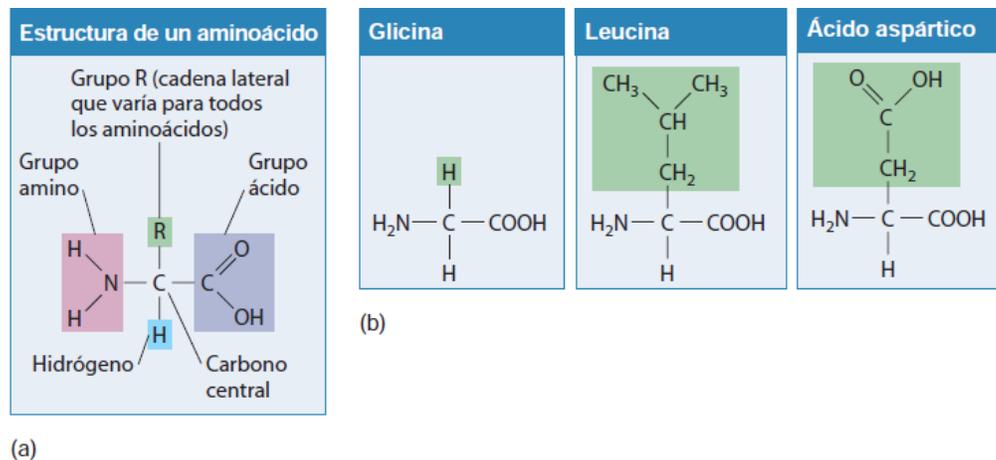


Figura 1. (a) Estructura de un aminoácido; (b) El grupo R es lo que diferencia a cada uno de los 20 aminoácidos importantes para la fisiología humana, confiriendo a cada uno sus propiedades únicas.

Nota. Adaptado de [Thompson et al., \(2008\)](#).

El cuerpo es capaz de sintetizar de 10,000 a 50,000 proteínas distintas, no obstante, necesita del consumo de otras proteínas en la dieta, ya que éstas son la fuente principal de aminoácidos necesarios para síntesis de las proteínas propias requeridas para las funciones de cada organismo. Una proteína está conformada por una combinación de secuencias de los 20 aminoácidos y que unidos por enlaces peptídicos conforman distintos arreglos que dan como resultado una variedad de proteínas, cada una con una función específica ([Thompson et al., 2008](#)).

Funciones de las proteínas

Las proteínas tienen una gran cantidad de funciones en los seres vivos, entre ellas ([Téllez Villagómez, 2014](#); [Thompson et al., 2008](#)):

- Estructura celular: Dar soporte y forma a las células. Las proteínas constituyen alrededor del 80% del peso seco de las células.
- Transporte y almacenamiento de nutrientes.
- Energía: En una dieta equilibrada pueden proporcionar del 10 al 20% del valor energético total, aunque no es la fuente principal de energía.
- Regulación de procesos corporales: hormonales (hormonas), contráctiles, inmunológicos (anticuerpos) y catalíticos (enzimas).
- Equilibrio de electrolitos y fluidos.
- Equilibrio ácido-base.

- g) Mantenimiento y reproducción celular: Proteínas del núcleo celular, participantes además en la regulación de síntesis de proteínas.

Calidad proteica

Existen varios métodos para valorar la calidad de una proteína, los cuales relacionan diversos parámetros, pero que son de gran utilidad en lo que concierne a la nutrición. El término calidad proteica se refiere a la capacidad de una proteína de la dieta para dar lugar a una proteína corporal y ésta se puede evaluar a través de varios indicadores ([Casanueva y Bourges, 2008](#); [Esquivel Hernández et al., 2005](#)).

Las proteínas son compuestos de alto peso molecular, y aunque el cuerpo es capaz de producirlas es necesario también su consumo en la dieta, ya que no todos los aminoácidos requeridos para las proteínas pueden ser sintetizados en el cuerpo. Debido a esta condición es que se puede clasificar a los aminoácidos de la siguiente forma ([Téllez Villagómez, 2014](#)):

- a) No esenciales: pueden ser sintetizados en el hígado a partir de otros aminoácidos por su capacidad enzimática.
- b) Esenciales: no pueden ser sintetizados en el organismo por lo que deben de ser ingeridos en la dieta.

En la tabla 1 se enlistan los 20 aminoácidos según su clasificación de acuerdo con la capacidad de síntesis por el cuerpo humano, no obstante, es necesario considerar la clasificación de la arginina, que, si bien el cuerpo cuenta con el metabolismo adecuado para su síntesis, el requerimiento de este aminoácido es alto, por lo cual es recomendable su consumo diario en la dieta, pues se ha observado que una dieta libre de este aminoácido origina una disminución en

Tabla 1. Clasificación de los aminoácidos por la capacidad de síntesis en el cuerpo humano

Esenciales	No esenciales
Valina	Alanina
Leucina	Serina
Isoleucina	Glicina
Triptófano	Acido glutámico
Arginina	Glutamina
Fenilalanina	Acido aspártico
Treonina	Aspargina
Lisina	Prolina
Metionina	Tirosina
Histidina	Cisteína

Tomado de: Téllez Villagómez, (2014).

el crecimiento y disminución de parámetros adecuados en el sistema inmune, reproducción, y funciones metabólicas ([Fontana Gallego et al., 2006](#)).

La dieta debe incluir una cantidad adecuada de aminoácidos esenciales para poder sintetizar las proteínas necesarias para el cuerpo. La calidad proteica es el indicativo de la cantidad de aminoácidos esenciales presentes en la proteína, dando origen a una clasificación que las agrupa en ([Messina, 1999](#); [Téllez Villagómez, 2014](#); [Thompson et al., 2008](#)):

- a) Proteínas de alta calidad: Aquellas que contienen 9/10 aminoácidos esenciales en suficiente cantidad para que al ser degradadas el cuerpo sea capaz de producir correctamente sus proteínas. Son consideradas proteínas patrón y la fuente principal de éstas son productos de origen animal.
- b) Proteínas de baja calidad: No contienen todos los aminoácidos esenciales en suficiente proporción y por sí solas no pueden apoyar al correcto crecimiento y salud.

Existen otros factores importantes para determinar la calidad proteica, entre ellos la digestibilidad, que es la capacidad del organismo para desdoblar las proteínas consumidas por la acción digestiva y de absorción, en el ámbito de la nutrición ésta puede tomar valores de 0-100%, la mayoría de las proteínas con valores altos (de calidad), son las de origen animal y generalmente son denominadas proteínas patrón ([Esquivel Hernández et al., 2005](#); [Lutz y Przytulski, 2011](#)). Además de la digestibilidad, un criterio relevante adoptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration), existe otro criterio a considerar, denominado “puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas” (PDCAAS, del inglés Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score) ([Messina, 1999](#); [Syama et al., 2012S](#); [Young, 1991](#)), este utiliza la puntuación química (proporción en la que se encuentra un aminoácido indispensable limitante con respecto al patrón de referencia) y un factor de corrección para la capacidad de digestión con la finalidad de calcular un valor para la calidad proteica. Así, el método PDCAAS es equivalente a la puntuación química de un alimento, multiplicado por la capacidad de digestión de ese alimento, por tanto, las proteínas con mayor capacidad de digestión son más completas. En su rango de valores un alimento puede tener un valor PDCAAS desde 0 hasta un valor máximo de 1.0, el cual es considerado alimento como de calidad superior, la mayoría de ellos son alimentos de origen animal como la leche, clara de huevo, carne de res, y algunos de origen vegetal como las legumbres ([Liu, 1997](#); [Messina, 1999](#); [Thompson et al., 2008](#)).

Dieta

Para que el organismo tenga garantizado su correcto funcionamiento y la realización de sus actividades físicas, es preciso asegurar el consumo de una cantidad de energía óptima proveniente del metabolismo de los alimentos en la dieta ([Ortega y Requejo, 2015](#)). Se define como dieta al régimen de alimentación habitual de un individuo, que representa el conjunto de alimentos y/o platillos consumidos diariamente. Se puede considerar a la dieta como la unidad funcional de la alimentación, debido a que las personas eligen los alimentos más no los nutrimentos, y sus preferencias están determinadas por factores biopsicosociales. Para que una dieta sea considerada correcta es necesario que ésta sea satisfactoria en los 3 aspectos ([Bourges-Rodríguez, 2008](#); [Esquivel Hernández et al., 2005](#); [Téllez Villagómez, 2014](#)):

- **Biológico:** Que la dieta contenga los micro y macronutrientes suficientes para cumplir las necesidades fisiológicas, resumida en 4 adjetivos: completa, suficiente, medida y equilibrada. Además, es necesario sea inocua, es decir, que no contenga patógenos o sustancias perjudiciales. La composición dietética habitual es variable, ya que debe ser adecuada a los cambios en los requerimientos nutricionales dependientes de cada individuo según su estado físico. Un cambio en el balance de ingreso y gasto de nutrientes al organismo, ya sea por carencia o por exceso puede traer consigo enfermedades, interacciones antagónicas entre nutrimentos o desnutrición ([Bourges-Rodríguez, 2008](#); [Calañas Continente et al., 2017](#); [Téllez Villagómez, 2014](#)).
- **Psicoemocional:** Es un estímulo que genera atracción sensorial a los alimentos y contribuye a la variedad dietética, importante para el consumo de diversidad de platillos que tengan afinidad con los gustos y costumbres de los individuos. A mayor diversidad de alimentos exista dentro de la dieta, mayor es la cantidad de nutrimentos obtenidos y menor cantidad de sustancias no deseadas acumuladas en el organismo ([Bourges-Rodríguez, 2008](#)).
- **Sociocultural:** Es el vínculo entre el carácter social y las costumbres de las personas con las que se convive; entre ellas la religión y la educación. La relación costo/disponibilidad de los alimentos según las distintas regiones de residencia, también tiene un papel importante en este aspecto ([Bourges-Rodríguez, 2008](#)).

Desde el punto de vista de la nutrición, la elección nutricional y de la dieta conforman un punto de partida lógico para las medidas preventivas de cuidado de salud y de la educación para mejorar la calidad de vida, por lo que la dieta ya no sólo tiene un carácter nutricional sino además considera una función terapéutica para el mantenimiento del estado de salud y como tratamiento

de enfermedades que pueden verse modificadas ante el cambio de la composición alimentaria ([Esquivel Hernández et al., 2005](#); [Roth, 2007](#)). El acto de comer, desde el punto de vista de la salud, es el comportamiento más importante de la humanidad ya que no sólo contribuye a la satisfacción del hambre, sino además a complacer los demás sentidos (vista, olfato y gusto), apoyando a la interacción de individuos y sus dinámicas sociales, económicas, de salud y éticas ([Hopwood et al., 2020](#); [Vega Franco e Iñarritu Pérez, 2010](#)).

Las pautas de alimentación de un individuo son establecidas desde la infancia, en las que interviene el ámbito familiar y económico, además de la influencia de los factores externos anteriormente mencionados. De aquí la importancia de establecer hábitos de consumo adecuados desde los primeros años de vida, que ayuden a prevenir problemas de salud futuros ([Ortega y Requejo, 2015](#)).

En los últimos años, la alimentación ya no sólo se basa en la accesibilidad de los alimentos, la cual antes era totalmente dependiente de las estaciones, sino que además debe considerarse la conducta alimenticia, la cual ayuda en la selección de los elementos integrativos de la dieta para lograr que esta cumpla sus funciones: sea suficiente para saciar el hambre, supla las necesidades biológicas del individuo y que el individuo desempeñe con eficiencia el trabajo de cada día ([Fischler, 1995](#); [Vega Franco e Iñarritu Pérez, 2010](#)). Entre los distintos hábitos de consumo en el mundo, y de gran impacto para la salud se encuentran los siguientes:

El omnivorismo

La alimentación actual del ser humano es evidentemente omnívora ya que se alimenta como organismo heterótrofo primario, secundario y a veces hasta terciario ([Bourges-Rodríguez, 2008](#)). El omnivorismo puede ser definido como la capacidad del consumo generalizado de alimentos, ya que como lo indica la naturaleza biológica del hombre, no existe una especialización física y/o metabólica para el consumo exclusivo de alimentos vegetales o animales, sino que es capaz de alimentarse de lo que está disponible ([Fischler, 1995](#); [IVU, 2020](#)).

El ser humano al ser considerado consumidor heterótrofo indica que es incapaz de producir su propio alimento, por lo que debe alimentarse de sustancias externas para nutrirse, ya sea de una fuente vegetal o animal. Las fuentes vegetales en la alimentación están guiadas por la agricultura y la civilización que dictan la necesidad del consumo de cereales, legumbres y/o frutas, mientras que los alimentos de origen animal provienen directamente del consumo de otros seres vivos o productos derivados de estos. Esta variabilidad alimentaria y los factores que la influyen

determinan los alimentos que pueden ingerirse, ya que, aunque en la naturaleza la mayoría de los alimentos son biológicamente comestibles, no todo lo es culturalmente ([Fischler, 1995](#)).

De acuerdo con un estudio realizado por [Nielsen \(2016\)](#) y el sitio [Statista \(2020\)](#) , alrededor del 73 y 74% de la población sigue un régimen alimenticio omnívoro, en la que aunque pueden observarse algunas restricciones al consumo de algún ingrediente, ocasionalmente hay consumo de carne roja o blanca, reafirmando la teoría de que la capacidad de adaptabilidad que brinda el ser un consumista generalizado permite subsistir bajo distintos regímenes alimentarios normalmente dependientes de las regiones geográficas, la disponibilidad de alimentos y la cultura.

Los animales ocupan un lugar importante dentro del régimen alimenticio de la población humana, ya que en estos reside la capacidad de aprovechar de manera más efectiva la producción agrícola, ya que el humano como organismo no especializado, es incapaz de consumir forrajes o subproductos agrícolas provenientes de las cosechas. Mientras que no todos los productos de origen vegetal pueden ser consumidos por el hombre, la carne ha demostrado tener una capacidad muy alta de aprovechamiento y es considerada una fuente importante de nutrientes, incluyendo las proteínas y micronutrientes como el hierro, zinc y la vitamina B12. Una dieta con carne desde la perspectiva humana tiene un aporte fácil y variado de nutrientes, además que es capaz de proveer balanceadamente los 10 aminoácidos esenciales, además de tener una digestibilidad de entre 97-99% de las proteínas y 96% de las grasas. ([Ayala Vargas, 2018](#); [Godfray et al., 2018](#)). El tipo de carne y la cantidad consumida en la dieta puede variar entre individuos en sus comunidades y entre comunidades, no obstante, a pesar de la disponibilidad de este alimento alrededor del mundo y del bajo costo que tiene con respecto a su precio a lo largo de la historia, se ha demostrado que es posible obtener la cantidad necesaria de todos los nutrientes sin la necesidad de consumir carne, sólo si existe un consumo variado de otros alimentos disponibles. Aunque la mayoría de la gente es consciente de que la carne es una excelente fuente de proteínas, muchas personas se sorprenden al aprender que la calidad de las proteínas de algunas legumbres es casi igual a la de la carne, sin embargo, tienen el inconveniente de que no todas son completas nutricionalmente pues pueden no tener algunos nutrientes como la vitamina B12, C o A, o tener aminoácidos esenciales limitados o insuficientes ([Godfray et al., 2018](#); [Thompson et al., 2008](#)).

Los humanos evolucionamos como omnívoros oportunistas y tanto nuestro sistema digestivo como nuestro metabolismo no están diseñados para soportar una dieta restringida sólo a alimentos de origen vegetal o de origen animal, sin embargo, dado que la dieta se ve influenciada

en parte por la cultura, han surgido una gran cantidad de tendencias alimentarias como el crudivorismo, el vegetarianismo y el carnivorismo estricto, entre otras que pueden resultar contradictorias con la herencia biológica del ser humano ([Mateos y Rodríguez, 2010](#)), por lo que se han realizado estudios para evaluar las implicaciones positivas y/o negativas a la salud de dietas que no cumplen con un régimen omnívoro ([Clarys et al., 2014](#); [Leitzmann, 2005](#); [López Portillo et al., 2006](#), [Navarrete Rodríguez et al., 2015](#)).

Dieta carnívora y pescetarianismo

En la actualidad, vivimos en un mundo de desigualdad alimentaria, ya que la base alimentaria de la mayoría de las personas son los productos animales y sus derivados, sin embargo, no toda la población tiene acceso a estos recursos. A pesar de que la carne no es un componente esencial de la dieta humana, un gran número de personas en el mundo, adoptan dietas altas en energía proveniente de ésta. Se sabe que la carne aporta algunos nutrimentos que son difíciles de obtener de productos vegetales, tales como la lisina, el hierro biodisponible y el zinc, además de que la calidad de la proteína animal es ligeramente mayor que la proteína obtenida de plantas. Sin embargo, también es conocido que los productos de origen animal son fuente primaria de grasa saturada (que no han demostrado tener beneficios a la salud o niveles mínimos de consumo seguro), la cual es responsable de incrementar los riesgos de enfermedades cardíacas, diabetes y algunos tipos de cáncer ([Walker et al., 2005](#)).

Por tanto, gracias a las diferentes modificaciones al consumo de carne, se ha sustituido el consumo de carne roja a otro tipo de carnes como la carne blanca (de aves) o la carne de pescado, de las cuales la última puede entrar en una clasificación de dietas semi-vegetarianas pues aún existe consumo de carne. Estas dietas han sido propuestas pues son fuente de proteínas, pero con menor riesgo de contener sustancias que puedan ser desencadenadoras de enfermedades cardiovasculares como las observadas cuando hay consumo de carnes rojas. Una de las fuentes de proteína animal obtenidas de animales marinos es la del pescado y la del camarón ([Craig y Mangels, 2009](#); [Syama et al., 2013](#); [Walker et al., 2005](#)).

Según diversas fuentes, la carne de camarón contiene entre 19% y 51% de proteína, la cual está constituida por 20 α -aminoácidos encontrados en diferentes proporciones que satisfacen los requerimientos dietéticos del ser humano. El perfil de aminoácidos del camarón indica que este es un alimento de alto valor nutrimental para el humano ya que su proteína está caracterizada como de calidad al poseer un alto valor de digestibilidad (85%) comparado con este valor biológico en otras fuentes. Además de este valor clasificado como proteína de calidad, también

su valor de PDCAAS es alto, ya que este es de 1 o 100%, indicando que es una proteína de calidad superior ([Syama et al., 2012](#); [Young, 1991](#)).

A pesar de todas las ventajas de la dieta basada en productos de origen animal, el consumo inadecuado de estos productos puede conllevar consecuencias negativas a la salud, como se mencionó anteriormente, por lo cual un reto importante de salud pública en el ámbito nutrimental es proveer la cantidad de proteína adecuada y los nutrimentos necesarios para el cuerpo humano sin causar un consumo desmesurado de grasa saturada ([Walker et al., 2005](#)).

Vegetarianismo

Una tendencia social en el ámbito de conducta alimenticia que ha ido en aumento en los últimos años es el vegetarianismo, el cual ha surgido como un movimiento dietético importante en culturas occidentales por los beneficios que este ofrece a la salud, su contribución a un ambiente más sustentable, el respeto a los derechos animales y la religión como los principales motivos de adopción ([Clarys et al., 2014](#); [Hopwood et al., 2020](#); [López Portillo et al., 2006](#)). La dieta vegetariana puede definirse como aquella que no incluye el consumo de carne roja, de aves, pescado o mariscos, así como productos que contengan estos. Dado que este tipo de dieta se define por la restricción de elementos dietéticos y su composición puede variar, es posible clasificarla en diferentes grupos: 1) Dieta lacto-ovo vegetariana, en la cual se restringe el consumo de carne animal, pero si se consumen alimentos derivados de animales, tales como: leche, queso, yogurt, huevos, entre otros; a su vez puede subclasificarse en lacto-vegetariana y ovo-vegetariana; 2) dieta vegana, en la que no se consume ningún producto de origen animal, y 3) dieta semi-vegetariana, en las que se consume menos carne que en la dieta omnívora, entre ellas se encuentra la dieta flexetariana y pescetariana como algunos ejemplos ([Craig y Mangels, 2009](#); [International Vegetarian Union \[IVU\], 2020](#); [Key et al., 2006](#); [Leitzmann, 2005](#); [Ruby, 2012](#)).

Muchas personas pueden describirse a sí mismas como vegetarianas, pero dentro de su dieta aún pueden incluir pescado, pollo o incluso carne. Estos vegetarianos autoidentificados pueden ser descritos como semi-vegetarianos en algunos estudios, sin embargo, a pesar de la existencia de las distintas clasificaciones dentro de la dieta vegetariana se han observado estas inconsistencias de identificación dentro de este régimen alimenticio y en sus patrones de alimentación. Esta variación en los hábitos alimenticios puede llegar a explicar por qué existen conclusiones controversiales y diversas en la literatura sobre los beneficios y riesgos que tiene el seguir una dieta vegetariana, y por tanto es necesaria la asesoría individual para evaluar la calidad nutricional de la dieta de un vegetariano o autoidentificado vegetariano ([Craig y Mangels, 2009](#); [Key et al., 2006](#); [Leitzmann, 2005](#); [Ruby, 2012](#)).

Tendencias y números

El número de vegetarianos que hay en el mundo es incierto, sin embargo, algunas encuestas realizadas en los últimos años ofrecen información que puede dar una idea de la proporción de vegetarianos en cada país o región. En 2019, el sitio The Vegetarian Resource Group reportó que en Estados Unidos un 4% de su población es vegetariana ([Stahler, s.f.](#)); en el año 2008, The European Vegetarian Union indicó que India tiene un 40% de vegetarianos; para 2009, Reino Unido contaba con un 3%, según la UK Food Standards Agency ([Ruby, 2012](#)) y en el caso de México se reporta que entre un 20 y 28% de la población es vegetariana según cifras del Estudio Global sobre Salud y Percepciones de Ingredientes, realizado por la compañía de consultoría [Nielsen \(2016\)](#) y del festival gastronómico “Gourmet Show” edición 2018 ([Becerril, 2018](#)); describiendo a México como uno de los países con mayor número de vegetarianos en Latinoamérica, pues supera la media por región de 12% reportada por [Nielsen \(2016\)](#).

Algunas encuestas han demostrado que una gran cantidad de las personas consideradas vegetarianas, siguen su dieta sin apoyo o asesoramiento de un nutriólogo y basan sus dietas en información encontrada en internet. Según el primer censo vegano en México, realizado por el sitio de internet [Vegan Police \(2016\)](#), el 51.2 % de las personas que se consideran veganas nunca han consultado a un nutriólogo, mientras que el 44.4% lo hizo alguna vez y no regresó. Según [Brignardello et al., \(2013\)](#), en Chile se reporta que la principal fuente de información en nutrición vegetariana/vegana es internet y sólo un 10% consulta a profesionales de la salud. Estas cifras indican que los conocimientos que tienen los vegetarianos pueden ser insuficientes para lograr una dieta equilibrada y evitar la carencia de nutrientes, que puede generar problemas importantes en la calidad de la alimentación.

Perspectiva nutricional

De acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Dietética Americana (ADA), las dietas vegetarianas apropiadamente planeadas, incluyendo a las veganas, que son las más restrictivas en cuanto a los elementos integrativos de la dieta, son saludables, nutricionalmente adecuadas y pueden aportar beneficios a la salud en la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades. Además, éstas son adecuadas para todos los individuos durante todas las etapas del ciclo de vida ([Craig y Mangels, 2009](#)). A pesar de estas perspectivas sobre la dieta vegetariana, es importante resaltar las consideraciones sobre la falta o deficiencia de nutrientes críticos para el desarrollo humano y los cuales deben de ser sustituidos, tales como: proteína, ácidos grasos

n-3 de cadena larga, calcio, hierro, yodo, zinc, retinol, vitamina D y vitamina B-12 ([Clarys et al., 2014](#); [Craig y Mangels, 2009](#); [Key et al., 2006](#)).

Las dietas vegetarianas con un régimen adecuado tienen una gran cantidad de ventajas para su consumidor, tales como bajos niveles de colesterol, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, menores niveles de presión arterial y menor riesgo de hipertensión y diabetes tipo 2. Además, las personas bajo esta dieta tienden a tener un menor índice de masa corporal (IMC) y en general menores tasas de incidencia de cáncer. Las diferencias nutricionales de la dieta vegetariana en comparación con la omnívora pueden explicar algunas de las ventajas a la salud que ya se han mencionado ([Craig y Mangels, 2009](#); [Key et al., 2006](#)).

El cambio de una dieta omnívora a una dieta vegetariana implica el consumo de diversos nutrientes de origen vegetal para cumplir los esquemas nutricionales de una dieta de calidad. Uno de los elementos principales que debe cambiar su fuente de obtención (origen animal por vegetal), es la proteína, que permita obtener la cantidad necesaria de ésta para que el cuerpo cumpla sus funciones y se considere una dieta equilibrada ([Rizzo y Baroni, 2018](#)). Las legumbres tienen un papel importante en poblaciones que siguen una dieta basada en el consumo de plantas, y no es sorpresa que el consumo de éstas es mayor en vegetarianos que en personas omnívoras. Las legumbres han sido reconocidas por su contenido proteico y más recientemente por su contenido de fibra soluble ([Messina, 1999](#)).

El papel de la soya en las dietas vegetarianas

Glycine max o mejor conocida como soya es una especie de legumbre originaria del este de Asia y es considerada uno de los cultivos más exquisitos y nutricionalmente valorados. La soya ha sido consumida ampliamente alrededor del mundo como una fuente rica de proteína en comidas y bebidas, además de ser continuamente modificada en varios productos y predominantemente consumida como tofu, leche y salsa de soya ([Naresh et al., 2019](#)). De acuerdo con cifras de [Brignardello et al., \(2013\)](#), el reemplazo de las proteínas de origen animal en vegetarianos y veganos es de 87,5% y 90,6% respectivamente; ambos grupos indicaron que en su mayoría lo realizan mediante la ingesta de leguminosas y proteína de soya. La soya posee propiedades versátiles que la hacen apropiada para llevar a cabo su transformación en diversos productos para el consumo humano, tales como extensor de la carne, añadido de bebidas de leche, fórmula alimenticia infantil, pastillas comprimidas de leche o embutidos, y recientemente se confirmó el gran contenido (hasta 62%) de esta leguminosa en atún enlatado ([Kumar et al., 2010](#); [Procuraduría Federal del Consumidor \[PROFECO\], 2019](#); [Rizzo y Baroni, 2018](#)).

El contenido proteico contenido en la soya ha sido determinado como el más alto comparado con otras legumbres y cereales ([Naresh et al., 2018](#)), que además, en conjunto con su aporte calórico, hace que la soya tenga un gran potencial de enfrentar el problema de malnutrición que se sufre en muchos países en desarrollo y también puede explicar la razón de su popularidad entre poblaciones vegetarianas ([Kumar et al., 2010](#); [Rizzo y Baroni, 2018](#)).

Componentes nutricionales de la soya

La soya tiene 2 componentes mayoritarios usados para diversas aplicaciones: la proteína y el aceite. Esta semilla contiene entre el 36%-46% de proteína dependiendo del cultivo, lo que representa casi el doble de contenido proteico que otros cereales y legumbres usados como sustitutos en las dietas vegetarianas; y entre 18% y 22% de aceite ([Chito Trujillo et al., 2017](#); [Naresh et al., 2019](#); [Rizzo y Baroni, 2018](#)). Además de la proteína y el aceite, la soya está provista con diversas sustancias que le aportan un alto valor nutrimental, tales como carbohidratos, vitaminas, minerales (P, Ca, Mg, Fe, Na, K), enzimas, ácido fólico, fibra y especialmente sus isoflavonas, las cuales permiten que la soya sea denominada como un alimento que ayuda a la prevención de enfermedades ([Naresh et al., 2019](#)).

La proteína de soya es denominada de calidad puesto que su contenido de aminoácidos es prácticamente equivalente al de las proteínas de origen animal, y constituye una proporción balanceada de los 10 aminoácidos esenciales requeridos por el cuerpo humano ([Chito Trujillo et al., 2017](#); [Kumar, et al., 2010](#); [Naresh et al., 2019](#)). La soya tiene un valor de digestibilidad de aminoácidos entre 0.9 y 1.0 (el valor máximo para un alimento es 1.0), siendo de los valores más altos de digestibilidad entre las legumbres, además de tener una concentración de aminoácidos que puede exceder los requerimientos nutricionales. Si la soya se utiliza como fuente única de proteína, cubre las necesidades de todos los aminoácidos indispensables en niños y adultos cuando se ingiere a una concentración de 0.6 g proteína/kg de peso corporal por día ([Bodwell et al., 1980](#); [Messina, 1999](#); [Young, 1991](#)).

Por otro lado, la soya contiene isoflavonas, las cuales pertenecen a una clase funcional de fitoquímicos no esteroideos llamados fitoestrógenos que poseen la estructura química y funcional similar a los estrógenos endógenos humanos y las cuales se sintetizan por distintos estímulos por estrés ambiental en las plantas. Las principales isoflavonas presentes en la soya son la genisteína, daidzeína y gliciteína ([Rizzo y Baroni, 2018](#)). Las isoflavonas se encuentran en distintas legumbres como la soya, en distintos tipos de frijol (riñón, pinto, blanco), el trébol rojo, entre otras, pero sólo en la soya éstas tienen una función importante y su contenido en la planta

varía de acuerdo con el cultivo y el lugar de la siembra. Las isoflavonas tienen la habilidad de interactuar con los receptores de estrógeno (ERs) debido a su estructura similar al 17 β -estradiol. Sin embargo, las isoflavonas tienen una potencia estrogénica baja en comparación con el estradiol. De hecho, la afinidad de las isoflavonas con los ER α y ER β son 1/1000 y 1/3 veces respectivamente. La afinidad por los ERs es más alta en la genisteína que en la daidzeína ([Rizzo y Baroni, 2018](#)).

Los estudios sobre las ventajas y desventajas de una dieta vegetariana han sido probados en humanos adultos y en algunos modelos roedores ([Giuberti et al., 2018](#); [Gordillo Lima, 2019](#); [Orwoll et al., 1992](#), [Rojas Allende et al., 2017](#)), sin embargo, existen pocos estudios que evalúen el efecto que ésta pueda tener en infantes o adolescentes humanos y como podría repercutir en su desarrollo y crecimiento. Algunos acercamientos al posible efecto que tiene la elección de los componentes nutricionales de la dieta sobre la salud están enfocadas a la presencia o ausencia de condiciones de salud crónicas como niveles de colesterol, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer por mencionar algunas ([Craig y Mangels, 2009](#)), no obstante, las repercusiones que puede generar en el crecimiento, observado a través de medidas morfométricas como la talla, ha sido poco estudiado en etapas tempranas. Si bien, se ha estudiado como lograr una correcta nutrición en jóvenes e infantes a partir de dietas restrictivas como la vegetariana ([López Portillo et al., 2006](#)), donde aún se encuentran en un periodo activo de crecimiento, no se han percibido repercusiones sobre la talla y/o complexión final de los individuos, aunque aún no se contemplan muchos otros elementos que se pueden ver influenciados por un cambio en el origen proteico de la dieta.

En el humano, el completo desarrollo de los huesos se determina en la adolescencia puesto que durante este periodo la acumulación de masa ósea es acelerada y más del 50% de esta se reúne en este tiempo para finalmente alcanzar un pico de masa ósea (PMO) el cual puede verse influenciado por factores genéticos, mecánicos, hormonales y nutricionales. El hueso es un tejido conjuntivo rígido encargado de dar soporte, protección y movimiento a la estructura corporal, y que además está en constante remodelado, resultado de un balance entre la formación y reabsorción del tejido. El tejido óseo puede diferenciarse en: a) hueso trabecular, un tejido poroso que tiene laminas con arreglo irregular que le dan una apariencia de esponja y el cual conforma principalmente las epífisis de los huesos largos y el interior de la mayor parte de los huesos; y b) hueso cortical, un tejido denso y rígido de baja porosidad que proporciona protección y soporte y que constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos y la parte externa de todos los huesos del cuerpo; los aportes de estos dos tejidos, junto con otros elementos participantes en

el remodelado óseo permiten determinar la masa ósea de los huesos del esqueleto ([Cooper et al., 2015](#); [Fernández-Tresguerres et al., 2006a](#); [Fernández-Tresguerres et al., 2006b](#)). Si bien, la genética tiene una función importante para la determinación del crecimiento del esqueleto, los factores de alimentación e ingesta adecuada de nutrientes tiene un efecto significativo sobre la salud de los huesos, por lo que una variación en la ingesta de alimentos durante los periodos clave de desarrollo del esqueleto pueden modificar el crecimiento y remodelación ósea, de ahí que cambios en el peso y la composición corporal en cualquiera de los extremos (deficiencia o exceso) resultan en modificaciones en la densidad ósea (DO) de los huesos ([Cooper et al., 2015](#)).

El estudio de los posibles efectos de la dieta en otros organismos modelo en etapas juveniles, puede no solo ofrecer información relevante acerca de aspectos difíciles de observar en el crecimiento humano como tasas de crecimiento, aprovechamiento nutricional y reproducción, sino además aumentar el conocimiento sobre características de alimentación, crecimiento y reproducción de estos modelos, importantes para otras áreas de investigación. Los estudios disponibles están limitados en gran medida a modelos mamíferos como los roedores o a especies acuáticas utilizadas para consumo humano y en estos se han encontrado efectos controversiales en diversos parámetros de la salud como el crecimiento, parámetros hematológicos e inmunológicos y salud ósea ([Bodwell et al., 1980](#); [Giuberti et al., 2018](#); [Heikkinen et al., 2006](#)), sin embargo, poco se sabe si estos efectos también están presentes en otros modelos de estudio no mamíferos, por ejemplo, los anfibios.

Modelos de estudio en la investigación: *Xenopus laevis*

X. laevis (fig. 2), conocida comúnmente como rana africana de garras es un anfibio acuático ampliamente utilizado en estudios de investigación en biología celular, molecular y del desarrollo, genética, fisiología, toxicología, entre otros; debido a numerosas ventajas que ofrece, por citar algunas: fácil mantenimiento; huevos y embriones numerosos, de gran tamaño y resistentes a la manipulación; bien conocida genética, y rutas moleculares y endócrinas conservadas ([Reed, 2005](#); [Sive et al., 2010](#)). A pesar de su importancia en el área científica, existe relativamente poca información en muchos ámbitos, incluyendo régimen nutricional óptimo, tasas de crecimiento, tratamiento de enfermedades comunes, Unidades Hounsfield, entre otros, los cuales podrían impactar directamente en el bienestar del organismo, la calidad de los oocitos, los mecanismos para promover un comportamiento reproductivo con el menor estrés (características que sólo han sido reportadas como anecdóticas) y en su uso en otros campos de la ciencia.



Figura 2. Macho juvenil albino *X. laevis*

Características físicas generales de *X. laevis*

X. laevis es un anfibio único en morfología ya que tiene aspectos físicos muy particulares: carece de lengua y oídos visibles. Su cuerpo es aplanado y su cabeza tiene forma acucharada, más pequeña que su cuerpo, tiene 2 ojos redondeados pequeños en la parte superior de su cabeza y no presenta parpados. Posee dientes supra maxilares, pero no palatinos ni parótidas; al carecer de lengua tiene una menor cantidad de papilas gustativas, las cuales se encuentran en el paladar y piso de la boca. Sus extremidades superiores son pequeñas sin membranas, mientras que las posteriores son largas y musculosas, con membranas interdigitales bien desarrolladas; El dorso es multicolor y puede presentar manchas de gris olivo, café o gris, la parte ventral es blanquecina o amarillenta y su piel es lisa y resbalosa, capaz de secretar mucosa como mecanismo de defensa ante patógenos y depredadores. En comparación con otras ranas, estas carecen de un saco vocal, sin embargo, pueden generar “llamados de apareamiento” gracias a la contracción de los musculo laríngeos. Así como algunos peces, esta especie cuenta con un sistema sensorial denominado línea lateral, que le permite percibir cambios en la presión del agua, lo que le permite localizar fácilmente sus presas ([Solís M, 2004](#)).

X. laevis es un organismo totalmente acuático, sin embargo, es capaz de desplazarse cortas distancias hacia otros cuerpos acuáticos, gracias a sus patas traseras largas y fuertes y su piel

resbaladiza, pero es altamente susceptible a la desecación por lo cual sólo puede permanecer fuera del agua poco tiempo antes de deshidratarse y morir ([Crayon, 2005](#)). Los adultos se encuentran adaptados a la vida acuática. Presentan una piel lisa y con abundante mucosidad. El cuerpo es hidrodinámico, con patas musculosas que presentan membranas interdigitales bien desarrolladas. El rasgo más característico del género *Xenopus* es la presencia de formaciones corneas a modo de “uñas negras” en los tres dedos internos de las patas, por lo que también se le conoce como sapo de garras ([Garvey, 2000](#); [Solís M, 2004](#)).

Reproducción y genética de *X. laevis*

Una vez alcanzada la etapa de reproducción activa, entre los 10 y 18 meses post-metamorfosis, *X. laevis* puede reproducirse hasta cuatro veces al año. *X. laevis* presenta un dimorfismo sexual que se expresa de dos maneras: 1) variación en el tamaño, y 2) las hembras presentan una extensión cloacal al final del abdomen, lo que permite diferenciar a los individuos en una etapa adulta ([Garvey, 2000](#)). Es importante mencionar que las tallas máximas de crecimiento para un individuo de etapa adulta no se alcanzan cuando este llega a la madurez sexual, es decir cuando ya es capaz de reproducirse, si no que pueden pasar años hasta que el individuo alcance su tamaño máximo. Los machos pueden llegar hasta los 80 mm de talla entre los 2 y los 4 años, y las hembras hasta los 120 mm a los 5 años ([McCoid y Fritts, 1989](#)).

Aun cuando *X. laevis* presenta un dimorfismo sexual, para individuos jóvenes que aún no llegan a la madurez es complicado hacer una diferenciación sexual visual. Dado que esta especie además presenta similitudes morfológicas con la rana de garras tropical *Xenopus tropicalis*, es necesario la incorporación de métodos moleculares que permita hacer distinciones más sencillas y rápidas, que normalmente no pueden ser resueltas a través de una distinción morfológica. *X. laevis* es una especie alotetraploide con un número de cromosomas $2n=36$, agrupados en 18 pares de cromosomas homólogos y un sistema cromosómico de determinación de sexo ZZ/ZW y siendo las hembras el sexo heterogamético ([Veloso et al., 2004](#), [Yoshimoto et al., 2008](#)).

A pesar de conocerse que en esta especie la determinación del sexo depende de los cromosomas sexuales Z y W, estos son homomórficos, es decir, que visualmente son muy similares a los autosomas y por lo tanto no pueden ser diferenciados por métodos cromosómicos ([Roco et al., 2015](#)) como la técnica de cariotipo, sino que es necesaria la identificación de uno o varios genes asociados a los cromosomas sexuales y que generalmente están encargados de la determinación sexual del individuo, generalmente conocidos como genes determinantes del sexo

(GDS). En los últimos años se ha estudiado el papel de algunos genes en la diferenciación del sexo en anfibios, sin embargo, poco se ha utilizado la identificación de estos genes como un sistema de determinación sexual en estudios que impliquen el seguimiento de los individuos y están mayormente enfocados a estudiar la genética de las especies. Hasta el momento en *X. laevis* se conocen algunos genes y regiones específicos de los cromosomas sexuales ZW y es posible identificarlos a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en sus distintas modalidades ([Mawaribuchi et al., 2017](#); [Yoshimoto et al., 2010](#); [Yoshimoto et al., 2008](#)).

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN haciendo uso de la enzima polimerasa y primers específicos que se alinean a la secuencia de interés. Esta técnica molecular es ampliamente usada para estudiar los ácidos nucleicos y cada una de sus modalidades, pues posee características y ventajas que permiten estudiar diferentes propiedades del ADN según el objetivo del estudio ([Krebs et al., 2014](#); [Tamay de Dios et al., 2013](#)). El uso de la técnica de PCR para la determinación del sexo tiene ventajas frente a las técnicas de sexado convencionales a través de la identificación del dimorfismo sexual, ya que éste sólo es perceptible una vez iniciada su etapa de reproducción activa (10-18 meses post-metamorfosis), por lo que esta técnica no puede ser usada en individuos juveniles que aún no tienen un dimorfismo evidente. Por otro lado, la PCR es una técnica sensible, reproducible y eficaz que solo necesita una pequeña cantidad de ADN molde para amplificar las secuencias de interés y que permite evaluar la condición genética del individuo en cualquiera de las etapas del crecimiento ([Solís M., 2004](#)).

Aspectos de interés de *X. laevis*

A pesar de su importancia como modelo biológico, existen aspectos de *X. laevis* que no se han investigado a profundidad, como son las unidades Hounsfield (HU). Las HU son una representación proporcional del grado de atenuación de rayos X provenientes de una Tomografía Computarizada (CT) en un tejido. En la reconstrucción de la imagen se asigna a cada píxel una HU para mostrar gráficamente una representación de la densidad del tejido, siendo esta última dependiente de la anatomía y composición del tejido analizado ([White y Pharoah, 2009](#)). Una de las aplicaciones más utilizadas de la CT es la densitometría ósea, encargada de evaluar la salud ósea de los huesos en función de su densidad de mineralización; el establecimiento de HU es muy recurrente en estudios humanos, generalmente en aplicaciones biomédicas de diagnóstico,

pero no ha sido explorada o explotada su aplicación con modelos biológicos y su uso para diversas investigaciones.

El uso de esta técnica es de gran importancia ya que representa una alternativa de diagnóstico no invasiva para distintos escenarios clínicos como identificación de lesiones intraóseas, reconocimiento de procesos benignos o malignos de masas en distintos tejidos (pulmones, cerebro, etc.), o la diferenciación histológica de lesiones ([Dellán et al., 2015](#)), por lo que determinar las HU puede dar ventajas para estudios *in vivo* que necesitan tener un seguimiento de los organismos experimentales sin la necesidad de ser sacrificados.

Capítulo II: Justificación

Las presiones sociales actuales como el modo de vida, estrés, los estereotipos, corrientes culturales, religión o inclusive el poder adquisitivo han impactado al ser humano en muchos de sus ámbitos, incluyendo el plano alimenticio. Aunque la gran mayoría de la población sigue una dieta omnívora, muchos grupos poblacionales eligen dietas con menor o nulo contenido de proteínas animales, reemplazando éstas por proteínas vegetales, especialmente las derivadas de la soya, sin embargo, el impacto sobre otros aspectos como el desarrollo, crecimiento y la reproducción a corto y largo plazo no se ha considerado o bien sólo se ha enfocado a estudios en adultos humanos y en roedores. Para el caso de los anfibios, especialmente *X. laevis*, la información disponible es mayormente relacionada a aspectos moleculares y celulares asociados a sus oocitos y embriones, pero existe relativamente poca información en aspectos como régimen nutricional óptimo, tasas de crecimiento, tratamiento de enfermedades comunes, entre otros. El aprovechar las ventajas de este modelo para validar los efectos de una dieta alta en proteína vegetal comparada con una a base de proteína animal como el camarón, en organismos juveniles brinda la oportunidad de explorar los efectos sobre el crecimiento de estas aplicando tecnologías como la tomografía computarizada.

Objetivos

General:

Comparar los efectos de dos dietas altas en proteína, una de origen vegetal y una de origen animal, en el crecimiento y densidad ósea de *X. laevis*.

Específicos:

- Optimizar las condiciones de PCR multiplex para sexado de *X. laevis*.
- Analizar el efecto de dos dietas de diferente origen proteico sobre el crecimiento de *X. laevis*.
- Analizar el efecto de las dietas sobre la ganancia de peso en *X. laevis* juveniles.

- Determinar el efecto de las dos dietas sobre la densidad ósea de *X. laevis* juveniles mediante tomografía computarizada.
- Establecer las unidades Hounsfield en hueso y órganos de *X. laevis* juveniles y adultos.

Hipótesis

De acuerdo a la información contradictoria presente en la literatura respecto a los efectos del origen de la dieta en el desarrollo y en conjunto con algunas observaciones previas hechas sobre el crecimiento de *X. laevis*, se puede sugerir que dietas que contienen proteína animal (pura o mixta) tendrán mayor aprovechamiento para el crecimiento en comparación con una dieta que contenga exclusivamente proteína de origen vegetal, dado que a pesar de ser considerada como proteína de alta calidad, la proteína de soya usada en este estudio puede no tener el mismo rendimiento para el crecimiento, especialmente en el peso. Además, en conjunto con el posible bajo aprovechamiento de la proteína para el mantenimiento y aumento de masa muscular, se considera que la DO de los organismos con una dieta vegetariana será menor a la presentada por los organismos omnívoros y carnívoros, indicando que la dieta vegetariana tiene un efecto negativo sobre la densidad del hueso.

Capítulo III: Métodos

Sexado de organismos por PCR

Se realizó una búsqueda bibliográfica de primers reportados en estudios previos para la identificación de cromosomas sexuales por métodos moleculares. Las secuencias de primers identificados fueron analizados con la herramienta web “Standard Nucleotide BLAST” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) usando la opción Megablast (Optimize for highly similar sequences) para encontrar las secuencias con similitud a cada primer. Los resultados con 100% de similitud a secuencias de *X. laevis* fueron sometidas a una PCR virtual en el programa Serial Cloner (Versión 2.6.1) para corroborar su especificidad con la secuencia obtenida en BLAST y determinar el tamaño de los fragmentos esperados. Los resultados permitieron elegir a los candidatos ideales para elegir un sistema de determinación del sexo.

La optimización de la técnica de sexado de individuos *X. laevis* requirió además de la evaluación de distintos métodos para la obtención del ADN de manera eficiente por lo que un macho y una hembra *X. laevis* adultos fueron utilizados como individuos control para la optimización en todas sus etapas.

Extracción de ADN

Se evaluaron dos métodos de extracción de ADN usando dos diferentes fuentes biológicas que pueden ser obtenidas sin provocar daño mayor al organismo.

Fuentes biológicas

Células de mucosa epitelial: Los individuos control fueron tomados cuidadosamente con guantes para evitar contaminantes y se hizo pasar un hisopo estéril sobre el epitelio para recoger células superficiales que se desprenden de la mucosa que segregan. Una vez que el hisopo fue frotado alrededor de 5 veces por todo el cuerpo éste fue almacenado en 3 mL de buffer fosfato salino (PBS) para mantener las células y su posterior uso para la extracción de ADN.

Sangre: Se utilizó el protocolo establecido por Cedillo-García (2019, dato no publicado), brevemente: Cada individuo control fue depositado en una solución anestésica de agua potable con esencia de clavo en proporción 1:5000 y mantenidos en ésta hasta que el individuo presentara leves reflejos de movimiento. Una vez anestesiados, se pinchó la zona interdigital de la pata trasera derecha con un capilar con punta afilada y se recogió cuidadosamente la sangre

expulsada con un capilar heparinizado. Posteriormente, la muestra fue depositada en un tubo cónico para su uso inmediato.

Métodos de extracción de ADN

Método no comercial: Para las muestras sanguíneas se realizó un lavado celular agregando a las muestras solución PBS aforando a 1mL, mientras que las muestras epiteliales fueron homogeneizadas. De cada muestra, 1mL fue transferido a un tubo nuevo, y fueron centrifugadas por 5 minutos a 2,000rpm; al pellet celular se le agregó 200µL de buffer de lisis (0.5% dodecilsulfato sódico [SDS], 40mM tris(hidroximetil) aminometano [Tris], 80mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], 200mM cloruro de sodio [NaCl]) y 0.2mg de proteinasa K (PK), se homogeneizó y fue incubada a 56°C por una hora a 550rpm; posteriormente se aumentó la temperatura a 95°C por 5 minutos para inactivar la PK. La muestra se centrifugó por 5 minutos a 13,000rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio; se agregaron 20µL de NaCl 5M y 400µL de etanol puro frío. El contenido se homogeneizó por inversión y se dejó reposar a 4°C por 10 minutos; se centrifugó a 13,000rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet fue lavado con 800 µL de etanol/H₂O libre de nucleasas al 70% y se centrifugó a 13,000rpm, se retiró el sobrenadante dejando secar por aproximadamente 3 minutos, y finalmente se resuspendió en 20µL de agua libre de nucleasas.

Kit de extracción: La extracción de ADN control fue realizada directamente con células de epitelio y muestras sanguíneas usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Cat. No. 69504) y el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, Cat. No. D4068), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras obtenidas de las extracciones fueron cuantificadas en un nano-espectrómetro (NanoDrop® 2000, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) para conocer su concentración y sus radios de contaminación. Las muestras con buena concentración y calidad fueron tomadas como ADN control para la optimización de la PCR. Todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Optimización de PCR punto final

De todos los primers candidatos para sexado (ver tabla 2), se eligieron los primers dm-w y dmr1 (resaltados con un asterisco) y el gen de control interno Histone 4 [H4, Fwd: 5'-CGGGATAACATTCAGGGTATCACT-3', Rev: 5'-ATCCATGGCGGTAAGTGTCTT CCT-3'], 189pb) los cuales fueron sintetizados y adquiridos en Sigma-Aldrich, en presentación deshidratada. Los primers fueron hidratados con H₂O libre de nucleasas de acuerdo con las instrucciones del proveedor y almacenados a -20°C.

Optimización de primers

Se realizó una PCR con gradiente de temperatura para los 3 pares de primers propuestos para determinar la temperatura de anillamiento en la amplificación de los fragmentos bajo las siguientes condiciones: 20 ng ADN genómico (ADNg) control (♀/♂), 1 unidad *Taq* (*Taq* DNA Polymerase, Invitrogen, Cat. No. 18038), 1X *Taq* DNA Polymerase PCR Buffer (Invitrogen, Cat. No. 18067-017), 3mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2μM Forward Primer (DM-W/DMRT1/H4), 0.2μM Reverse Primer (DM-W/DMRT1/H4), 0.2μM dNTPs, H₂O cbp 20μL. La PCR de gradiente de temperatura se realizó utilizando 5 temperaturas en un rango de 58 a 62°C, bajo el siguiente ciclo de amplificación:

Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	} X 30 ciclos
Desnaturalización	95°C	1 minuto	
Anillamiento	58°C/59°C/60°C/ 61°C/62°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Los productos de la PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2.5% en TAE (7μL de reacción, 2μL de buffer de carga 5X, 1μL de SYBR DNA Stain 11X [Jena Bioscience, Cat. No. PCR-273]) a 100V por aproximadamente 1 hora y visualizados en un transiluminador UV. El volumen restante de cada reacción fue almacenado a -20°C.

PCR punto final

Una vez determinada la temperatura óptima de amplificación que fuera coincidente con cada par de primers se repitió la PCR con la temperatura de anillamiento establecida bajo las mismas concentraciones de reactivos y condiciones de ciclado.

Optimización de PCR multiplex

Teniendo las condiciones adecuadas de amplificación se realizó una sola reacción de PCR con los primers DMRT1 y DM-W bajo las siguientes condiciones: 20 ng ADNg control (♀/♂), 1 unidad *Taq* (*Taq* DNA Polymerase, Invitrogen, Cat. No. 18038), 1X *Taq* DNA Polymerase PCR Buffer (Invitrogen, Cat. No. 18067-017), 3mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2μM DMRT1 Forward Primer, 0.2μM DMRT1 Reverse Primer, 0.2μM DM-W Forward Primer, 0.2μM DM-W Reverse Primer, 0.2μM dNTPs, H₂O cbp 20μL y se corrieron con el siguiente ciclo de amplificación:

Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	1 minuto	} x 40 ciclos
Anillamiento	59°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Los productos de la PCR multiplex control fueron corridos en un gel de agarosa al 2.5% en TAE (7µL de reacción, 2µL de buffer de carga 5X, 1µL de SYBR DNA Stain 11X [Jena Bioscience, Cat. No. PCR-273]) a 100V por aproximadamente 90 minutos y visualizados en transiluminador UV. El volumen restante de cada reacción fue almacenado a -20°C.

Sexado de organismos juveniles

El ADNg de los individuos *X. laevis* experimentales fue obtenido de una extracción directa de muestras sanguíneas de los individuos usando el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, Cat. No. D4068) según las instrucciones del proveedor. Las muestras de ADNg obtenidas fueron cuantificadas en un nano-espectrofotómetro (NanoDrop® 2000, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) se realizaron alícuotas de cada muestra con una concentración de 20ng/µL y se almacenaron a -20°C.

Se realizó una PCR multiplex con los primers dmrt1 y dm-w (ver tabla 2, resultados y discusión) bajo las siguientes condiciones: 20 ng ADNg experimental, 1 unidad *Taq* (*Taq* DNA Polymerase, Invitrogen, Cat. No. 18038), 1X *Taq* DNA Polymerase PCR Buffer (Invitrogen, Cat. No. 18067-017), 3mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2µM DMRT1 Forward Primer, 0.2µM DMRT1 Reverse Primer, 0.2µM DM-W Forward Primer, 0.2µM DM-W Reverse Primer, 0.2µM dNTPs, H₂O cbp 20µL y se corrieron con el siguiente ciclo de amplificación:

Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	1 minuto	} x 35 ciclos
Anillamiento	59°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Los productos de la PCR multiplex fueron corridos en un gel de agarosa al 2.5% en TAE como se ha descrito previamente.

Formulación de dietas experimentales

Se adquirieron harinas de diferente origen proteico para la elaboración del alimento: 2 harinas de pescado de diferente proveedor (venta a granel, marcas no registradas) y una harina de soya (venta a granel, marca no registrada). Estos productos fueron utilizados para elaborar diferentes lotes de alimento de la siguiente manera: a) Alimento vegetariano (V1): se agregó una proporción 5:1 de harina de soya y goma xantana, esta última, utilizada como el agente aglutinante, dos gotas de aceite de ajo como agente conservador y agua hasta la formación de una pasta semi-espesa y homogénea. Posterior a la homogeneización de la masa, esta se extendió sobre papel encerado de cocina hasta la formación de una fina capa y se secó en un flujo de aire (40°C), por aproximadamente 2.5 h para eliminar la humedad; b) Alimento carnívoro de pescado (C1 y C2): se siguió el mismo procedimiento propuesto para el alimento de soya con dos diferentes harinas de pescado (C1= harina de pescado 1 y C2= harina de pescado 2). Una vez que se secó cada mezcla de alimento, esta se separó del papel encerado y se fragmentó en pequeñas hojuelas, las cuales se almacenaron en un recipiente plástico hermético hasta su uso.

Para determinar que la cantidad de proteína es similar entre los alimentos experimentales, 50 gramos de cada alimento fueron enviados para su análisis bromatológico en el laboratorio Food Service Center (Toluca, Estado de México), que incluyen el análisis fisicoquímico del contenido de proteína, humedad, grasa, cenizas y carbohidratos. El alimento vegetariano V1 obtuvo un contenido proteico del 42.5%, mientras que las mezclas de alimento carnívoro C1 y C2 tuvieron un contenido proteico menor del 29.33 y 29.49%, respectivamente. Considerando los resultados previos, se calculó el contenido proteico original de las harinas de pescado (harina 1= 35.19%; harina 2= 35.38%) para formular una nueva propuesta de alimento carnívoro, ahora añadiendo hidrolizado de caseína para lograr cantidades similares de proteína en comparación con el alimento vegetariano.

El nuevo lote de alimento carnívoro (C3) se realizó de la siguiente manera: se agregaron 226 g de harina de pescado 2, 45.2 g de goma xantana, 28.5 g de hidrolizado de caseína, dos gotas de aceite de ajo y agua hasta la formación de una pasta semi-espesa y homogénea. La masa se extendió sobre papel encerado de cocina hasta la formación de una fina capa y se dejó secar al aire libre por alrededor de 12 h. Una vez seco el alimento, se repitió el proceso de formación de hojuelas y almacenamiento. Las mezclas de los alimentos se enviaron para su análisis bromatológico en el laboratorio Food Service Center (Toluca, Estado de México). El contenido proteico del alimento C3 no fue el adecuado (31.25%), por lo que se consideró un cambio de materia prima. El nuevo alimento carnívoro (C4) sustituyó la harina de pescado por camarón seco

molido sin exoesqueleto (venta a granel, marca no registrada) y se realizó de la misma forma que en los lotes C1 y C2. El análisis bromatológico realizado al alimento reveló un contenido proteico (53.7%) superior al deseado por lo que era necesario elaborar otro alimento.

Para la elaboración del nuevo alimento carnívoro (C5) se mezcló la harina de pescado 2 y el camarón seco molido en proporciones adecuadas para lograr el contenido proteico similar al deseado: se agregaron 135 g de harina de pescado 2, 115.5 g de camarón seco molido, 50.1 g de goma xantana, dos gotas de aceite de ajo y agua hasta formar una pasta semi-espesa, la pasta se extendió en una fina capa sobre papel encerado de cocina y se dejó secar al aire libre por aproximadamente 12 h. El análisis bromatológico mostró que este alimento contenía un porcentaje similar de proteína al deseado (39.98%) por lo que se utilizó como alimento para la dieta experimental.

Formación de grupos

Se adquirieron 20 individuos *X. laevis* juveniles albinos de aproximadamente 5 meses de edad (4cm longitud hocico-cloaca [LHC]) y fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio: tanques de agua con capacidad de 40 L, con volumen de agua madura (NaCl, azul de metileno y acondicionador de agua [siguiendo las instrucciones del proveedor (Acuario ABE, Toluca, Estado de México)]) ~6L, fotoperiodo de 12 h de luz, temperatura 18-22°C para su adaptación. Los individuos adultos fueron tomados de animales previamente adquiridos y mantenidos en cautiverio en el laboratorio.

Animales contemplados para el experimento: Después del procedimiento de adaptación a condiciones de laboratorio y sexado por biología molecular, se contó con 15 ranas *X. laevis* juveniles (4-5 cm LHC, 7 meses) albinas; además de contar con 6 machos adultos (5-6 cm LHC, 2 años) pigmentados y 3 hembras adultas (8-9 cm LHC, 3 años) pigmentadas identificadas por su dimorfismo sexual. Los grupos con organismos juveniles se formaron tomando en cuenta: a) sexo (machos y hembras) y, b) similitud en sus pesos y LHC iniciales, para finalmente establecer 6 grupos con dos organismos cada uno, divididos por sexo (machos o hembras) y las dietas: control (omnívora) y experimentales: carnívora y vegetariana. Con los organismos adultos pigmentados se formaron tres grupos (2 machos, 1 hembra), divididos por la dieta: control, carnívora y vegetariana.

Se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilks con los valores iniciales de peso y LHC de machos y hembras juveniles para identificar el tipo de prueba estadística al cual someter las

medidas morfométricas y parámetros a evaluar. Estos valores posteriormente fueron sometidos a pruebas de Kruskal-Wallis (homólogo de ANOVA de un factor para comparación de más de dos grupos independientes con datos no paramétricos), con un intervalo de confianza de 90% para verificar la similitud de las medidas morfométricas en el tiempo inicial. Las diferencias significativas fueron establecidas para un valor $p < 0.1$ y diferencias no significativas para valor $p > 0.1$ utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25.

Alimentación y crecimiento

Los organismos se mantuvieron en acuarios de 40L con 6L de agua madura con fotoperiodo de 12 h de luz y temperatura ambiente de 18-22°C. Fueron alimentados durante 16 semanas con su respectiva dieta 2 veces por semana *ad libitum* (aproximadamente 40 minutos), tiempo después del cual se retiraron los restos de comida para evitar la contaminación del agua.

Evaluación de valores relativos del crecimiento

Para medir la longitud hocico-cloaca (LHC) que comprende del hueso pre-maxilar a la cloaca fue utilizado un vernier digital; posteriormente los organismos se colocaron individualmente sobre una toalla de papel húmeda para retirar el exceso de agua y se pesaron haciendo uso de una balanza digital con precisión de $\pm 0.1g$. Se realizó una medición previa al inicio de la alimentación para verificar pesos y LHC similares y durante 16 semanas de alimentación diferencial. Con los registros de peso y LHC registrados se calcularon los siguientes parámetros:

Ganancia de peso: evalúa la ganancia de peso durante el periodo de alimentación

$$GP (g) = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

Tasa Específica de Crecimiento (TEC) (%/día): Evalúa la ganancia porcentual de peso por día.

$$TEC = (\% \text{ día}) = \frac{(\log_{10} \text{ peso final (mg)} - \log_{10} \text{ peso inicial (mg)})}{\text{tiempo}} \times 100$$

Los resultados fueron sometidos a pruebas de Kruskal-Wallis (homólogo de ANOVA de un factor para comparación de más de dos grupos independientes con datos no paramétricos), con un intervalo de confianza de 90%. Las diferencias significativas fueron establecidas para un valor $p < 0.1$ y diferencias no significativas para valor $p > 0.1$. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25.

Tomografía Computarizada y establecimiento de HU

Las CT para la determinación de densidad ósea (DO) de fémur fueron realizadas en Multimédica Santa Elena, Ixtlahuaca, Estado de México.

Determinación de DO: Individuos juveniles de *X. laevis* fueron colocados en una solución 1:5000 de agua madura con aceite de clavo por aproximadamente 4 minutos, hasta que no presentaron reflejos de retracción de extremidades inferiores. Posteriormente, fueron escaneadas en un tomógrafo computarizado helicoidal (TOSHIBA, Aquilion 16) en una posición extendida de sus extremidades anteriores y posteriores, bajo los siguientes parámetros técnicos:

- a. Intervalo de imagen: 002 mm
- b. Espesor de reconstrucción: 002 mm
- c. 110kV, 35mA.

Las imágenes se analizaron en el portal de visualización de Multimédica Santa Elena (herramienta virtual) haciendo uso de las herramientas elipse y regla para determinar las unidades Hounsfield del hueso cortical en la parte media de la diáfisis del fémur derecho. Los valores de DO del fémur fueron comparados entre las diferentes dietas (control vs. experimentales) y se realizó un análisis estadístico Kruskal-Wallis para determinar si existe variación significativa en la densidad ósea en función de la dieta consumida.

Establecimiento del número Hounsfield en órganos de *X. laevis*:

Un macho y una hembra adultos de *X. laevis* fueron anestesiados con la solución de esencia de clavo previamente descrita y escaneados en un mastografo MAMOMMAT Fusion (SIEMMENS) para visualizar su anatomía; posteriormente fueron sacrificados por sobredosis de anestesia con triclaína y los órganos fueron diseccionados cuidadosamente y colocados por separado en diferentes columnas con agua y escaneados en un tomógrafo computarizado SOMATOM Emotion Duo (SIEMMENS) bajo los siguientes parámetros técnicos:

- d. Intervalo de imagen: 2 mm
- e. Espesor de reconstrucción: 2 mm
- f. KV 110, 36mA

Las imágenes fueron reconstruidas y analizadas en el software de visualización RadiAnt DICOM Viewer en los tres planos espaciales (axial, coronal y sagital) y considerando 2 regiones de interés (ROI): **ROI amplia**, que abarca la mayor parte del órgano estudiado y **ROI reducida**

(considerando un área arbitraria de 5mm^2 aproximadamente), que contempla la periferia y el centro del órgano. Los datos de media de HU y desviación estándar para las dos ROI de cada órgano fueron registrados y analizados por estadística descriptiva para determinar el rango de HU de cada órgano.

Capítulo IV: Resultados y discusión

Pruebas moleculares para sexado

X. laevis cuenta con un dimorfismo sexual físico identificando la extensión cloacal y la diferencia en la talla, como puede ser observado en la figura 3, en donde se puede distinguir que los individuos adultos macho (3D) son de tamaño significativamente menor que las hembras (3C), mientras que en los individuos juveniles macho (3A) y hembra (3B) no es perceptible la diferencia en tamaño, además de no observarse la extensión cloacal en la hembra lo que dificulta la labor de diferenciar organismos en su etapa juvenil. La diferencia en las tallas dependiente del sexo es un aspecto relevante para considerar en el diseño de proyectos que involucren a esta variable de estudio, dado que sus valores de crecimiento no son los mismos, por lo que considerar el sexado genético de individuos de esta especie en sus etapas juveniles es una buena estrategia para investigaciones presentes y futuras.

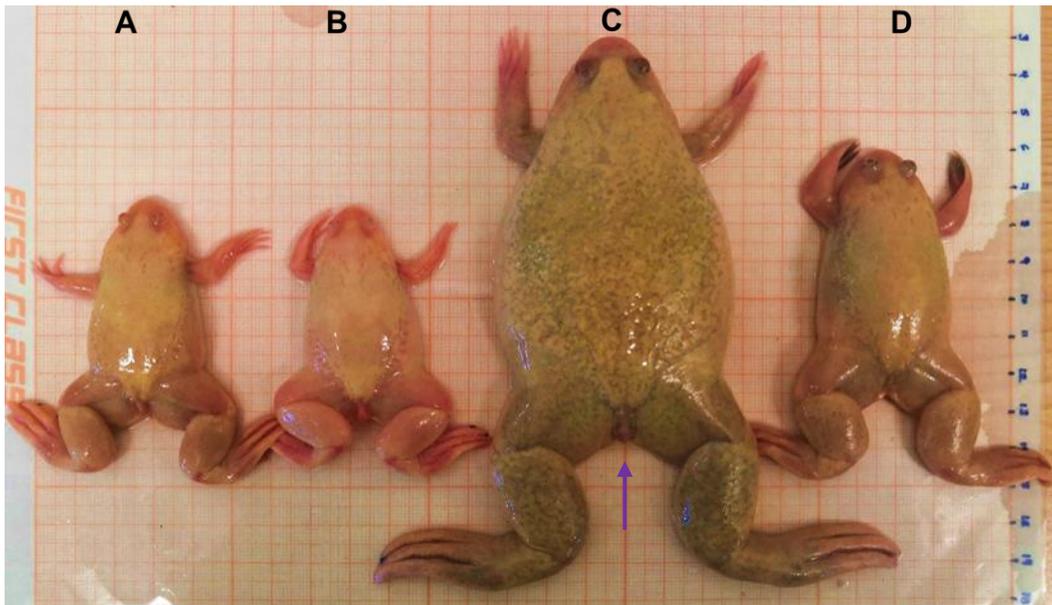


Figura 3. Individuos albinos juveniles y adultos de *X. laevis*. Individuos juveniles: A) Macho, B) Hembra. Individuos adultos C) Hembra, extensión cloacal distinguible (flecha morada), D) Macho.

Dado que el presente estudio toma en cuenta al peso y la LHC de los individuos, era importante agrupar a los organismos de acuerdo con su sexo, en función de hacer un seguimiento para evaluar el crecimiento. Las técnicas basadas en biología molecular son una gran ventaja pues

permiten determinar el estatus sexual de los organismos aun cuando todavía no son evidentes las diferencias físicas que distinguen a un macho de una hembra, por lo que la identificación de los cromosomas sexuales en el organismo es una manera sencilla de identificar el sexo genético.

Con el paso del tiempo se han propuesto diferentes primers para la amplificación de secuencias específicas de los cromosomas Z/W de *X. laevis* haciendo uso de las distintas modalidades de la PCR; en la búsqueda bibliográfica se identificaron 10 pares de primers candidatos para usar como sistema de determinación sexual en los individuos juveniles de este estudio y los cuales se muestran en la tabla 2.

Con los primers disponibles para identificación de GDS se determinó que la PCR punto final era la técnica más adecuada para este estudio por sus múltiples características: a) Es una técnica cuantitativa, es decir sólo evalúa la presencia/ausencia del gen de interés y no es necesaria la cuantificación puesto que la determinación del sexo genético no depende del número de copias de los GDS; b) los reactivos y el equipo disponible; el LaBiMoDe cuenta con los reactivos y equipo necesarios para PCR's punto final y análisis de los productos de la PCR (amplicones), realizar

Tabla 2. Primers identificados para GDS en *X. laevis*

Gen o región	Tipo de PCR		Secuencia	Tp	TA
<i>dm-w</i> ^{a,c *}	Genómica	Fw	CCACACCCAGCTCATGTAAAG	21pb	~259pb
		Rv	GGGCAGAGTCACATATACTG	20pb	
<i>W-specific 1 (W1)</i> ^b	Genómica	Fw	CACTTGCAGGGTTGCATTTTC	21pb	NE
		Rv	ATGCAGTTGTCCCTGTGATC	20pb	
<i>W-specific 3 (W3)</i> ^b	Genómica	Fw	AAAACCATGACCTCCCGGATAC	22pb	NE
		Rv	TAGGGAGGGGTTTGGAGGTTTC	21pb	
<i>dmrt1</i> ^{a,c *}	Genómica	Fw	AACAGGAGCCCAATTCTGAG	20pb	~203pb
		Rv	AACTGCTTGACCTCTAATGC	20pb	
<i>Z-specific 1 (Z1)</i> ^b	Genómica	Fw	AGTCGAACCAGTCCCGCCAG	20pb	NE
		Rev	CCTCGATCAAACACATCTCG	20pb	
<i>Z-specific 2 (Z2)</i> ^b	Genómica	Fw	AGTTGCAGTACCATTCTTC	20pb	NE
		Rv	TAAAGTGCCAGCAGGGAGCC	20pb	
<i>dmw</i> ^{b*}	Tiempo real	Fw	CATTGCAAAGACAGCAAGCT	20pb	NE
		Rv	TCTGTGTTGCAGCATCAGCA	20pb	
<i>scanw</i> ^b	Tiempo real	Fw	TAACCCGACAGCAGTCCATAC	21pb	NE
		Rv	GCCGCATCAAAGTCTCGACT	20pb	
<i>ccdc69w</i> ^b	Tiempo real	Fw	ATGGAGAGAAATCTGGTG	18pb	NE
		Rv	TGCTTAGCAGCTCCTCAGAT	20pb	
<i>capn5z</i> ^b	Tiempo real	Fw	CAGGTGGAGTTGAACTGCAC	20pb	NE
		Rv	CGTGTCACCAGGATTAACA	20pb	

Fuentes bibliográficas: ^aYoshimoto et al., (2008). ^bMawaribuchi et al., (2017). ^cOCDE (2015).

Tp: No. de pares de bases del primer. TA: tamaño de amplicón

una PCR de otro tipo implica el uso de sistemas reporteros de fluorescencia, generalmente sondas, además de equipo especializado de detección, por lo que la PCR punto final es la opción más indicada en cuestión de economía y disponibilidad de recursos; y finalmente c) el análisis de amplicones, para verificar la amplificación exitosa y el tamaño de banda adecuado. Con estas propiedades se concluye que la PCR punto final es la que mejor se adaptaba al estudio y capacidades del laboratorio.

Dado que la técnica elegida fue la PCR punto final se descartaron los 4 pares de primers que están diseñados para PCR en tiempo real (dm-w, scanw, ccdc69w y capn5z), y conforme a los resultados de la herramienta básica de búsqueda de alineación local, mejor conocida como BLAST por sus siglas en inglés (anexo 1), también fue posible descartar el primer Z2, ya que este no demostró tener alineación con alguna secuencia del genoma de *X. laevis*, en la base de NCBI. El resto de los primers candidatos demuestran ser adecuados para la amplificación de secuencias por lo que con la herramienta PCR virtual del programa Serial Cloner (anexo 2) fue posible obtener la temperatura de anillamiento (Tm) factible para la reacción y el tamaño de los amplicones esperados dado que, para algunos primers, estos datos no están reportados en la literatura, por lo que era necesario generarlos como un factor de discernimiento; los datos obtenidos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de resultados BLAST y PCR virtual

Primer	Cadena molde usada	GenBank ID	Tm	Tamaño
dm-w	<i>Xenopus laevis</i> DNA. BAC clone - XLB1-344G18, complete sequence	AP013026.1	58.4°C	260pb
W1	<i>Xenopus laevis</i> DNA, BAC clone XLB1-061P14, strain: J, complete sequence	AP014668.1	58.4°C	254pb
	<i>Xenopus laevis</i> DNA. BAC clone - XLB1-344G18, complete sequence	AP013026.1	58.4°C	254pb
W3	<i>Xenopus laevis</i> DNA, BAC clone XLB1-218F05, strain: J, complete sequence	AP014673.1	63.3°C	316pb
DMRT1	PREDICTED <i>Xenopus laevis</i> doublesex and mab-3 related transcription factor 1L homeolog (dmrt1.L), transcript variant X1, mRNA	XM_018250680.1	56.4°C	204pb
	<i>Xenopus laevis</i> DNA. BAC clone XLB1-234B17, complete sequence	AP013016.1	56.4°C	204pb
Z1	<i>Xenopus laevis</i> DNA, fosmid clone XLFIC-012O19, strain J, complete sequence	AP014677.1	58.4°C	371pb
	<i>Xenopus laevis</i> DNA, BAC clone XLB1-137C07, strain J, complete sequence	AP014671.1	58.4°C	371pb

Acorde con los resultados BLAST y PCR virtual, y a los propósitos de sexado de este estudio, se encontró que los primers *dm-w* y *W1* amplifican la misma secuencia interés (azul) y se descartó al primer *W3* (amarillo), debido a que su T_m rebasa de entre 5 a 7°C a la T_m de los primers candidatos para el cromosoma Z, aspecto no adecuado para la realización de una PCR multiplex. Aunque tanto el primer *DMRT1* como *Z1* pueden ser usados para sexado, la OCDE en su documento “The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)” (OCDE, 2015) propone al método de [Yoshimoto et al., \(2008\)](#) como el adecuado para el sexado genético de *X. laevis*, el cual utiliza a *dmrt1* y *dm-w* como los genes de interés. En el pollo, el gen *dmrt1* tiene un papel importante en la formación de testículos y está ligado al cromosoma Z, por dichas razones se propuso que éste cumple con una función similar en *X. laevis*; en el estudio de [Yoshimoto et al., \(2008\)](#), se logró demostrar que en *X. laevis*: a) el gen no está ligado al cromosoma sexual Z, pues gracias a la técnica de FISH (Hibridación Fluorescente *in situ*, por sus siglas en inglés) se evidencia que presenta 2 copias (*DMRT1 α* y *DMRT1 β*) en los cromosomas *XLA1L* y *XLA1S* ([Session et al., 2016](#)), nomenclatura utilizada puesto que *X. laevis* es un organismo tetraploide; b) *dmrt1* tiene un papel importante en la formación de testículo y c) se identificó un gen parálogo a *dmrt1* que sólo está presente en individuos femeninos: *dm-w*. Con el aislamiento de *dm-w*, se reveló que este gen cumple con una función antagónica a *dmrt1*, y por tanto es responsable de inhibir la función de *dmrt1* y participar en la formación de ovarios. A través de la técnica de FISH se reconoció la presencia de *dm-w* en el cromosoma *XLA2L* ([Session et al., 2016](#)), estableciendo a este por primera vez como el par de cromosomas sexuales en *X. laevis* y a *dm-w* como el primer gen ligado al cromosoma W.

El descubrimiento de estos dos genes implicados en la determinación del sexo, hicieron posible para [Yoshimoto et al., \(2008\)](#) proponer el sistema de sexado genético para *X. laevis*, en estadio larvario y organismos adultos. A pesar de que *dmrt1* demostró no ser un gen ligado al cromosoma Z, este cumple una importante función en la diferenciación sexual, y la amplificación de su secuencia es pertinente pues puede ser considerado un gen control para la PCR, que aumente la confiabilidad del sexado al estar presente en ambos sexos, y sólo depende de la presencia de *dm-w* cambiar el estatus genético de un organismo para diferenciar entre un macho y una hembra, por lo que *DMRT1* fue el primer seleccionado para el sexado, descartando así a *Z1* (rojo) como secuencia de identificación, sin embargo no se descarta su utilidad en otros métodos similares. Aunque [Mawaribuchi et al., \(2017\)](#) en años posteriores proponen nuevas secuencias específicas de los cromosomas sexuales como la amplificación de secuencias específicas de Z y W o propone nuevos genes identificados en estos cromosomas (fig. 4), según análisis BLAST

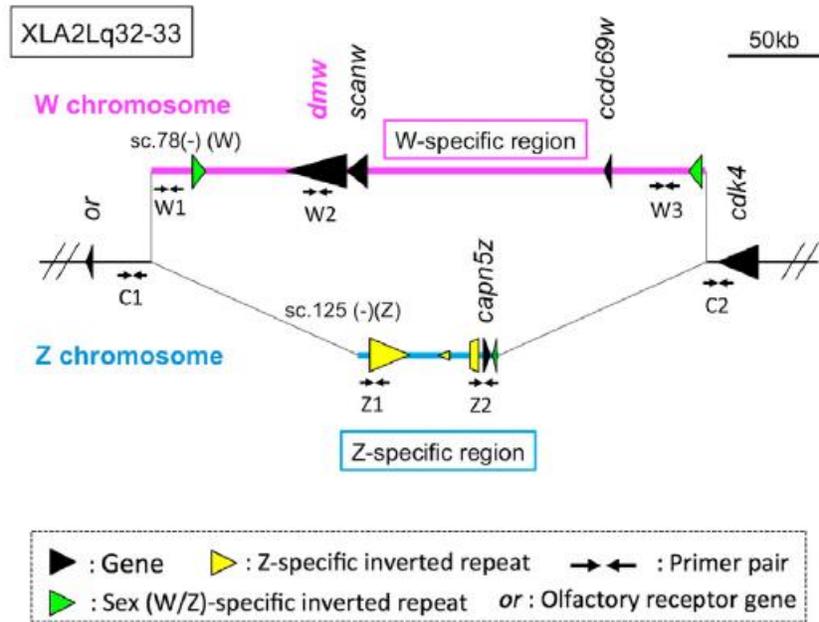


Figura 4. Representación esquemática de loci específico de Z y W en *X. laevis* cromosoma 2L (XLA2L). En rosa y azul se muestran las regiones específicas de Z y W. Con flechas se muestra la posición de los primers propuestos. Tomada de [Mawaribuchi et al., \(2017\)](#).

y PCR virtual realizados para este estudio (resultados no mostrados) estos demuestran no ser adecuadas para sexado genético usando como cadena molde ADNg.

La cadena molde a utilizar para esta PCR es ADNg, y la fuente de obtención y el método de extracción son factores críticos para obtener material genético de calidad y pureza. En la biología molecular existen una gran cantidad de métodos de extracción y fuentes biológicas entre ellas la sangre, saliva, tejidos u órganos; en el caso de animales de laboratorio, se han desarrollado algunos métodos que requieren el sacrificio del animal o biopsias con técnicas altamente invasivas para el animal que implican su sufrimiento ([Mendoza et al., 2012a](#)). En el desarrollo de esta investigación, se priorizó el uso de técnicas no destructivas o letales, que permitan el seguimiento del experimento una vez logrado el sexado genético y el sufrimiento en la menor medida posible de los organismos experimentales.

Para los anfibios, se han propuesto métodos de extracción que implican en la mayoría de las ocasiones la obtención de sangre total a través del recorte de alguno de sus dígitos (toe clipping), un método muy usado no solo en la extracción de sangre, sino como método de identificación, sin embargo, es un método altamente invasivo, ya que modifica la fisiología del animal. Algunos autores como [Mendoza et al. \(2012a, 2012b\)](#) han propuesto nuevos métodos de extracción de ADN para anfibios, que pretenden ser menos dañinos con el organismo, uno de los métodos usa

como fuente biológica la mucosa epitelial y otro la obtención de sangre total a través de la punción de la vena media abdominal. El uso de sus técnicas demostró ser efectivo con una extracción de ADN total de calidad, sin embargo, es posible mejorar dichos métodos o proponer nuevos que sean menos dañinos con el organismo a estudiar.

Una vez alcanzado el periodo de adaptación de los organismos, durante el cual hubo pérdida de tres individuos, se propusieron dos métodos de obtención de ADN en *X. laevis* similares a los que propone [Mendoza et al. \(2012a, 2012b\)](#) y los cuales son descritos en la metodología. El método de obtención de sangre total fue propuesto por Cedillo-García (datos no publicados) en LaBiMoDe e implica la obtención de sangre a partir de la vena *dorsalis pedis*, teniendo acceso a ella a través del espacio interdigital de la extremidad posterior derecha ([Millard y Stephenson, 1940](#)) como se observa en la figura 5. Al ser este un método semi-invasivo, necesario para perforar la membrana interdigital para acceder a la vena, el uso de anestesia es necesario para reducir el dolor en los individuos y una forma más rápida de recolección de sangre, pues durante el periodo de inconsciencia el organismo no presenta reflejos de retracción de extremidades que pueden dificultar el proceso ([Vázquez et al., 2013](#)).



Figura 5. Recolección de sangre total de zona interdigital de *X. laevis*

En el proceso de extracción se percibió que la dosis empleada de aceite de clavo como anestésico (200 μ L/L) en LaBiMoDe es adecuada para inducir, según criterios de [Vázquez et al. \(2013\)](#), la fase 5 de inducción de anestesia que contempla la pérdida total de la respuesta estímulos, ritmo opercular lento (movimiento de inhalación y exhalación) y pérdida de todos los reflejos; también se observa que el tiempo de exposición al anestésico guarda gran relación con la talla del organismo, pues a mayor talla, mayor el tiempo de exposición. Durante el proceso de

anestesia para la extracción de sangre total para los individuos juveniles dos organismos fallecieron, probablemente debido a un exceso en el tiempo de exposición al anestésico, por tanto, en este proceso es necesario vigilar cuidadosamente al organismo.

La calidad y concentración del ADNg, son dos factores críticos para pruebas moleculares ya que de estos depende el correcto funcionamiento de las técnicas. De acuerdo con los métodos utilizados para la extracción de ADN según la muestra biológica y el proceso de extracción se obtuvieron los valores de cuantificación que permitan seleccionar las muestras más adecuadas y los cuales se muestran en la tabla 4.

La técnica que demostró mayor eficacia en calidad y concentración fue el uso de kit QIAGEN (remarcado en verde en la tabla 4), usando como fuente biológica la sangre total. Es importante destacar la ventaja del uso de la sangre total, pues la concentración obtenida es alta tomando en cuenta el volumen aproximado utilizado (~200µL) ya que los eritrocitos de anfibios son nucleados y es posible obtener una mayor cantidad de ADNg.

Tabla 4. Concentración y calidad de ADNg control con los diferentes métodos de extracción

Muestra	Método de extracción	Fuente biológica	Concentración (ng/µL)	Radio 260/280	Radio 260/230
Hembra control	Mucosa epitelial	Método no comercial	2.096	5.25*	0.047
		Kit QIAGEN	10.199	0.148	0.189
	Sangre total	Método no comercial	10.449	0.13	0.087
		Kit QIAGEN	126.44	1.829	1.68^
Macho control	Mucosa epitelial	Método no comercial	9.75	0.124	0.017
		Kit QIAGEN	14.05	0.2	0.052
	Sangre total	Método no comercial	12.349	1.26	0.169
		Kit QIAGEN	99.050	1.929	2.199

Nota: * valor del radio fuera de rango, ^Valor menor a rango aceptado de pureza

Dada la sensibilidad de la técnica de PCR, esta reacción puede amplificar con un mínimo de 20ng de ADNg por lo que incluso con una baja extracción de material genético como la observada en el método de extracción no comercial y mucosa epitelial sería posible realizar la PCR, sin embargo, la baja pureza del ADN es un factor que puede inhibir la reacción y no permitir la

amplificación de secuencias. Según los resultados mostrados en la tabla 4, existe contaminación con proteínas (radio 260/280<1.8) y componentes orgánicos (radio 260/230<1.8) en todas las muestras a excepción de las obtenidas con sangre total y el kit de extracción QIAGEN.

A pesar de la información bibliográfica sobre el protocolo de amplificación de las secuencias de interés para el sexado de *X. laevis* ([Yoshimoto et al., 2010](#); [Yoshimoto et al., 2008](#)), es importante corroborar la reproducibilidad del proceso de sexado, por lo que se realizó una PCR con gradiente de temperatura (descrita en métodos) para el primer dm-w. Esta secuencia puede ser la más importante de corroborar, dado que es la que define el sexo genético femenino, mientras la secuencia de *dmt1* es considerada en la bibliografía como un control interno para la PCR. Como se muestra en la figura 6. el gradiente de temperatura resulta en la presencia de dos bandas amplificadas: una banda bien definida a una T_m de 59°C (flecha naranja) y otra banda de menor intensidad a una T_m de 60°C (flecha verde), que se encuentran en un peso de entre 200bp y 300bp, tamaño aproximado de la banda esperada de dm-w (260pb). También es perceptible un arrastre de ADNg observado como un barrido fluorescente que interfiere con la interpretación del gel de agarosa, esto puede deberse a una cantidad en exceso de ADNg para la PCR o el uso de ADNg degradado.

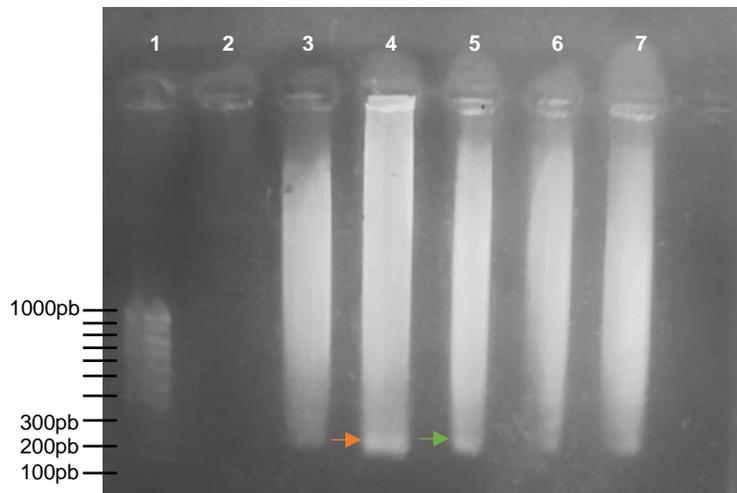


Figura 6. Optimización de T_m de dm-w. 1) Escalera molecular (100 pb), 2) Blanco ($T_m=60^\circ\text{C}$), T_m a probar: 3) 58°C , 4) 59°C , 5) 60°C , 6) 61°C , 7) 62°C .

Una nueva PCR punto final con un nuevo ADNg control (♀) fue realizada para los primers de sexado dm-w y *dmt1* y el gen de control interno Histona 4 (H4) utilizado en LaBiMoDe con $T_m=59^\circ\text{C}$, la cual demostró ser mejor para la amplificación de dm-w en la PCR con gradiente de temperatura; en la figura 7 se observa que las tres secuencias de interés amplifican a la misma

temperatura, lo que hace posible utilizar a dm-w y dmrt1 como primers de sexado en una PCR multiplex.

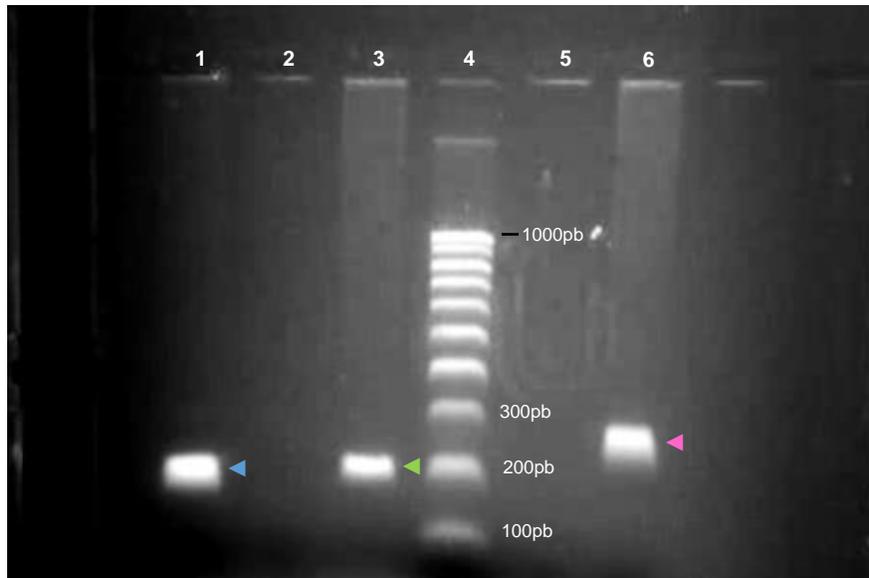


Figura 7. Productos de PCR. Carril 1) H4 (flecha azul), 2) Blanco dmrt1, 3) dmrt1 (flecha verde), 4) Escalera molecular (100pb), 5) blanco dm-w, 6) dm-w (flecha rosa).

En la PCR multiplex de prueba (fig. 8) con la T_m determinada como adecuada (59°C) y según las condiciones de amplificación descritas en métodos, se comprobó la presencia de las bandas dmrt1 (flecha verde) y dm-w (flecha rosa) tanto en las reacciones individuales como en la reacción multiplex, sin embargo, también se distingue la amplificación de una banda de tamaño similar a dm-w (flecha amarilla) en el carril 3; la presencia de esta banda indeseada puede significar la contaminación de la reacción blanco con ADN control, por lo que fue necesario repetir la reacción para comprobar el correcto funcionamiento de la PCR multiplex en el sexado de organismos. El resultado de la nueva PCR multiplex control para dmrt1 y dm-w se muestra en la figura 9 en ella se observa la presencia de las bandas de dmrt1 y dm-w en las PCR's individuales y multiplex sin la presencia de bandas indeseadas. Con ambos resultados obtenidos de la PCR multiplex prueba se decidió disminuir la cantidad de ciclos de amplificación de 40 a 35 para el sexado de los organismos a manera de obtener un menor ancho de banda para una mejor interpretación de resultados.

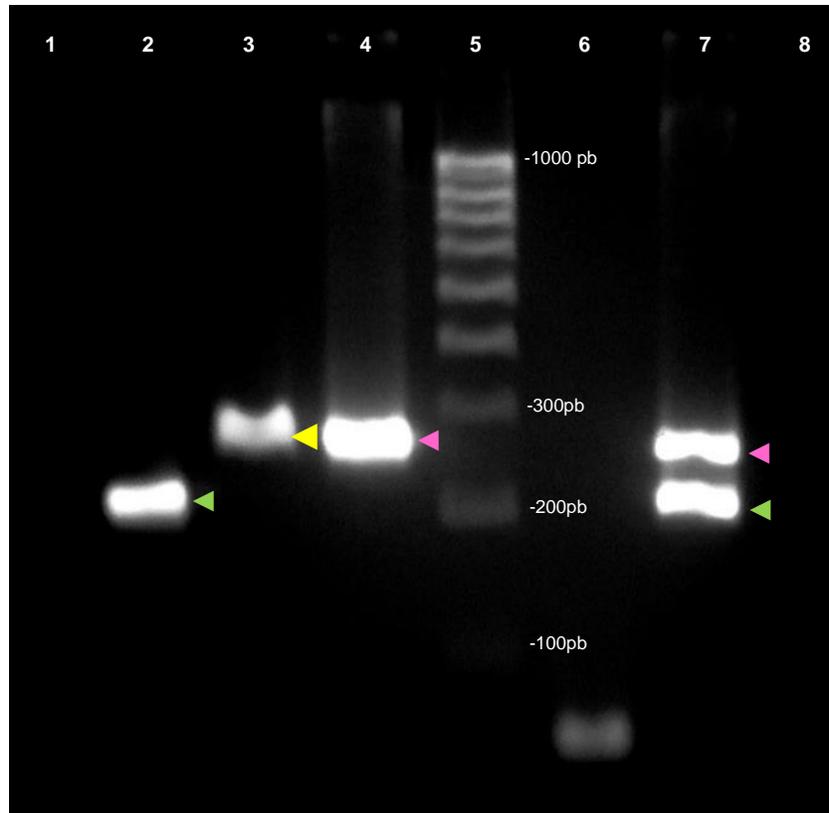


Figura 8. Optimización de PCR multiplex para sexado genético. Carril 1) blanco *dmrt1*, 2) *dmrt1* (flecha verde), 3) blanco *dm-w*, 4) *dm-w* (flecha rosa), 5) escalera molecular (100pb), 6) blanco multiplex (*dmrt1*+*dm-w*), 7) Reacción multiplex (*dmrt1*+*dm-w*).

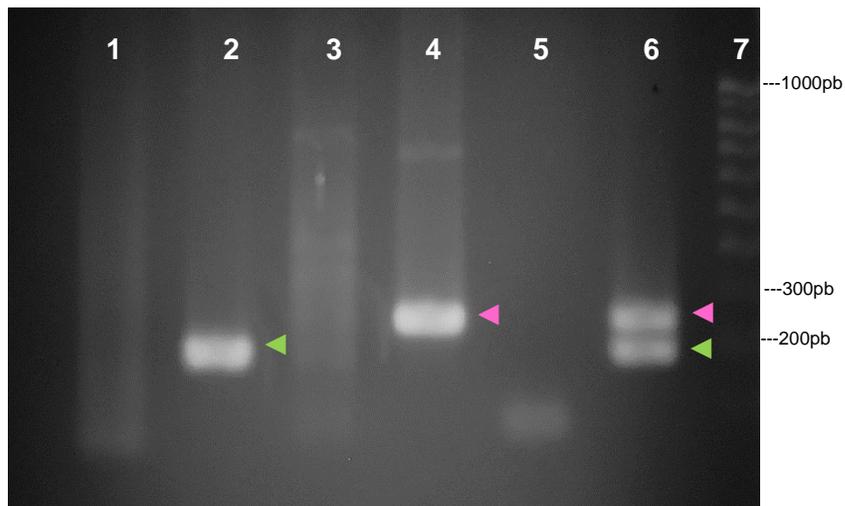


Figura 9. PCR multiplex control ♀. Carril 1) Blanco *dmrt1*, 2) *dmrt1* (flecha verde), 3) blanco *dm-w*, 4) *dm-w* (flecha rosa), 5) blanco reacción multiplex (*dmrt1* + *dm-w*), 6) reacción multiplex (*dmrt1* + *dm-w*), 7) Escalera molecular (100pb).

Con los nuevos parámetros de ciclado para la PCR multiplex se sometió a los 17 individuos juveniles a sexado genético para ser divididos de acuerdo con el sexo. Como se observa en la

figura 10, 7 individuos son identificados como hembras, por la presencia de las bandas *dmrt1* (flecha verde) y *dm-w* (flecha rosa), mientras que otros 10 individuos son identificados como machos, pues solo hay amplificación de la banda *dmrt1*. De acuerdo con la cantidad de hembras y machos obtenidos por el sexado genético era posible formar 6 grupos experimentales divididos en los 3 tipos de dietas (2 hembras, 3 machos), no obstante, una vez pesados y medidos (LHC), se hizo una homogeneización de grupos para tener un peso y medidas iniciales similares, lo que resultó en la formación de 6 grupos de evaluación, 3 grupos con 2 machos y 3 grupos con 2 hembras para las dietas experimentales: carnívora y vegetariana; y la dieta omnívora (dieta estándar/control). Se formaron también 3 grupos con una hembra y dos machos adultos *X. laevis*

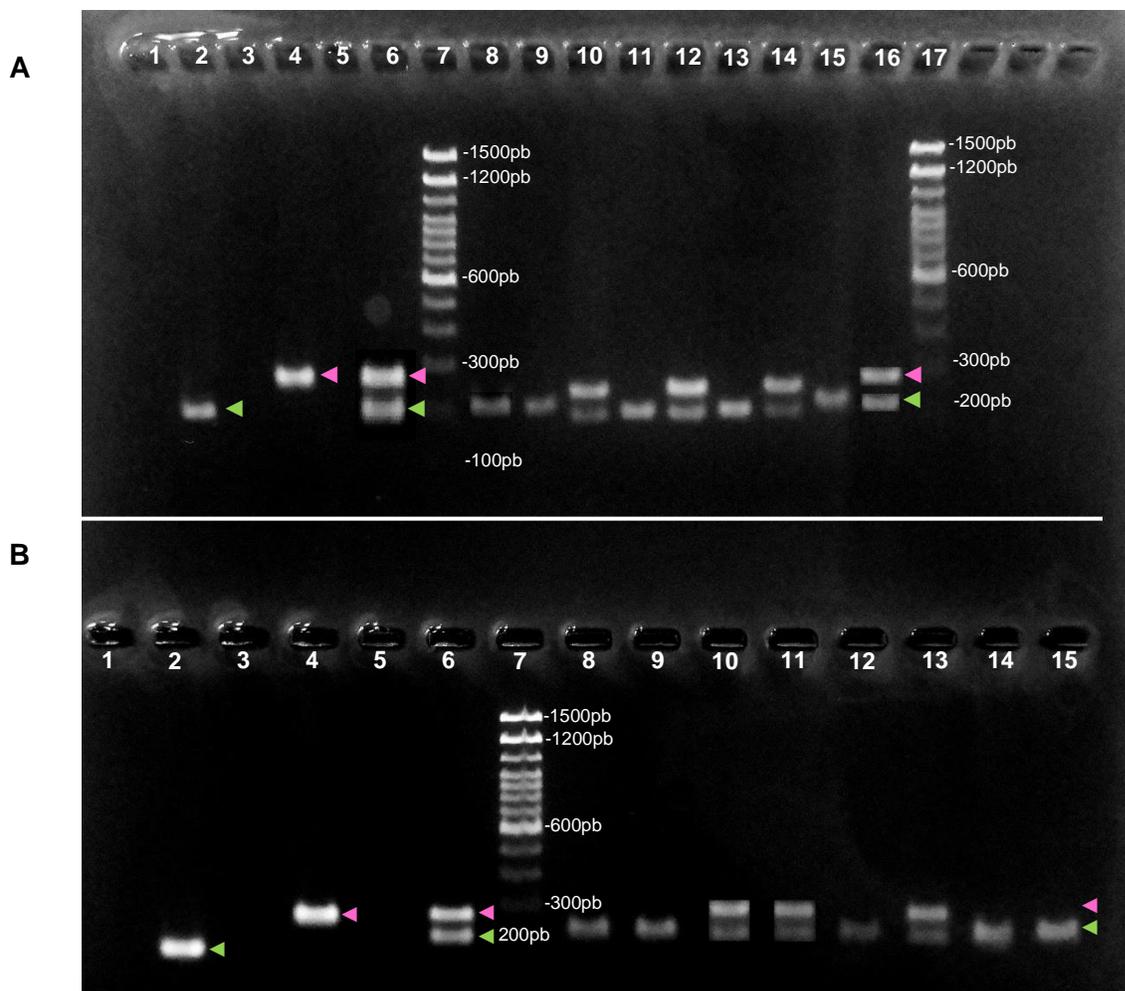


Figura 10. Sexado de individuos *X. laevis* juveniles. **Amplificaciones de controles de la reacción:** Carriles A1, B1) blanco *dmrt1*; A2, B2) *dmrt1* (flecha verde); A3, B3) Blanco *dm-w*; A4, B4) *dm-w* (flecha rosa); A5, B5) blanco multiplex (*dmrt1* + *dm-w*); A6, B6) reacción multiplex control (♀ / *dmrt1* + *dm-w*). Escalera molecular 100pb (Carriles 7A, 17A, 7B). **Individuos hembra:** Carriles 10A, 12A, 14A, 16A, 10B, 11B y 13B. **Individuos macho:** 8A, 9A, 11A, 13A, 15A, 8B, 9B, 12B, 14B, 15B.

pigmentados cada uno para las dietas carnívora, vegetariana y omnívora. La determinación del sexo en los individuos adultos se realizó por identificación del dimorfismo sexual identificado por la diferencia en el tamaño y la presencia/ausencia de la extensión cloacal.

Con los resultados obtenidos, se pudo constatar que las pruebas PCR con las secuencias *dmrt1* y *dm-w* asociadas al sexo, son adecuadas para el sexado de los organismos *X. laevis* con condiciones similares a las previamente establecidas en la bibliografía y éstas suponen una ventaja en tiempo y certeza por sobre las técnicas de diferenciación morfológica comúnmente utilizadas. Si bien, no se hicieron hallazgos nuevos con respecto a las secuencias de identificación obtenidas en literatura, si se logró establecer un método útil para sexar organismos de diversas edades post-metamorfosis usando sangre como muestra biológica para la obtención de ADNg, sin la necesidad de recurrir a técnicas altamente invasivas que frecuentemente son empleadas en la investigación y que representan sufrimiento y/o muerte para los organismos estudiados. Este método poco invasivo permite hacer un seguimiento temprano de los individuos experimentales cuando es necesario evaluar parámetros de estudio en donde la edad es un factor relevante.

Efecto de las dietas sobre parámetros de crecimiento de *X. laevis*

Para la alimentación de los grupos en las dietas experimentales a evaluar era necesaria la formulación del alimento cuyo contenido nutrimental en relación con la cantidad de proteína fuera similar. El alimento comercial usado en LaBiMoDe (Nutripec desarrollo 3.5mm, Purina) para la alimentación de organismos *X. laevis* en cautiverio, contiene, según la información proporcionada por el proveedor un 35% de proteína y 7% de grasas y puede ser catalogado como un alimento omnívoro, pues este contiene: carne y alimentos de origen animal, pescado y derivados, verduras, vitaminas, minerales y aditivos. Basándonos en el contenido declarado de la dieta habitual de los organismos en cautiverio ([McWilliams, 2008](#)), se propuso un contenido similar de proteína ($\pm 40\%$) para las dietas experimentales; para lograrlo fueron necesarias diferentes mezclas a base de harinas de diferente origen proteico; las hojuelas resultantes de estas mezclas se sometieron a análisis bromatológico en el laboratorio Food Service Center (Toluca, Estado de México) para conocer el contenido de proteínas, cenizas, grasas, carbohidratos y humedad, los cuales se muestran en la tabla 5. Como se puede apreciar en los resultados de la bromatología, para el alimento carnívoro, el porcentaje de proteínas deseado ($\sim 40\%$) se logró hasta la quinta mezcla (C5) con harina de pescado y camarón, la cual contiene una cantidad similar de proteínas

Tabla 5. Análisis bromatológicos de las formulaciones de los alimentos elaborados

# Mezcla	Fuente	Proteína (%)	Cenizas (%)	Grasas (%)	Carbohidratos (%)	Humedad (%)
	Harina de soya ^a	50.60	16.02	1.9	22.99	8.49
V1	Hojuela de soya	42.50	5.71	28.54	11.88	11.37
	Harina de pescado 1 ^b	35.38				
C1	Hojuela de pescado 1	29.33	22.28	5.92	34.84	7.63
	Harina de pescado 2 ^c	59.36	-	25.12	-	3.85
C2	Hojuela de pescado 2	29.49	33.86	8.45	15.53	12.67
C3	Hojuela de pescado / caseína	31.25	35.72	8.41	15.75	8.9
C4	Hojuela de camarón	53.7	9.85	10.24	20	6.21
C5	Hojuela de pescado / camarón	39.98	9.85	11.37.	28.24	10.56

Nota. ^a Contenido conocido por bromatología. ^b Dato calculado. ^c Datos reportados por el proveedor

en relación con las hojuelas de soya (V1) y con el porcentaje proteico propuesto; además de haber reducido considerablemente el porcentaje de cenizas (minerales y material orgánico) en comparación con las otras mezclas de alimento que solo contenían harina de pescado.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el crecimiento de *X. laevis* no depende del alcance de la madurez sexual, sino que éste es paulatino y los organismos consiguen el máximo en su talla en años posteriores a la etapa de reproducción activa ([Garvey, 2000](#); [Solís M, 2004](#)); por consiguiente, la talla como variable de estudio puede ser monitoreada en un rango amplio de tiempo inclusive cuando los organismos ya son considerados adultos. A pesar de estas consideraciones, en el periodo inicial de desarrollo es posible ver una mayor diferencia en el ritmo de crecimiento y realizar seguimientos de este puede dar información importante sobre los factores que lo afectan, por lo que resulta relevante evaluar el efecto que puede generar el cambio en el origen proteico de la dieta.

Para verificar que los grupos experimentales divididos por sexos y dieta experimental iniciaran con medidas de peso y longitud similares, primero fue necesario realizar una prueba estadística para comprobar que no existieran diferencias significativas entre los grupos. Para el análisis estadístico, primero se realizó una prueba de normalidad para conocer si los datos registrados en las dos variables de crecimiento (peso y LHC) siguen una distribución normal. La prueba de normalidad Shapiro-Wilks muestra que no hay diferencias significativas entre los valores de peso en machos ($p = 0.935 > 0.1$) y hembras ($p = 0.727 > 0.1$) y los valores de LHC en machos ($p = 0.497 > 0.1$) y hembras ($p = 0.890 > 0.1$) con un 90% de confianza, por lo que se puede concluir que los datos provienen de una población normal. Dado que el tamaño de las muestras para cada grupo experimental es muy pequeño ($n=2$) y la distribución en cada grupo no puede ser comprobada adecuadamente (por el tamaño de la muestra), entonces es necesario utilizar pruebas no paramétricas para los análisis, sin embargo, es importante recalcar que al utilizar pruebas no paramétricas en datos que cumplen el supuesto de normalidad, la potencia de las pruebas para rechazar las hipótesis nulas se ve reducida.

La similitud de los pesos en el tiempo inicial del experimento se comprobó con una prueba de Kruskal-Wallis (homólogo de prueba ANOVA de un factor); la prueba demuestra que los organismos experimentales hembras ($p = 1.0 > 0.1$) y machos ($p = 1.0 > 0.1$) comenzaron la alimentación con pesos similares entre tratamientos con un 90% de confianza. Durante el periodo de alimentación, las dietas experimentales y estándar fueron suministradas a su grupo correspondiente a lo largo de 16 semanas, en las cuales los individuos fueron pesados semanalmente y los datos registrados para realizar los cálculos de los parámetros de crecimiento: ganancia de peso y tasa de crecimiento.

En la figura 11 se muestra el peso promedio semanal de las hembras por cada grupo experimental, en donde puede apreciarse que existe una tendencia de aumento de peso similar entre el grupo omnívoro (\square) y carnívoro (\diamond) después de un posible periodo de adaptación a la dieta (semanas 5-8), mientras que en el grupo vegetariano (Δ) se nota un descenso paulatino pero constante de peso durante todo el periodo de alimentación. Estas mismas tendencias de peso también se observan en los machos (fig. 12), sin embargo, en estos últimos el aumento de peso después del periodo de posible adaptación al alimento, es en menor proporción en comparación con el observado en las hembras, y el cual podría ser explicado por la presencia del dimorfismo sexual en *X. laevis*.

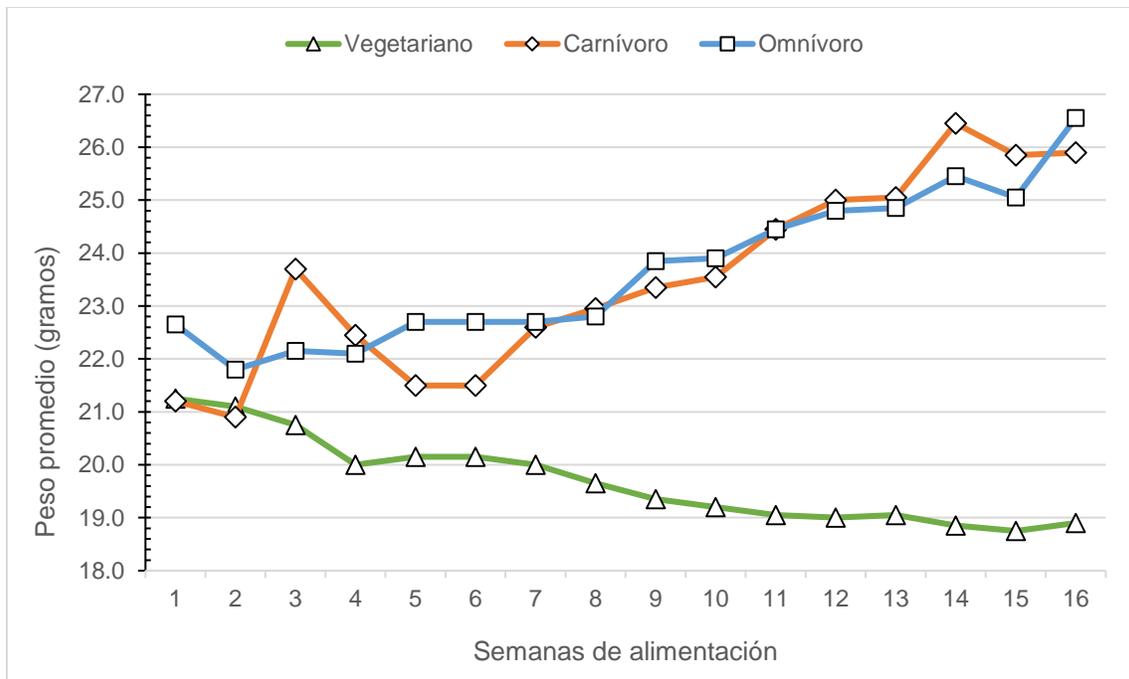


Figura 11. Peso promedio hembras juveniles

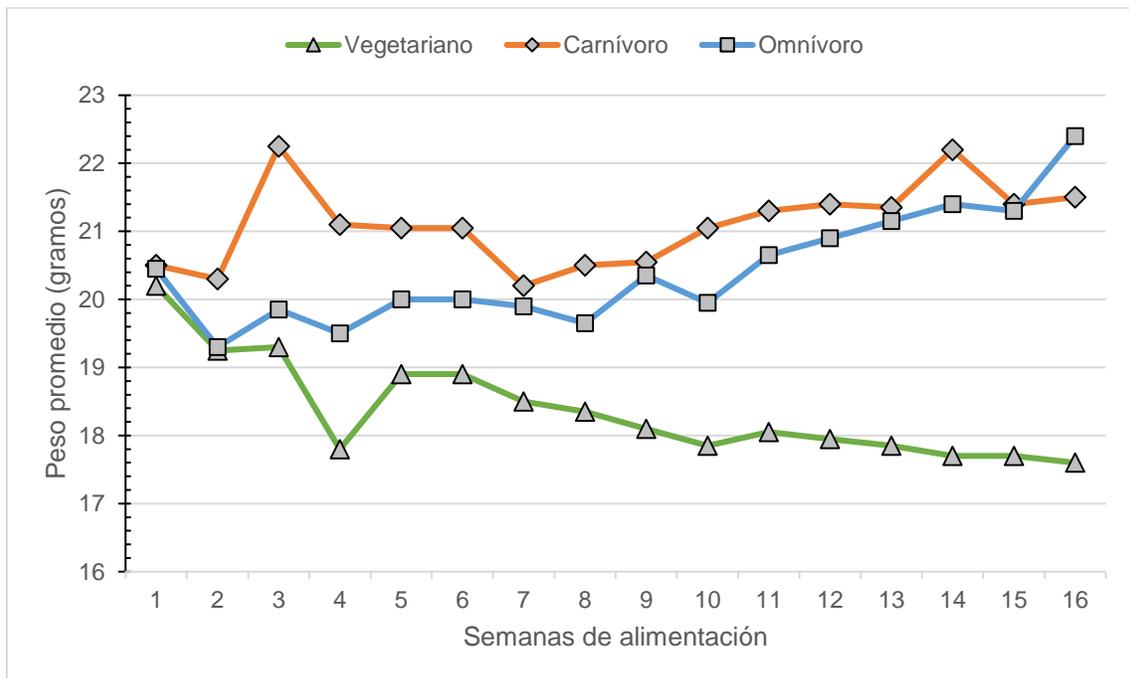


Figura 12. Peso promedio machos juveniles

Aunque en los individuos juveniles existen tendencias de crecimiento diferentes en función de la dieta, la prueba Kruskal-Wallis para el peso final muestra que las diferencias entre los pesos de los grupos en hembras ($p = 0.368 > 0.1$) y machos ($p = 0.565 > 0.1$) no son significativas con un 90% de confianza. Con los registros de pesos durante el periodo de alimentación se calcularon dos parámetros para evaluar el efecto de la dieta en el peso: ganancia de peso y tasa de crecimiento en peso; la ganancia de peso permite conocer la cantidad en gramos que cada grupo aumentó/disminuyó durante el periodo de alimentación y la tasa de crecimiento en peso representa el porcentaje de peso ganado. En la tabla 6 se muestran los parámetros de peso calculados, de los cuales se percibe que los mayores valores de ganancia de peso y tasa de crecimiento en machos y hembras no son específicos de un grupo experimental, puesto que para las hembras estos se distinguen en el grupo carnívoro y en los machos en el grupo omnívoro, no obstante, de acuerdo con las pruebas de Kruskal-Wallis no existen diferencias significativas entre las dietas con un 90% de confianza.

Tabla 6. Valores promedio de parámetros de crecimiento en peso entre dietas (tratamientos) y sexos

	Ganancia de peso			Tasa de crecimiento		
	Carnívoro	Omnívoro	Vegetariano	Carnívoro	Omnívoro	Vegetariano
Hembras	+4.70gr ^o	+3.90gr	-2.35gr	+22% ^o	+17%	-11%
Valor-P	$p = 0.156 > 0.1^*$			$p = 0.180 > 0.1^*$		
Machos	+1.00gr	+1.95gr ^o	-2.60gr	+5%	+10% ^o	-13%
Valor-P	$p = 0.156 > 0.1^*$			$p = 0.156 > 0.1^*$		

Nota: * Estadístico obtenido por prueba de Kruskal-Wallis. ^o Valores máximos

La similitud entre los perfiles de peso entre las dietas carnívora y omnívora puede ser atribuida a que ambos alimentos contienen proteína animal, ya sea en su forma pura o mixta, resultando en un aprovechamiento semejante de la proteína, pues, a pesar de no contener ésta en la misma proporción, su consumo permite mejorar el aprovechamiento de la proteína vegetal, como ha sido descrito en literatura acerca de las dietas omnívoras en humanos y roedores ([Clarys et al., 2014](#); [Giuberti et al., 2018](#), [Godfray et al., 2018](#), [Gordillo Lima, 2019](#)) sin tener que pasar por un periodo de adaptación fisiológico (no evaluado) como se ha observado en otras especies acuáticas ([Heikkinen et al., 2006](#)) y solo depende de una adaptación sensorial en las condiciones de cautiverio.

Por otro lado, la similitud de las medidas de longitud fue analizada en el tiempo inicial del experimento con la prueba de Kruskal-Wallis para hembras ($p = 1.0 > 0.1$) y machos ($p = 0.867 > 0.1$) entre tratamientos, comprobando que no existían diferencias significativas entre los grupos y por lo tanto los organismos experimentales comenzaron la alimentación con longitudes similares con un 90% de confianza. En la figura 13, se puede observar el cambio de la LHC promedio de las hembras respecto a los grupos experimentales, y en la cual se identifica que la dieta carnívora (\diamond) y omnívora (\square) tuvieron un constante aumento en proporciones similares. En el caso de la dieta vegetariana (Δ) se puede advertir que su LHC permaneció estable en las primeras semanas de alimentación con un ligero aumento después de la semana 5 con respecto de la LHC inicial.

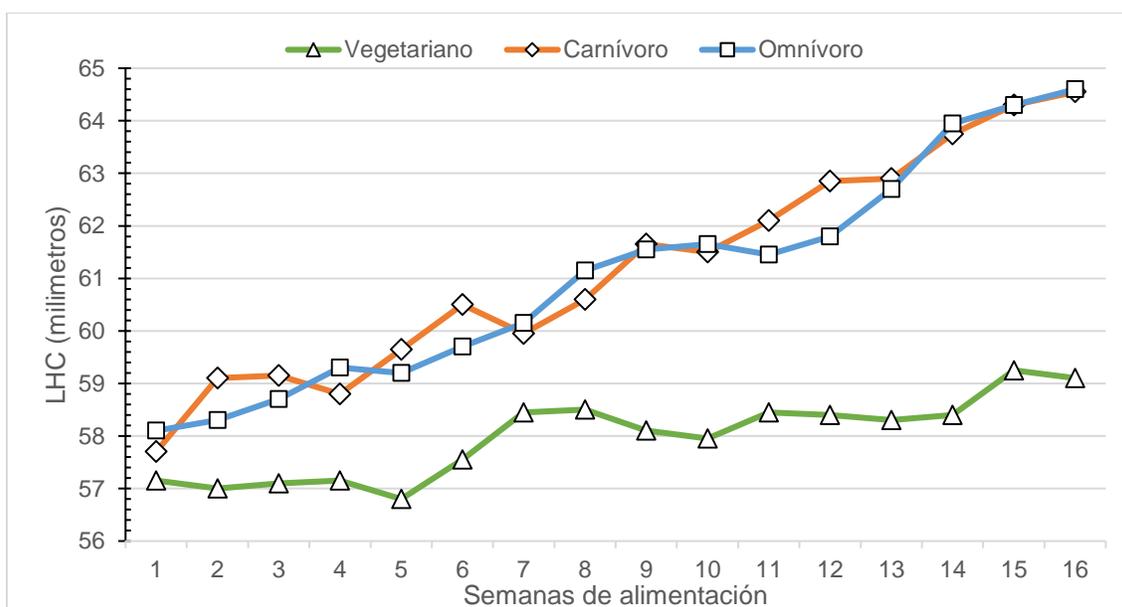


Figura 13. LHC promedio hembras juveniles

Ahora bien, en la LHC promedio de los machos (fig. 14) también se perciben tendencias de crecimiento mayores en las dietas carnívora (\diamond) y omnívora (\square), sin embargo, en comparación con las tendencias observadas en las hembras de estos mismos grupos, el aumento de LHC no es constante en la dieta omnívora. En la dieta vegetariana (Δ) se identifica un incremento de longitud regular a lo largo de todas las semanas de alimentación en comparación con las hembras de esta misma dieta y con las mesetas de crecimiento observadas en diferentes semanas de alimentación en los individuos de la dieta omnívora.

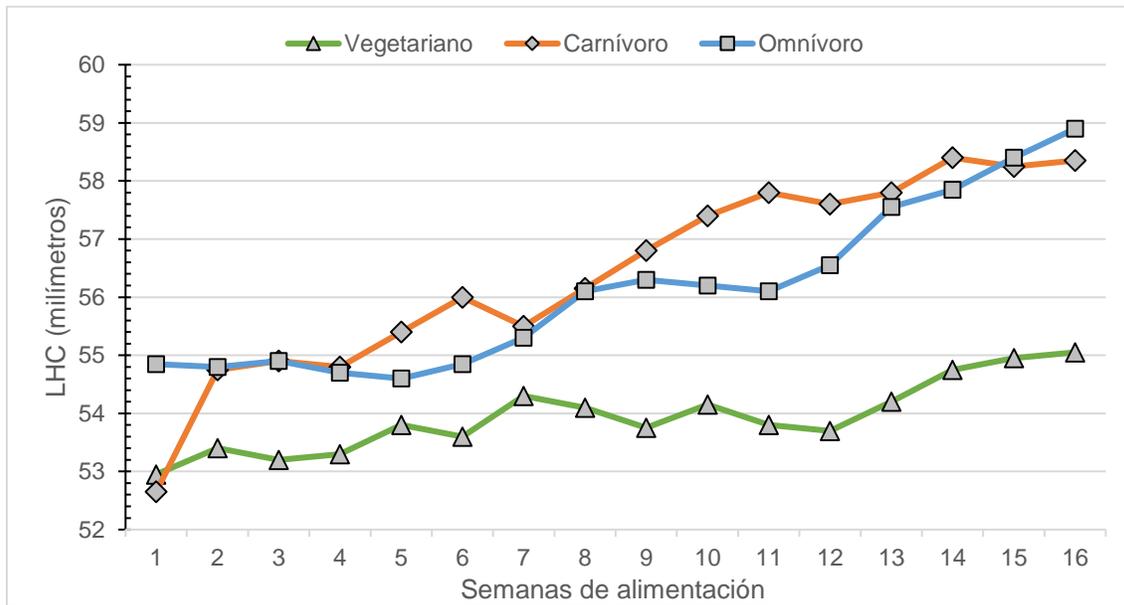


Figura 14. LHC promedio machos juveniles

La prueba Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias de LHC entre los grupos experimentales indica que no existen diferencias significativas entre las medidas de LHC entre las dietas experimentales para machos ($p = 0.368 > 0.1$) y hembras ($p = 0.368 > 0.1$) con un 90% de confianza.

En comparación con el peso, las medidas de LHC no pueden tener valores negativos, (representativos de pérdida), sin embargo, si se puede apreciar que los valores de incremento de longitud permanecen estables a pesar de encontrarse en un periodo activo de crecimiento tomando en cuenta su edad aproximada (11-12 meses en el tiempo final). Si bien, de acuerdo con las medidas morfométricas obtenidas durante el periodo de alimentación se observó que la dieta vegetariana desencadenaba una pérdida continua de peso en hembras y machos, también se pudo percatar que esta pérdida no significó un alto al crecimiento en la longitud, aunque si se vio reducido. En la literatura no se ha encontrado que exista una relación bien definida entre el peso y la longitud, sin embargo de acuerdo a lo observado durante el experimento sugiere que la velocidad de crecimiento en longitud puede estar determinada por el peso resultando en dos posibles vertientes: a) solo el tiempo de alcance de la talla final se ve modificado ante variaciones en el peso (dependientes de la dieta) o; b) hay una afección a la talla final después del término de la etapa de crecimiento activa, no obstante, como el periodo de alimentación diferencial de este estudio no contempla etapas adultas avanzadas en las que se pueda determinar la talla

máxima final de los organismos, no se puede hacer un acercamiento hacia los efectos finales que tiene la dieta con respecto al crecimiento.

Como se mencionó con anterioridad, el tamaño de la muestra para cada grupo experimental es un factor clave para probar las hipótesis, por lo que una n pequeña, como la de este estudio, reduce las posibilidades de sustento estadístico para las observaciones ya descritas, por lo que considerar la información proporcionada por las medidas y el seguimiento visual puede revelar información importante acerca de las tendencias de crecimiento en función de la dieta. En la figura 15 se advierte que las hembras representativas de los grupos carnívoro y omnívoro (A y B respectivamente) son notablemente de mayor tamaño que la hembra del grupo vegetariano (C), tomando en cuenta su longitud y su masa corporal previamente presentadas en la figura 13.



Figura 15. Organismos hembra juveniles: A) Carnívoro, B) Omnívoro, C) Vegetariano.

Para el caso de los machos (fig. 16) este cambio no es tan evidente, aunque los organismos de las dietas carnívora y omnívora (A y B respectivamente) son más grandes en comparación con los organismos vegetarianos (C). Estas diferencias no son tan marcadas puesto que los machos, al tener una longitud máxima inferior a la de las hembras y por consiguiente un ritmo de crecimiento menor, hace más difícil observar los efectos en el tiempo final, aunque es posible inferir que la diferencia encontrada en sus tallas, mayormente en el peso, está relacionada directamente con el aprovechamiento de la proteína según su fuente de obtención en la nutrición y ganancia de masa corporal y de ésta última puede depender el ritmo de crecimiento de los individuos.

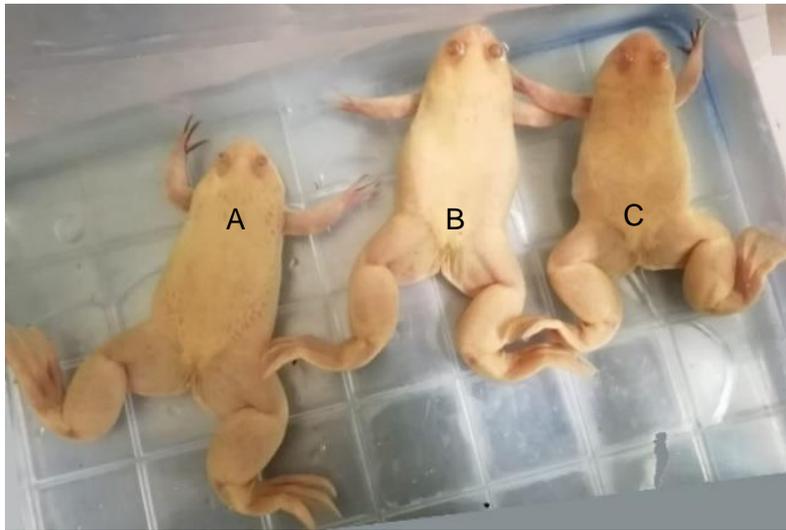


Figura 16. Individuos machos juveniles: A) Carnívoro, B) Omnívoro, C) Vegetariano.

Ahora bien, mientras que los individuos juveniles aún se encuentran en un periodo de crecimiento activo, se espera que los individuos adultos ya hayan logrado su talla máxima, por lo que no se esperaban aumentos relevantes de peso y longitud. Durante el periodo de alimentación diferencial se pudo apreciar que las dietas que contienen proteína animal en su forma pura o mixta (naranja y azul) permiten el mantenimiento relativo del peso para hembras y machos, mientras que la dieta vegetariana (verde) tiene como efecto la pérdida de peso en ambos sexos, sin embargo, este efecto se ve a mayor escala en la hembra (fig. 17).

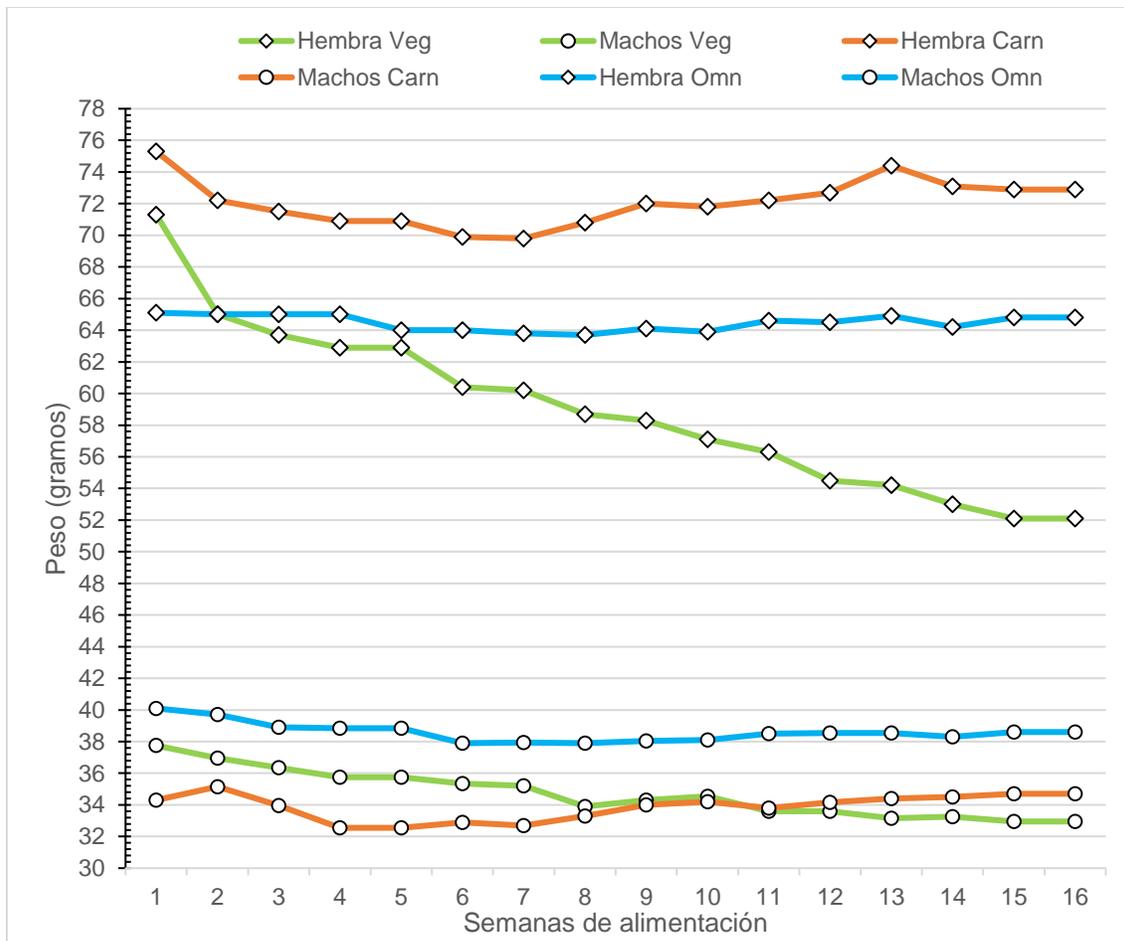


Figura 17. Peso individuos adultos

En el seguimiento de la LHC de los organismos adultos (fig. 18) se puede observar que no hay tendencia al aumento de longitud en las hembras; por otro lado, en los machos, para los tres tipos de dietas hay un aumento constante de longitud que puede indicar que, a pesar de su edad y el alcance de su madurez sexual, los organismos aún no alcanzaban su longitud máxima, sin embargo, esta no se vio influenciada por el tipo de dieta consumida como se observó en los individuos juveniles.

Como parte de una hipótesis inicial, las dietas omnívora y carnívora tendrían mayor aprovechamiento de la proteína para el aumento de peso en comparación con la dieta vegetariana, sin embargo, se observó que en esta última el aprovechamiento de la proteína más bien fue insuficiente para provocar un aumento, puesto que se registraron pérdidas de peso con respecto de los valores iniciales. Haciendo un comparativo porcentual de pesos finales entre los sexos de las distintas dietas se observa que: las hembras de las dietas omnívora y carnívora son

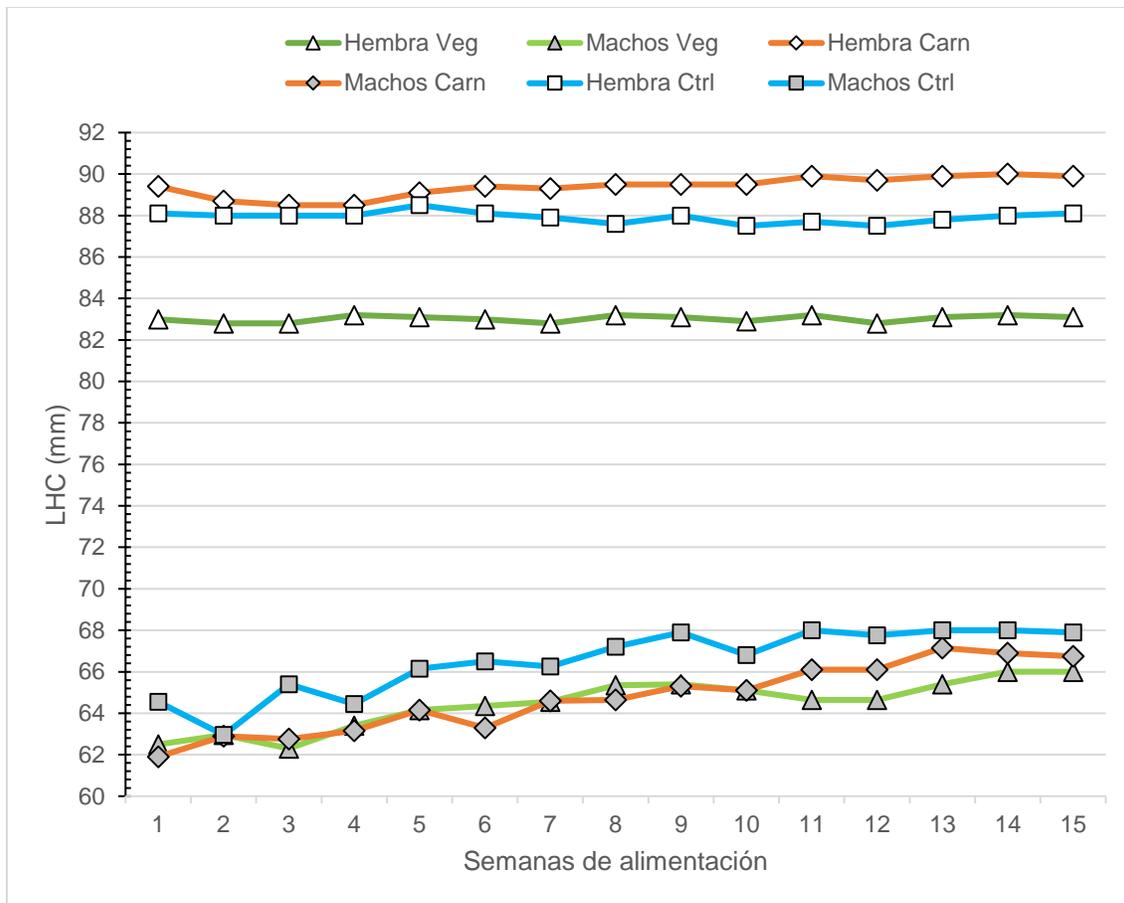


Figura 18. LHC individuos adultos

un 18-20% más grandes que los machos de estas dietas, mientras que las hembras de la dieta vegetariana son 7% más grandes que los machos vegetarianos. El porcentaje de diferencia en peso entre sexos según la dieta junto con las observaciones anteriores, puede indicar que los organismos experimentales que consumieron proteína vegetal no siguieron los patrones de crecimiento convencionales que contempla el dimorfismo sexual y la etapa de crecimiento activo determinada por su edad, lo que hace necesario analizar por qué la dieta vegetariana con proteína de soya, tiene un efecto negativo sobre el crecimiento, a pesar de que esta proteína es considerada de calidad.

La proteína de soya es de calidad, puesto que cumple satisfactoriamente con criterios como: alta digestibilidad (>90%), valores altos de PDCAAS (~1.0) y es de los pocos alimentos de origen vegetal que tiene en cantidad suficiente todos los aminoácidos esenciales para el humano (Messina, 2016). Se ha señalado que los anfibios, al igual que los humanos requieren el consumo de 10 aminoácidos esenciales en la dieta, y los cuales han demostrado ser los mismos para

ambos (ver tabla 1) ([Brennes-Soto et al., 2019](#); [Veterian Key, 2017](#)); por lo que considerando que la proteína de soya, desde la perspectiva de la nutrición humana está catalogada como de alta calidad, esta característica también puede aplicar en la nutrición de anfibios, de modo que es posible considerar, que incluso si ésta es utilizada como única fuente de proteína, es capaz de satisfacer las necesidad recomendadas, puesto que tiene la misma capacidad de aprovechamiento si es comparada con proteínas patrón ([Young, 1991](#)).

A pesar de los estándares de calidad de la proteína de soya, existen estudios que revelan que el consumo exclusivo de proteína vegetal puede resultar en una eficiencia reducida de su aprovechamiento, lo que implica que los requerimientos nutricionales de proteína en humanos sean más altos en comparación con la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) ([Craig y Mangels, 2009](#)). Aunque, durante la alimentación diferencial de los organismos *X. laevis* se observó que todos los organismos consumían la cantidad de alimento necesaria para estar satisfechos, según observaciones reportadas en la literatura, el consumo de alimento a saciedad no siempre se ve reflejado como una nutrición adecuada, dado que existen varios aspectos que pueden modificar el aprovechamiento del alimento ([Brennes-Soto et al., 2019](#); [Heikkinen et al., 2006](#)). En etapas juveniles, la mayoría de los organismos, no cuentan con el volumen estomacal completo comparado con organismos en etapas adultas o cercanas al desarrollo total pues aún se encuentran en una etapa temprana del crecimiento, por lo que es importante que el volumen alimenticio consumido por estos organismos sea capaz de aportar los nutrientes suficientes para el correcto desarrollo. Hay evidencias que muestran que los alimentos vegetales no contienen la misma densidad energética que un alimento omnívoro o carnívoro, es decir que una porción del mismo peso no brindará la misma cantidad de energía necesaria para los procesos catabólicos/anabólicos del organismo. Si bien, los alimentos pueden tener las mismas proporciones de nutrientes en su composición, esto no significa que estos sean aprovechados de la misma manera ([Craig y Mangels, 2009](#); [Heikkinen et al., 2006](#); [López Portillo et al., 2006](#); [McWilliams, 2008](#)). Dicho esto, es posible considerar que la pérdida de peso observada en los organismos vegetarianos pueda ser debida a que existe un déficit energético entre el alimento consumido y la energía necesaria para realizar las funciones del organismo, incluida la digestión del alimento.

El balance entre el consumo y el metabolismo del alimento tiene un efecto importante en el crecimiento y desarrollo de anfibios, por lo que es importante considerar adecuadamente los requerimientos nutricionales de estos. Para los anfibios, al ser (en su mayoría) carnívoros naturalmente, se contempla una necesidad de consumo de 30-60% de proteína ([McWilliams,](#)

[2008](#)), sin embargo, cambios a su régimen alimenticio pueden implicar nuevas consideraciones alimenticias. La literatura menciona que las dietas vegetarianas pueden contener cantidades elevadas de fibra (carbohidratos complejos), las cuales no solo pueden impedir la absorción de micronutrientes indispensables para el crecimiento (entre ellos el calcio y el zinc), sino además reducir la cantidad de energía metabolizable para cumplir con las funciones normales, por lo que, aunque la cantidad de nutrientes en el alimento sean similares entre el alimento, estos pueden no ser aprovechadas de la misma manera y por tanto afectar el crecimiento ([Craig y Mangels, 2009](#); [López Portillo et al., 2006](#); [Naresh et al., 2019](#)). Por otro lado, se ha observado que, en peces carnívoros, el consumo de proteína de soya como sustituto de la proteína animal debe estar limitado a un 20-30% ya que, un porcentaje mayor puede generar una reducción del crecimiento y la utilización del alimento, gracias a la presencia de anti nutrientes, como los fitatos ([Heikkinen et al., 2006](#)) e inhibidores de proteasas. Los inhibidores de proteasas son los anti nutrientes que han demostrado tener mayor influencia sobre la digestibilidad de las proteínas, ya que, al reducir su digestibilidad, estas no pueden ser aprovechadas adecuadamente. Si bien se han planeado estrategias para reducir los niveles de anti nutrientes en la soya y en la harinas (aunque se sabe que las harinas por su proceso de elaboración ya pueden tener un nivel más bajo de anti nutrientes), aun se observan disminuciones en el aprovechamiento energético de la proteína de soya ([Kumar et al., 2010](#); [Ridner et al., 2006](#); [Rizzo y Baroni, 2018](#)). Aunado a estas evidencias, se ha observado que, con modificaciones en el régimen alimenticio, existen cambios en la histología intestinal de peces (pliegues intestinales, vacuolas y microbiota) y aves resultado de un posible proceso de adaptación a la nueva dieta; no obstante, mientras el consumo de alimento no esté limitado, estos cambios no siempre implican deficiencias nutricionales que pueden esperarse, pues estas pueden ser compensadas con un aumento en el consumo de alimento ([Brenes-Soto et al., 2019](#); [Heikkinen et al., 2006](#)).

En *X. laevis* aún no se han estudiado a profundidad los efectos fisiológicos que genera un cambio en el régimen alimenticio, pero se sabe que los anfibios son capaces de mostrar flexibilidad digestiva ante un cambio de dieta, el consumo de alimento y la estacionalidad en donde se pueden observar algunos cambios en el tracto digestivo que ayudan a la actividad enzimática para evitar desencadenar los efectos de la malnutrición ([Brenes-Soto et al., 2019](#)). A pesar de los cambios que se pueden realizar para compensar en cambio en la dieta, no siempre se logran frenar los efectos adversos que un cambio de alimento puede desencadenar. Basándonos en observaciones hechas sobre peces carnívoros y algunos anfibios ([Brenes-Soto et al., 2019](#); [Heikkinen et al., 2006](#)) la respuesta al cambio de dieta en *X. laevis* en este estudio, y la compensación de nutrientes pudo verse modificada en gran medida si se variaba también la

cantidad de alimento consumido. Si bien, el aumento en la ingesta de alimento es una estrategia adecuada para una nutrición completa en los organismos, también existe otro factor que puede afectar la respuesta alimenticia: la atracción sensorial. Sabemos que, *X. laevis* es una especie carnívora después de la metamorfosis y al ser una especie acuática, ésta carece de lengua, por lo cual solo cuenta con papilas gustativas pequeñas en la cavidad bucal, además de poseer un sensible sistema de olfacción, por lo que es capaz (aunque no se sabe hasta qué punto) de responder a estímulos sensoriales del alimento, por ejemplo, a los jugos de la carne ricos en aminoácidos, disueltos en el agua ([Solís M, 2004](#)). A pesar de que no se analizó el comportamiento de los organismos como un parámetro de este estudio, se observó que el factor de atracción al alimento tuvo influencia sobre el tiempo de respuesta para la ingesta de alimento: los organismos carnívoros tenían una respuesta inmediata al suministro de alimento, incluso si éste no estaba en su campo visual; los organismos omnívoros respondían inmediatamente después de que el alimento entraba en su campo visual, mientras que los organismos del grupo vegetariano consumían el alimento tiempo después del que el alimento había sido visualizado.

La alimentación *ad libitum*, tiene el propósito de suministrar alimento en función de la saciedad por lo que la cantidad exacta de alimento consumido no era posible de cuantificar, sin embargo, se observó que la cantidad consumida por los grupos vegetarianos era menor aunque similar a la de los grupos carnívoro y omnívoro, por lo que considerando el tiempo de consumo, la atracción sensorial y la saciedad, se sugiere que, si existía una necesidad de aumento en el consumo de alimento para el mantenimiento del peso en los organismos vegetarianos, éstos no lograron una adecuada compensación de nutrientes pues no hubo un aumento en la ingesta. Ante una inevitable carencia de nutrientes en la alimentación, *X. laevis* puede responder a dos distintas fases a la inadecuada nutrición: a) la energía necesaria es tomada de la reserva de carbohidratos y lípidos (grasa visceral y cuerpos lipídicos); y b) cuando no existe reserva de energía, ésta es obtenida del catabolismo de proteínas ([Solís M, 2004](#)).

Recordemos que las proteínas no sólo cumplen una función estructural para la formación y mantenimiento de tejidos como el músculo y el hueso, sino además tienen una función energética. De acuerdo con lo ya mencionado, si la dieta vegetariana no es capaz de aportar la energía suficiente para realizar los procesos catabólicos y anabólicos normales, existe un desbalance energético que modifica el aprovechamiento de nutrientes y que puede verse reflejado con la pérdida de peso, ya sea por la disminución de grasa visceral o de masa muscular. Con estas observaciones se puede asegurar que, en los organismos de este experimento, una dieta con proteína animal dentro de los rangos establecidos por los requerimientos nutrimentales

para anfibios es capaz de suministrar la nutrición adecuada, y que durante un proceso de crecimiento es capaz de proveer los nutrientes necesarios para el aumento de tejidos para un desarrollo óptimo. Además, se percibe que no existen cambios drásticos en el proceso de crecimiento (aumento de peso y longitud) cuando la proteína animal se consume de forma pura o combinada con proteína vegetal, por lo que ambos regímenes de alimentación (carnívoro y omnívoro) pueden ser llevados a cabo sin efectos sobre el ritmo de crecimiento. Sumado a esto, es importante no dejar de considerar las ventajas de incluir proteína vegetal en la dieta, pues ésta puede ayudar a reducir complicaciones de salud generadas por una dieta completamente carnívora viéndola desde una perspectiva humana. Al observar que al combinar el origen proteico en la dieta de *X. laevis* no hay cambios evidentes en las medidas morfométricas se pueden contemplar el aumento en el uso de dietas combinadas (animal y vegetal) que permitan el correcto desarrollo, pero disminuyendo los riesgos a la salud, no sólo como ha sido observado en humanos, sino además que pueda brindar las ventajas que también ha demostrado. Por otro lado, debe considerarse que, aunque existe una gran variedad de estudios que apoyan la sustitución de la proteína animal por la vegetal en su totalidad en animales carnívoros, aun cuando la proteína es de calidad como la de la soya, los requerimientos nutricionales no siempre serán equivalentes, puesto que existen otros componentes que pueden afectar el crecimiento como lo son el perfil lipídico y los carbohidratos en el crecimiento de *X. laevis* ([Brenes-Soto et al., 2019](#)).

Muchos estudios en humanos sustentan que infantes con dietas vegetarianas durante su crecimiento tienden a ser más delgados, con menor índice de masa corporal (IMC) y de menor talla que el promedio de la población, aunque esto no implica que no se lleve a cabo un desarrollo normal pues en la etapa adulta humana estas mismas variables son similares a las de los vegetarianos “convertidos” durante la adultez, por lo que no se puede precisar que una dieta adoptada desde la infancia afecte la talla final ([Cooper et al., 2015](#); [Craig y Mangels, 2009](#)). Si bien durante la alimentación diferencial en este estudio se observan tendencias de crecimiento diferentes entre los organismos que consumen proteína animal (pura o mixta) y los que consumen proteína vegetal, los análisis estadísticos no demuestran que existan diferencias significativas entre las dietas que puedan ayudar a concluir que el origen proteico tiene influencia directa sobre las medidas morfométricas de peso y longitud, sin embargo es necesario considerar que los organismos experimentales aún se encuentran en una etapa de crecimiento activa, por lo que sería necesario evaluar estas medidas en su tamaño máximo final. A pesar de que el periodo de alimentación de este estudio no permite evaluar las medidas morfométricas para los individuos cuando estos hayan alcanzado su talla máxima, si se puede advertir que el consumo

de una dieta con proteína vegetal exclusiva disminuye el ritmo de crecimiento en los organismos experimentales, lo que puede implicar: a) aumento en el tiempo de crecimiento, o b) reducción en la talla máxima final. Ahora bien, además de sugerirse el análisis de las tallas finales bajo las dietas experimentales sugeridas, también es necesario acoplar estrategias complementarias para hacer más similar el alimento suministrado, pues el aprovechamiento no solo depende de la proporción de proteína, sino también del aporte calórico que brinda, puesto que aunque las proteínas cumplen en su mayoría con funciones estructurales para el cuerpo, estas pueden verse modificadas para cumplir con funciones más primordiales para el organismo, como para cumplir con las necesidades energéticas.

Visto ahora desde la nutrición humana, tomando en cuenta que los humanos, así como los anfibios no tenemos la fisiología necesaria para llevar a cabo una alimentación estrictamente vegetariana es necesario considerar las implicaciones a la salud que esta puede tener. Las tendencias de cambio en la alimentación llegan en su mayoría en etapas de desarrollo tardío o adultas, en la cual ya se ha logrado el desarrollo máximo determinado para cada individuo, sin embargo, como ya hemos observado si ésta es introducida en etapas más jóvenes, es posible que no provoque estragos en la salud, sin embargo, así como lo observado durante este estudio, puede implicar una reducción en el ritmo de crecimiento y una complexión corporal más baja en comparación con otras dietas. Estudios en otros modelos como los roedores, también mencionan que el seguimiento de dietas vegetarianas resulta en bajas inmunológicas ([Gordillo Lima, 2019](#)) sin embargo, la repercusión final en el desarrollo humano desgraciadamente no puede ser probada en un tiempo corto además de que, en los humanos, a diferencia de otros modelos animales, no existe una talla máxima fija, sino que esta se ve influenciada en gran medida por la genética. Si bien no se concluye definitivamente que una dieta vegetariana estricta, repercute en el crecimiento por el origen proteico de ésta, aun cuando la proteína vegetal es de calidad como en el caso de la soya, si se observa un modelo de crecimiento diferente al que se sigue normalmente bajo una dieta que contiene proteína animal ([Cooper et al., 2015](#)).

El consumo continuo de alimentos con soya en la dieta humana puede no reflejar inmediatamente los efectos que esta desencadena, sin embargo, conocer las ventajas y desventajas de su uso permite una concientización más profunda de los elementos integrativos de la dieta, ya que esta no solo afectará a la talla y composición corporal como el músculo y la grasa, sino además puede tener efectos en otras estructuras importantes, como el hueso.

Efecto de las dietas sobre densidad ósea en *X. laevis*

El fémur es el hueso largo con el hueso cortical más duro y grande de todos los huesos presente mayormente en la zona tubular alargada de gran espesor denominada diáfisis y que se ensancha a los extremos; el hueso cortical disminuye su espesor cuando comienza a aparecer el hueso esponjoso en la epífisis. En *X. laevis* los movimientos rápidos y con fuerza como los necesarios para la caza de la presa, el desplazamiento dentro del hábitat, la huida ante depredadores y otras funciones dependen directamente de las extremidades inferiores (compuestas de huesos largos) pues son las estructuras corporales que contienen la mayor proporción de masa muscular y los huesos más resistentes capaces de resistir flexiones y torsiones ([Brennes-Soto et al., 2019](#); [McWilliams, 2008](#); [Solís, 2004](#)).

Con la alimentación diferencial de los organismos *X. laevis* se observó que en las medidas morfométricas existen tendencias de crecimiento diferentes y dependientes del origen proteico de la dieta. Ahora bien, también resulta relevante identificar los efectos que el origen proteico de la dieta puede tener sobre la salud ósea, ya que, de acuerdo con la literatura, el papel que la proteína desempeña sobre el remodelado óseo es importante pues ésta brinda los aminoácidos necesarios para el desarrollo de la matriz del hueso además de intervenir en el proceso de remodelado, por ello cambios en el régimen alimenticio han demostrado tener efectos controversiales sobre la salud ósea.

La mejor manera de medir la salud del hueso es estimar la densidad ósea con técnicas radiológicas en las que la densidad del tejido está determinada por la atenuación de las radiaciones ionizantes emitidas por una fuente al atravesarlo ([Dellán et al., 2015](#)). Aunque la densitometría ósea en humano generalmente se realiza con una técnica mejorada de rayos X, la CT también ha demostrado ser una técnica que puede ser utilizada para evaluar la salud de los huesos, pues ofrece la ventaja de obtener las HU, que son valores numéricos que reflejan el amortiguamiento de los rayos X que atraviesan el tejido. El grado de atenuación, dependiente de la composición y densidad del tejido, es cuantificado por el tomógrafo y convertido a HU que pueden tomar valores desde -1,024 (valor del aire), hasta 3,071 (valor máximo de la escala abierta) y siendo 0 (cero) el valor del agua. Tejidos altamente densos y/o mineralizados como el hueso pueden tener valores ≥ 200 HU y estos aumentan en función de la densidad ([Ramírez Patiño et al., 2013](#)). Esta técnica de diagnóstico al ser poco invasiva permite dar seguimiento a organismos experimentales sin necesidad de sacrificarlos para hacer un análisis de sus elementos corporales.

Conociendo las ventajas que brinda la CT y el uso de las HU para conocer el estado de mineralización del hueso, los organismos *X. laevis* experimentales fueron sometidos a CTs para determinar la densidad ósea del hueso cortical en la región media de la diáfisis del fémur derecho de cada organismo después del periodo de alimentación diferencial a fin de conocer el efecto que el origen proteico de la dieta tiene sobre la DO. Esta región del fémur fue seleccionada como zona de análisis de HU pues es la zona con mayor densidad de hueso y en la que es posible notar una afección avanzada a la remodelación ósea reflejada como una disminución en la DO. Durante el análisis de imágenes fue importante seleccionar sólo el área periférica del fémur, a fin de únicamente tomar en cuenta el hueso cortical evitando así la cavidad medular que puede modificar las mediciones de HU's pues la densidad del tejido en conjunto suele ser más baja.

En la figura 19, se puede apreciar el proceso de análisis en el visualizador en línea de las tomografías para determinar la DO. En líneas y flechas amarillas se muestran las mediciones (distancia, longitud) que permiten identificar la(s) zona(s) de interés en el plano axial (19a) y coronal (19b) para realizar las mediciones de HU en hueso.

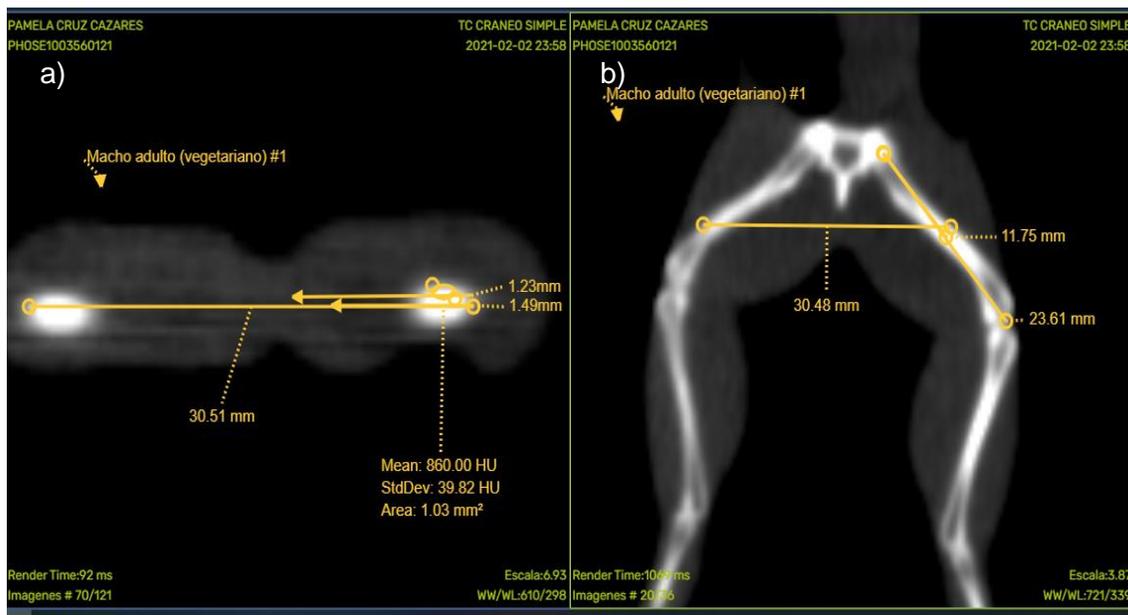


Figura 19. Ilustración de proceso de determinación de densidad ósea de fémur.

En la figura 19b puede observarse la distribución de hueso cortical (zonas blancas) y hueso esponjoso (zonas grises) en los huesos largos de las extremidades inferiores; la zona de análisis seleccionado dentro del fémur es una zona con gran proporción de hueso cortical por lo que se espera tenga valores de HU altos. Con los datos recabados, se realizó un gráfico con los rangos

de HU obtenidos y que están relacionados directamente con la densidad ósea del fémur que presentan los organismos de acuerdo con la dieta con la que fueron alimentados (fig. 20). Como puede apreciarse los grupos (machos y hembras) con dieta vegetariana son los que presentan menores valores de DO de fémur en comparación con los obtenidos para las dietas experimentales carnívora y omnívora, observaciones que coinciden con la hipótesis inicial sobre el efecto que podría tener el consumo de una dieta con proteína vegetal con respecto de la densidad ósea del hueso.

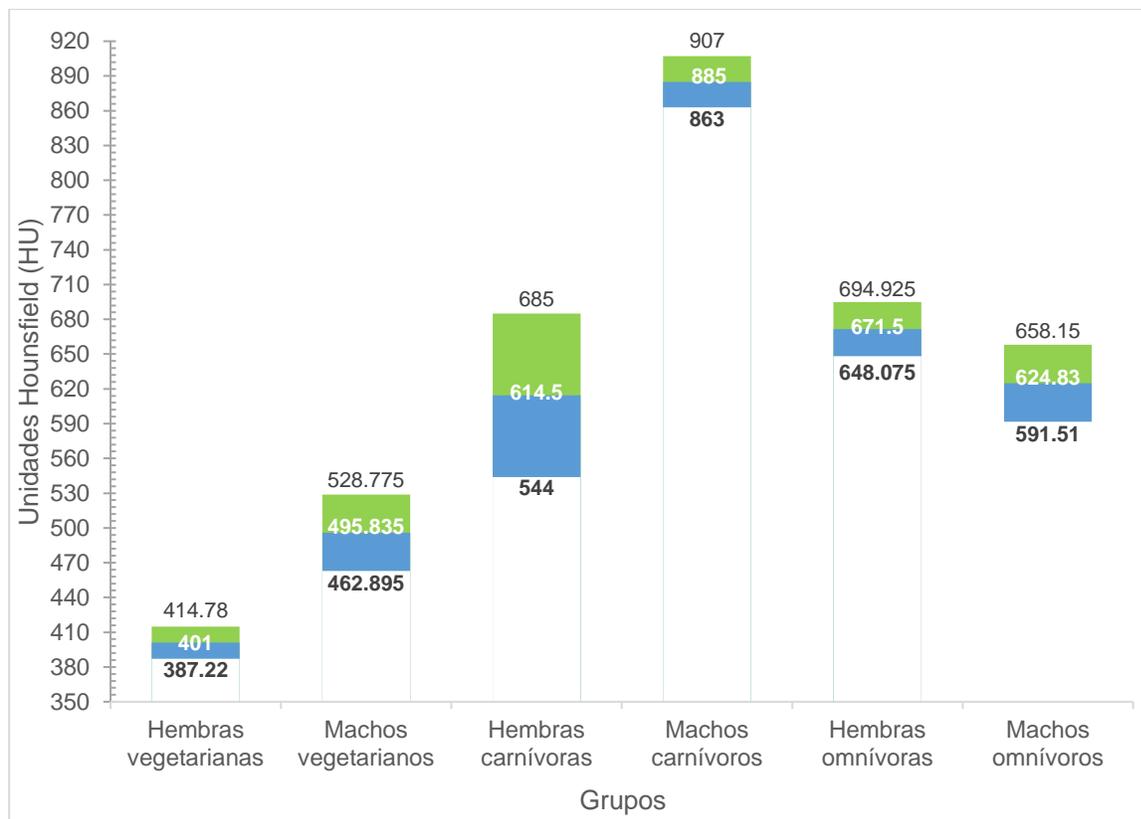


Figura 20. Densidad Ósea promedio de hueso cortical de fémur en organismos experimentales

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para la DO final de los organismos experimentales, y la cual mostró que existe diferencia significativa entre las dietas para hembras ($p = 0.082 < 0.1$) y machos ($p = 0.082 < 0.1$). Como puede observarse, los organismos bajo dieta vegetariana presentan una alta disminución sobre la DO (34-40% en hembras y 21-44% en machos) en comparación con las dietas carnívora y omnívora, lo que sugiere que esta dieta favorece la pérdida de densidad ósea. Ahora bien, los organismos con dietas que contienen proteína animal (pura o combinada) tienen valores más altos de DO, sin embargo, siguen 2 patrones de densidad diferentes: en la dieta omnívora se observa que los machos son los individuos con menor DO en

comparación con las hembras de esta misma dieta, mientras que en la dieta carnívora (al igual que en la dieta vegetariana), la DO de los machos es mayor (>20%) que la registrada en las hembras; esta última observación ya ha sido reportada en *X. laevis*, pues tomando en cuenta que los machos necesitan mayor soporte y rigidez del esqueleto útiles para actividades como la caza y la defensa. Suponiendo que las DO de los organismos carnívoros son los valores estándar para determinar el estado de salud adecuado del hueso cortical debido a su naturaleza carnívora, se observa que una dieta combinada de proteína vegetal y animal (dieta omnívora) mejora el aprovechamiento de los nutrientes para la remodelación ósea en las hembras, puesto que en esta dieta se logran rangos más pequeños de densidad en comparación con la dieta carnívora que tiene un rango más amplio y un valor promedio de HU más bajo, no obstante, en el caso de los machos de estas dos dietas, el consumo de una dieta omnívora disminuye en gran nivel la densidad (~30%), incluso provocando que no se siga el modelo de DO tradicional, en el que los machos tienen valores de DO más altos que las hembras.

En los anfibios, se identifica una condición denominada Enfermedad Metabólica del Hueso o MBD por sus siglas en inglés, en la cual se observan cambios significativos en el hueso derivado de diversas deficiencias en los nutrientes presentes en el organismo. Uno de los signos más relevantes de la MBD es la disminución de la mineralización en el hueso, que vista desde un análisis por CT disminuye las HU por una baja en la densidad de los huesos. Existe una gran cantidad de factores que pueden desencadenar la MBD, por ejemplo, radios Calcio: Fosforo inadecuados, excesos de vitamina D y deficiencias en el consumo de calcio y proteínas en la dieta, siendo estas últimas uno de los factores más comunes por los que se puede observar la desmineralización ósea. Se ha detectado una relación directa entre la complejidad corporal de los organismos y la salud del hueso: pesos inferiores a los valores considerados óptimos producen debilidad en el hueso debido a una baja en la DO resultado de la desmineralización ([Brennes-Soto et al., 2019](#); [McWilliams, 2008](#); [Orwoll et al., 1992](#); [Ramírez Patiño et al., 2013](#); [Veterian Key, 2017](#)). De acuerdo con la información ya conocida sobre la MBD, la disminución de DO observada en los organismos *X. laevis* vegetarianos puede estar directamente relacionada con las medidas morfométricas bajas, sobre todo en peso, que presentan estos, por lo que es necesario analizar el papel que tiene la dieta sobre la DO.

En la bibliografía se destaca la importancia de la proteína dietética en la formación y mantenimiento de la salud del hueso, pues es la encargada de proporcionar los aminoácidos necesarios para sostener el continuo desarrollo de la matriz del hueso (colágeno > 95%). Aunque cuando se ha observado la relación directa entre el peso y la densidad ósea, no se sabe

exactamente como es que ésta última se ve afectada por la ingesta deficiente de proteínas, pues en conjunto con las proteínas, las dietas pueden también tener deficiencias en otros nutrientes participantes en el remodelado óseo y la mineralización de la matriz ósea como el calcio, el fósforo y la vitamina D ([Craig y Mangels, 2009](#); [Orwoll et al., 1992](#)). También se ha relacionado una deficiencia de proteína de la dieta con la disminución de la concentración del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), encargado de incrementar el número y función de los osteoblastos, los cuales intervienen de forma activa en el remodelado óseo ([Fernández-Tresgures et al., 2006b](#)), sin embargo, también se ha demostrado que dietas bajas en proteína, pero con proporciones adecuadas de los demás nutrientes y el aporte calórico necesario, la DO de los huesos no se ve disminuida ([Craig y Mangels, 2009](#); [Cooper et al., 2015](#); [Orwoll et al., 1992](#)). En las tres dietas utilizadas el contenido proteico fue similar, y aun considerando un nivel de aprovechamiento proteico más bajo en la dieta vegetariana, de acuerdo con la información de literatura se puede inferir que la cantidad de proteína consumida puede no ser el factor que afecte la DO en los organismos vegetarianos, sino más bien la deficiencia o mal aprovechamiento de otros nutrientes indispensables para la salud de los huesos como el calcio.

El hueso, es una estructura en constante remodelación que actúa como reservorio natural de minerales como el calcio y fósforo y que está encargado de dar soporte al cuerpo. La resistencia de los huesos depende de un balance positivo de formación y reabsorción de matriz ósea y del nivel de mineralización de ésta. Los niveles de mineralización del hueso son susceptibles a cambios nutricionales que impacten sobre el balance de remodelación o los niveles de minerales reservados en el hueso, pues si no existen niveles adecuados de éstos últimos, el hueso es la fuente principal de obtención para que el cuerpo realice sus funciones adecuadamente ([Cooper et al., 2015](#); [Fernández-Tresgures et al., 2006a](#); [2006b](#)). Los hallazgos con respecto a las consecuencias que conlleva una dieta vegetariana en la salud indican que puede existir una disminución en la ingesta de calcio, pues muchas fuentes dietéticas de este mineral se encuentran presentes solamente en productos de origen animal. A pesar de ello, la soya, uno de los principales alimentos consumidos por los vegetarianos, es una legumbre rica en calcio, fósforo, hierro, zinc, entre otros y de la cual se pueden obtener los valores necesarios de estos minerales para el organismo, aunque también tiene una desventaja ya antes descrita: la presencia de anti nutrientes. Los fitatos, son anti-nutrientes presentes en la soya, los cuales no permiten la correcta asimilación de micronutrientes como el calcio, provocando que, aunque los niveles de ingesta de este y otros minerales sea la adecuada, una gran cantidad de estos no entre adecuadamente al organismo y sea excretado en los desechos ([Ridner et al., 2006](#); [Messina y Messina, 2010](#); [Orwoll et al., 1992](#)). Ante estas circunstancias, los niveles de

mineralización de los huesos pueden disminuir, por lo que la DO se vería afectada en organismos que presenten este déficit asociado a la dieta. Esta condición presente en la soya puede explicar por qué a pesar de que el alimento vegetariano suministrado a los organismos experimentales fue el adecuado (de acuerdo con los niveles de calcio reportados en la soya), este no es capaz de lograr mantener la DO a niveles similares con los organismos con dieta que contiene proteína animal.

Sumado a esto, se sabe que la salud de los huesos no se mantiene en todas las etapas de la vida; en mujeres en etapas postmenopáusicas el balance de remodelación de hueso se vuelve negativo, por lo que aun cuando se logra una ingesta adecuada de nutrientes, rápidamente hay disminución de DO y aumenta el riesgo de fracturas ([Cooper et al., 2015](#); [Fernández-Tresguerres et al., 2006b](#)). La soya ha demostrado ser un alimento vegetal (cuando aporta adecuadamente todos los nutrientes necesarios) capaz de retrasar la pérdida de DO en los huesos gracias a la presencia de las isoflavonas. Las isoflavonas son compuestos bio-activos muy similares a los estrógenos, que son capaces de interactuar con sus receptores. El remodelado óseo en gran medida está regulado por hormonas, una de los más importantes es el estrógeno; en etapas menopáusicas, los niveles de estas hormonas van en declive, sin embargo, se ha propuesto que el consumo de soya, rica en isoflavonas puede actuar como un sustituto de los estrógenos perdidos en este periodo, derivando así en un mantenimiento de la salud de los huesos pues la regulación del remodelado se mantiene. Es muy importante, poner especial énfasis al mantenimiento de la salud de los huesos en las mujeres, puesto que la proporción de la densidad en el esqueleto de las hembras con respecto de los machos es esperada a ser menor, pues el factor hormonal tiene gran influencia sobre el nivel de mineralización de los huesos ([Cooper et al., 2015](#); [Craig y Mangels, 2009](#); [Liu, 1997](#); [Messina, 2016](#); [Ridner et al., 2006](#)).

Dada la afinidad de las isoflavonas por los receptores de estrógeno $R\alpha$ y $R\beta$ ([Ridner et al., 2006](#)), se entiende su énfasis en su uso para la obtención de beneficios en la salud, sin embargo, aún deben de ser estudiados más a profundidad en función de los niveles necesarios para generar respuestas favorables y además los efectos secundarios (positivos o negativos) que su consumo puede desencadenar, por ejemplo, en el ámbito reproductivo. *X. laevis* es un modelo de estudio ampliamente usado por sus ventajas en la investigación en la reproducción y la biología del desarrollo; estudiar más a profundidad los efectos que tiene la soya en estos aspectos de importancia en este modelo puede mejorar los conocimientos que ya se tienen de las ventajas de la soya en la salud, pues aún se desconocen muchos aspectos de esta planta y existe además mucha controversia de su uso en dietas vegetarianas.

Tomografía Computacional y unidades Hounsfield

Otro aspecto considerado dentro del diagnóstico pero que no ha sido utilizado en *X. laevis* es la determinación de las unidades Hounsfield (HU), las cuales son una representación proporcional del grado de atenuación de rayos X provenientes de una Tomografía Computarizada (CT) en un tejido. En la reconstrucción de la imagen se asigna a cada píxel una HU para mostrar la imagen que representa la densidad del tejido, esta última dependiendo de la anatomía y composición del tejido analizado ([White y Pharoah, 2009](#)). El establecimiento de las unidades de Hounsfield es muy recurrente en estudios humanos, generalmente en aplicaciones biomédicas de diagnóstico, pero no ha sido explorada o explotada su aplicación con modelos biológicos y su uso para investigaciones científicas. El uso de esta técnica es de gran importancia ya que representa una alternativa de diagnóstico no invasiva para distintas condiciones ([Dellán et al., 2015](#)) y determinar las HU puede dar ventajas para estudios *in vivo* que necesitan el seguimiento de los organismos experimentales.

Como uno de los objetivos del proyecto es establecer las HU de cada órgano en *X. laevis*, un macho y una hembra adultos fueron transportados al LACCPRIM, anestesiados y sacrificados por los métodos humanos anteriormente descritos. El escaneo de la hembra y el macho en el mamógrafo (fig. 21) permite distinguir algunos de los órganos importantes en su ubicación anatómica original como los huesos, pulmones y la masa oocítica en la hembra. Una vez extraídos los órganos, éstos se suspendieron dentro de una columna de agua utilizando un hilo y se escanearon por CT. Los órganos fueron analizados utilizando el software RadiAnt DICOM Viewer para establecer un promedio de las HU utilizando la elipse como herramienta de delimitación de área. En la figura 22 puede observarse el proceso de análisis de las reconstrucciones en los tres planos o ejes de visualización (axial, coronal y sagital) abarcando con la herramienta elipse (en verde) la región de interés (ROI) amplia, que abarca la mayoría del órgano, y la ROI reducida (figura no mostrada) que abarca un área arbitraria de 5mm² en el área medular de cada órgano. Los datos obtenidos del análisis de las reconstrucciones para cada órgano fueron analizados por estadística descriptiva y se obtuvieron los rangos de valor para las HU en los órganos, a fin de mostrar los valores que pueden tomar en función de su densidad y composición. Los rangos de valores HU para cada órgano en macho y hembra se encuentran en la tabla 7 y se comparan sus valores obtenidos con los valores ya determinados para el humano.

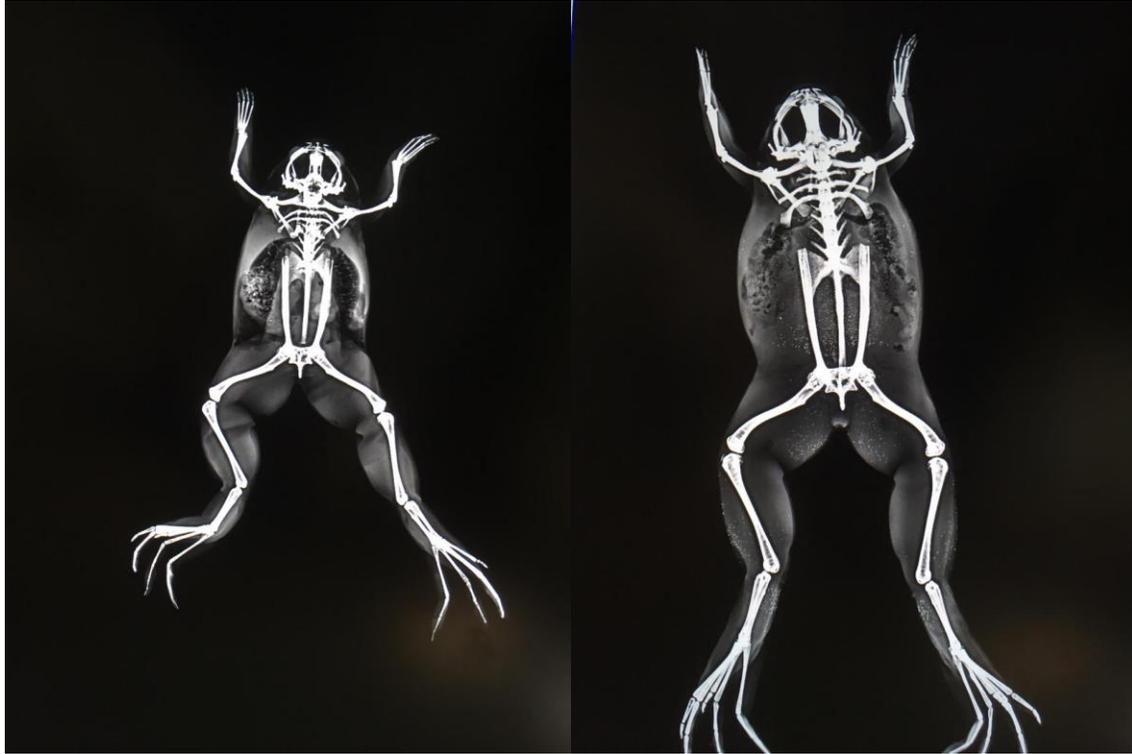


Figura 21. Macho (a) y hembra (b) adultos *X. laevis* escaneados por mamógrafo

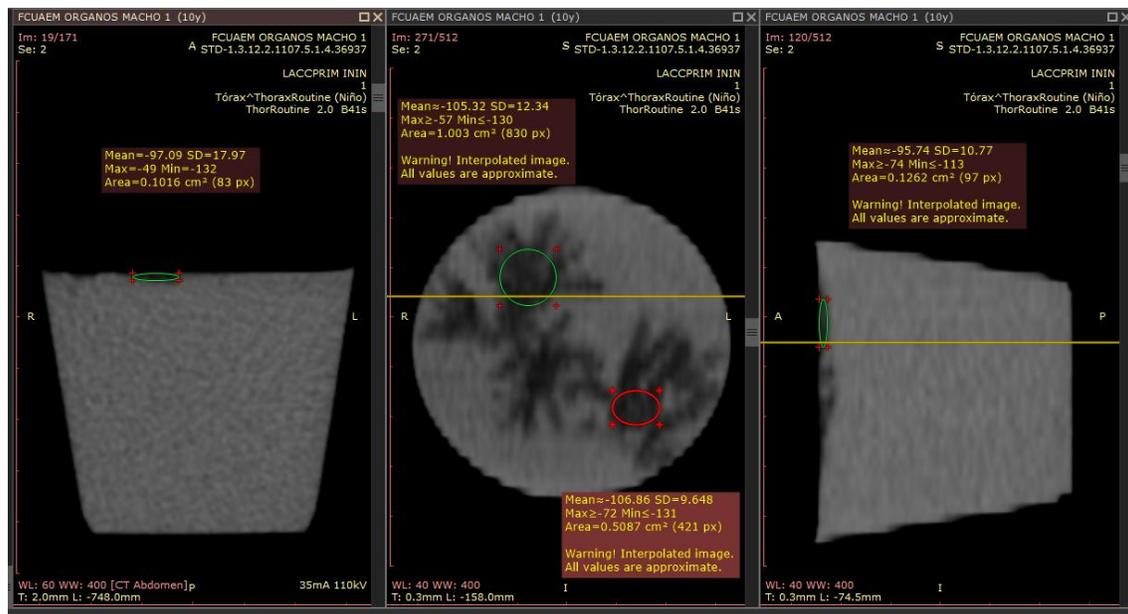


Figura 22. Proceso de análisis de HU de órganos de *X. laevis* (grasa visceral). Planos: a) Axial, b) Coronal, c) Sagital

Tabla 7. Unidades Hounsfield promedio de órganos de *X. laevis* y humano.

Órgano	HU macho	HU hembra	HU humano
Muslo	25 a 50	40 a 60	35 a 50
Intestino	40 a 65	40 a 65	40 a 80
Fémur	170 a 300	410 a 790	250 a 1000
Hígado	40 a 70	50 a 70	40 a 80
Testículo/Masa oocítica	-5 a 85	30 a 55	-
Tendón	-20 a 90	30 a 50	66 a 102
Corazón	5 a 80	40 a 60	10 a 60
Musculo abdominal	5 a 80	20 a 40	-
Grasa	-110 a -80	-60 a -40	-30 a -66
Piel	-65 a -20	15 a 25	-30 a 60
Estomago	25 a 60	5 a 60	40 a 80
Pulmones	-530 a -285	-240 a - 60	-200 a -830
Vesícula Biliar	-	25 a 40	-
Oviducto	-	10 a 35	-
Vejiga	-	10 a 20	-
Músculo	-	25 a 40	10 a 40

Aunque, en un comparativo simple de HUs entre humano y *X. laevis* los valores son similares, estos aun no pueden ser tomados como definitivos, dada la profundidad de este estudio, el cual solo tomó en cuenta un individuo adulto de cada sexo y se hizo la determinación de HU's fuera de su estructura anatómica natural por lo cual los valores, a pesar de que clínicamente son aceptables, es necesario considerar otros aspectos para establecer estos rangos de valores como adecuados y comparables: a) incrementar el número de organismos analizados, b) analizar los órganos dentro y fuera de su estructura anatómica original y c) utilización de otras herramientas que mejoren la calidad del análisis, por ejemplo, el uso de contrastes.

Determinar las HU para otros modelos biológicos distintos al ser humano tales como *X. laevis* puede ser de gran ayuda para la investigación científica ya que permitiría analizar y diagnosticar las condiciones de salud o enfermedad de estos organismos en estudio, sin necesidad de sacrificarlos, permitiendo dar seguimiento a estos, además de que el uso de modelos de estudio para evaluar condiciones médicas que se pueden presentar en el humano permite realizar investigaciones en periodos de tiempo más cortos y permitiendo la identificaciones de otros aspectos que en algunas ocasiones pueden ser difíciles de observar en humanos.

Capítulo VI: Conclusiones y Perspectivas

CONCLUSIONES

- El origen proteico de la dieta demostró establecer tendencias de crecimiento diferentes en los organismos experimentales, siendo la proteína de soya la proteína con menor aprovechamiento para el aumento de peso.
- Las dietas omnívora y carnívora demuestran que son capaces de mantener el aumento de peso esperado en una etapa de crecimiento activa, sin importar que la dieta omnívora contiene una proporción de proteína vegetal.
- La dieta con proteína de soya demostró generar una disminución en el ritmo de crecimiento en longitud en los organismos experimentales; las dietas carnívora y omnívora mantienen el crecimiento esperado.
- El origen proteico en la dieta no es el único factor del que depende el peso y el ritmo de crecimiento, sino también debe ser considerado el aporte calórico de la dieta.
- La soya es un alimento vegetariano que a pesar de cumplir con un estatus de calidad de la proteína y la presencia alta de otros nutrientes como el calcio y componentes bio-activos (isoflavonas), su aprovechamiento en organismos no vegetarianos se ve disminuido por su nivel de anti nutrientes.
- *X. laevis* es un modelo capaz de adaptarse a cambios en su régimen alimenticio, sin embargo, ante la falta de información sobre metabolismo y adaptaciones al alimento, debe de sugerirse un plan de alimentación más organizado tomando en cuenta sus condiciones fisiológicas.
- Se comprobó la relación de peso y complexión corporal del organismo con la densidad ósea, pero no se demostró que el origen proteico sea el responsable de los cambios observados en la salud del hueso.
- Las unidades Hounsfield de *X. laevis* determinadas para macho y hembra son similares a las que se conocen en el humano.

PERSPECTIVAS

- Para un análisis más completo del efecto del origen proteico de la dieta, se sugiere analizar además del contenido fisicoquímico de los nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas, etc.), también la proporción de aminoácidos presentes en las dietas.
- Contemplar a la grasa visceral y las proporciones masa corporal/grasa visceral como factores morfométricos a evaluar en los efectos de la dieta.
- Contemplar al calcio como variable de estudio y analizar los cambios en sus niveles en diferentes tiempos (por ejemplo: inicial, intermedio y final).
- Para un análisis más completo, el estudio puede contemplar el uso de organismos en la etapa inmediata después de la metamorfosis y continuar por periodos largos hasta que estos logren su talla máxima e incluso la reproducción.
- Realizar un estudio similar en rangos amplios de tiempo puede ayudar a calcular la eficiencia proteica para el crecimiento en otros modelos de estudio (no roedores).
- Proponer un sistema de modelado que permita conocer la densidad ósea correcta a partir de la determinación de HU's.
- Evaluar los niveles de isoflavonas en distintas etapas de la alimentación diferencial para conocer si existen efectos reproductivos con el consumo de proteína de soya.

Referencias

- Abu-Daya, A., Khokha, M. K. y Zimmerman, L. B. (2012). The Hitchhiker's Guide to *Xenopus* Genetics. *Genesis*, 50(3): 164-175. doi:10.1002/dvg.22007
- Ayala Vargas, C. (2018). Importancia Nutricional de la Carne. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 5(Especial): 54-61. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182018000300008&lng=es&tlng=pt
- Becerril, D. (4 de agosto de 2018). ¿Es México el país de América Latina con mayor número de vegetarianos y veganos? *Russia Today (RT)* – Actualidad. <https://actualidad.rt.com/actualidad/283920-mexico-vegetarianos-veganos-cifras>
- Bewick, A. J., Anderson, D. W. y Evans, B. J. (2010). Evolution of the closely related sex-related genes *dm-w* and *dmrt1* in african clawed frogs (*Xenopus*). *Evolution*, 65(3): 698-712. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01163.x
- Bodwell, C. E., Satterlee L. D. y Hackler L.R. (1980). Protein digestibility of the same protein preparations by humans and rat assays and by in vitro enzymic digestion methods. *Journal of Nutrition*. 33:677-686.
- Bourges-Rodríguez, H. (2008). Los alimentos, la dieta y la alimentación en E. Casanueva, *et al.* (Ed.). *Nutriología Médica* (3ra Ed., pp. 597-662). Editorial Médica Panamericana.
- Brennes-Soto, A., Dierenfeld, E. S., Bosch, G., Hendriks, W. H. y Janssens, G. P. J. (2019). Gaining insights in the nutritional metabolism of amphibians: analyzing body nutrient profiles of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *PeerJ*, 7:e7365. DOI 10.7717/peerj.7365
- Brignardello G, J., Heredia P, L., Ocharán S, MP. y Durán A, S. (2013). Conocimientos alimentarios de vegetarianos y veganos chilenos. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(2), 129-134. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000200006>
- Casanueva, E. y Bourges-Rodríguez, H. (2008). Los nutrimentos en E. Casanueva, *et al.* (Ed.). *Nutriología Médica* (3ra Ed., pp. 571-595). Editorial Médica Panamericana.
- Calañas-Continente, A., Barrera Martín, A., Herrera Martínez, A. D. y Rebollo Román, Á. (2017). Bases científicas de la alimentación saludable en D.A. de Luis Román, *et al.* (Ed.). *Dietoterapia, nutrición clínica y metabolismo* (3ra Ed., pp. 3-33). Aula Médica.

- Chito Trujillo, D. M., Ortega Bonilla, R. A., Ahumada Mamián, A. F. y Rosero López, B. (2017). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) versus soja (*Glycine max* [L.] Merr.) en La nutrición humana: revision sobre las características agroecológicas, de composición y tecnológicas. *Revista española de nutrición humana y dietética*. 21(2); 184-198.
- Clarys, P., Deliens, T., Huybrechts, I., Deriemaeker, P., Vanaelst, B., De Keyzer, W., Hebbelinck, M., y Mullie P. (2014). Comparison of Nutritional Quality of the Vegan, Vegetarian, Semi-Vegetarian, Pesco-Vegetarian and Omnivorous Diet. *Nutrients*, 6, 1318-1332. <https://doi.org/10.3390/nu6031318>
- Cooper, C., Dawson-Hughes, B., Gordon, C. M. y Rizzoli, R. (2015). Alimentación sana, huesos sanos. International Osteoporosis Foundation. <http://www.worldosteoporosisday.org/sites/default/files/WOD15-Report-ES.pdf>
- Craig, W. J. y Mangels, A. R. (2009). Position of the American Dietetic Association: Vegetarian Diets. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(7), 1266-1282. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.05.027>
- Crayon, J. C. (2005). Family Pipidae. *Xenopus laevis* (Daudin, 1802). En M. Lanoo (Ed.), *Amphibian Declines* (pp, 522-526). University of California Press.
- Dellán, A., Villarroel Dorego, M., y Hernández-Andara, A. (2015). Aplicación de las unidades Hounsfield en tomografía computarizada como herramienta diagnóstica de las lesiones intra-óseas del complejo maxilo-mandibular: estudio clínico de diagnóstico. *Revista Odontológica Universitaria Cid. São Paulo*. 27(2): 100-111.
- Elurbe, D. M., Paranjpe, S. S., Georgiou, G., van Kruijsbergen, I., Bogdanovic, O., Gibeaux, R., Heald, R., Lister, R., Huynen, M. A., van Heeringen, S. J. y Veenstra, G. J. C. (2017). Regulatory remodeling in the allo-tetraploid frog *Xenopus laevis*. *Genome Biology*, 18, 198. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1335-7>
- Esquivel Hernández, R. I., Martínez Correa. S. M. y Martínez Correa, J. I. (2005). *Nutrición y salud*, 2da Ed. El Manual Moderno.
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., del Canto Pingarrón, M., Blanco Jerez, L. (2006a). *Bases Fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo*. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11: E47-51.

- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., del Canto Pingarrón, M., Blanco Jerez, L. (2006b). Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Internet), 11 (2): 7151-151
- Fischler, C. (1995). *El (h)omnívoro. El fusto, la cocina y el cuerpo*. Editorial Anagrama
- Fontana Gallego, L., Sáez Lara, M. J., Santisteban Bailón, R. y Gil Hernández, A. (2006). Compuestos nitrogenados de interés en nutrición clínica. *Nutrición Hospitalaria* 21 (Supl. 2): 15-29.
- Garvey, N. (2000). "*Xenopus laevis*" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed June 15, 2020 at https://animaldiversity.org/accounts/Xenopus_laevis/
- Giuberti, G., Morlacchini, M., Crippa, L., Capraro, J., Pagani, B., Gallo, A. y Rossi, F. (2018). Effect of omnivorous and vegan diets with different protein and carbohydrate content on growth and metabolism of growing rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 69(5): 574-583. doi: 10.1080/09637486.2017.1394986.
- Godfray, H. C. J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J. W., Key, T. J., Lorimer, J., Pierrehumbert, R. T., Scarborough, P., Springmann, M. y Jebb, S.A. (2018). Meat consumption, health, and the environment. *Science*, 361(6399):eaam5324. DOI: 10.1126/science.aam5324
- Gordillo Lima, W. (2019). *Dieta Omnívora y Vegetariana, sobre Parámetros Hematológicos en Rattus norvegicus Variedad Sprague Dawley*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/8993>
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D. y von Wright, A. (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261(1): 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.012>
- Hopwood, C. J., Bleidorn, W., Schwaba, T., y Chen, S. (2020). Health, environmental, and animal rights motives for vegetarian eating. *PLOS ONE*, 15(4), e0230609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230609>
- International Vegetarian Union (s.f.). *Definitions*. Consultado el 17/10/2020 en: <https://ivu.org/definitions.html>
- Key, T. J., Appleby, P. N. y Rosell, M. S. (2006). Health effects of vegetarian and vegan diets. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(1), 35-41. <https://doi.org/10.1079/PNS2005481>

- Krebs, J. E., Goldstein, E. S., Kilpatrick, S. T. (2014). Lewin's GENES XI (11 ed). Jones & Bartlett Learning
- Kumar, V., Rani, A. y Chauhan G. S. (2010). Nutritional Value of Soybean en G. Singh, *The Soybean: Botany, production and uses* (pp. 375-403). CAB International.
- Leitzmann, C. (2005). Vegetarian Diets: What Are the Advantages? en I. Elmadfa, *Diet Diversification and Health Promotion*. (Forum of Nutrition, vol 57, pp. 147-156). Editorial. <https://doi.org/10.1159/000083787>
- Liu K. (1997) Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In: Soybeans. Springer, Boston, MA
- López Portillo, L., García Campos, M., Montijo Barrios, E., Cervantes Bustamante, R., Mata Rivera, N. y Ramírez Mayans, J. (2006). La dieta vegetariana en los niños. Ventajas, desventajas y recomendaciones dietéticas. *Acta Pediátrica de México*, 27(4), 205-212.
- Lutz, C. A. y Przytulski, K. R. (2011). Nutrición y dietoterapia, 5ta Ed. McGrawHill
- Mateos, A. y Rodríguez, J. (2010). La dieta que nos hizo humanos. Junta de Castilla y León. Fundación siglo para las Artes de Castilla y León. Recuperado de: <http://www.edu.xunta.gal/centros/ieschapela/system/files/la%20dieta%20que%20nos%20hizo%20humanos.pdf>
- Mawaribuchi, S., Takahashi, S., Wada, M., Uno, Y., Matsuda, Y., Kondo, M., Fukui, A., Takamatsu, N., Taira, M. y Ito, M. (2017). Sex chromosome differentiation and the W- and Z- specific loci in *Xenopus laevis*. *Development biology*, 426, 393-400. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.015>
- McCoid, M. J. y Fritts, T. H. (1989) Growth and fatbody cycles in feral populations of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Pipidae), in California with comments on reproduction. *The Southwestern Naturalist*, 34(4): 499-505. DOI:10.2307/3671508
- McWilliams, D. A. (2008). Nutrition Recommendations for some Captive Amphibian Species (Anura and Caudata). The Canadian Association of Zoos and Aquariums Nutrition Advisory and Research Group (GARN-NARG). <http://www.amphibianark.org/wp-content/uploads/2018/07/Amphibian-nutrition-report-CAZA-2008.pdf>
- Mendoza, A. M., García-Ramírez, J. C. y Cárdenas-Henao, H. (2012a). Blood puncture as a nondestructive sampling tool to obtain DNA in frogs: comparison of protocols and survival

- analysis. *Molecular Ecology Resources*, 12, 470-475. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03107.x
- Mendoza, A. M., García-Ramírez, J. C. y Cárdenas-Henao, H. (2012b). Epithelial mucosa as an alternative tissue for DNA extraction in amphibians. *Conservation Genetics Resources*, 4, 1097-1099. DOI: 10.1007/s12686-012-9714-6
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 70 (suppl) 439S-450S.
- Messina, M (2016). Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature. *Nutrients*. 8, 754. DOI:10.3390/nu8120754
- Messina M. y Messina V. (2010). The Role of Soy in Vegetarian Diets. *Nutrients*. 2; 855-888. DOI:10.3390/nu2080855
- Millard, N. y Stephenson, T. A. (1940). The Vascular Anatomy of *Xenopus laevis* (Daudin). *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 28(5): 387-439. doi:10.1080/00359194009520022
- Naresh, S., Ong, MK., Thiagarajah, K., Jehan Muttiah, NBS., Kunasundari, B. y Shi Lye, H. (2019). Engineered Soybean-based beverages and their impact on human health. In: *Non-alcoholic beverages*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00011-6>
- Navarrete-Rodríguez, EM., Del Río-Navarro, BE., García-Aranda, JA., Medeiros, M., Enciso Peláez, S., García Hernández, HR. y Pozo Beltrán, CF. (2015). Implicaciones nutricionales de las dietas de eliminación. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 72(2), 112-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhmx.2015.04.002>
- The Nielsen Company. (16 de septiembre de 2016). *Nielsen*. ¿Qué hay en nuestra comida y en nuestra mente? Ingredientes y tendencias de comida fuera de casa alrededor del mundo. URL: <https://www.nielsen.com/mx/es/insights/report/2016/que-hay-en-nuestra-comida-y-en-nuestra-mente/>
- OECD. (2015). *Test No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264242340-en>
- Ogita, Y., Mawaribuchi, S., Nakasako, K., Tamura, K., Matsuda, M., Katsumura, T., Oota, H., Watanabe, G., Yoneda, S., Takamatsu, N. e Ito, M. (2020). Parallel Evolution of Two

- dmrt1-Derived Genes, dmy and dm-W, for Vertebrate Sex Determination. *iScience*, 23(1), 100757. <https://doi.org/10.1016/j.isci>.
- Ortega Anta, R.M. y Requejo Marcos, A.M. (2015). *Nutriguía. Manual de nutrición clínica*, 2da Ed. Editorial Médica Panamericana.
- Orwoll, E., Ware, M., Stribrska, L., Bikle, D., Sanchez, T., Andon, M. y Li, H (1992). Effects of dietary protein deficiency on mineral metabolism and bone mineral density. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56(2), 314–319. doi:10.1093/ajcn/56.2.314
- Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO). (4 de marzo de 2019). *Aplica Profeco Estudio de Calidad a marcas de atún envasado*. Gobierno de México. Recuperado el 20 de mayo de 2020 de <https://www.gob.mx/profeco/prensa/aplica-profeco-estudio-de-calidad-a-marcas-de-atun-ensado>
- Ramírez Patiño, J. F., Isaza, J. A., Mariaka, I. y Velez Zea, J. A. (2013). Unidades Hounsfield como instrumento para la evaluación de la desmineralización ósea producida por el uso de exoprótesis. *Revista Facultad e Ingeniería Universidad de Antioquia*. 66; 159-167.
- Reed, B. (2005). *Guidance on the housing and care of the african clawed frog Xenopus laevis*. RSPCA. Sussex, UK.
- Ridner, E., Gaón, D., Gamberale, M. C. y Salinas, R. (2006). *Soja: propiedades nutricionales y su impacto en la salud*. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Nutrición.
- Rizzo, G. y Baroni, L. (2018). Soy, Soy foods and their role in vegetarian diets. *Nutrients*. 10(43); 1-51. DOI:10.3390/nu10010043
- Roco, A. S., Olmstead, A. W., Degitz, S. J., Amano, T., Zimmerman, L. B. y Bullejos, M. (2015) Coexistence of Y, W and Z sex chromosomes in *Xenopus tropicalis*. *PNAS*, E4752-E4761.
- Rojas Allende, D., Figueras Díaz, F., Durán Agüero, S. (2017). Ventajas y desventajas nutricionales de ser vegano o vegetariano. *Revista Chilena de Nutrición*, 44(3). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182017000300218>
- Roth, R. A. (2007). *Nutrición y dietoterapia*, 9a Ed. McGrawHill.
- Ruby, MB. (2012). Vegetarianism. A blossoming field of study. *Appetite*, 58(1), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.09.019>
- Salas-Salvadó, J., Bonada I Sanjaume, A., Trallero Casañas, R., Saló i Solà, M.E. y Burgos Peláez, R. (2014). *Nutrición y dietética clínica* (3ra Ed.). EISevier Masson.

- Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S. J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J. B., Simakov, O., Putnam, N., ... Rokhsar, D. S. (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538, 336-343. DOI:10.1038/nature19840
- Sive, H., Grainger, R., y R. Harland. (2010). Early development of *Xenopus laevis*: A laboratory manual. CSH Press. New York, USA. 338pp
- Solís M, R. (2004). Antecedentes sobre la biología de *Xenopus laevis*. En Solís Muñoz, R., Lobos Villalobos, G. e Iriarte Walton, A. (Eds.), Antecedentes sobre la biología de *Xenopus laevis* y su introducción en Chile (pp. 21-36). Universidad de Chile / Servicio Agrícola y Ganadero
- Stahler, C. (s.f.). The Vegetarin Resource Group. How many people are vegan? How many eat vegan when eating out? Asks the vegetarian resource group. https://www.vrg.org/nutshell/Polls/2019_adults_veg.htm
- Statista Research Department. (17 de agosto de 2020). *Statista*. Cuota de la población mundial por tipo de dieta 2018. URL: <https://es.statista.com/estadisticas/947443/cuota-de-la-poblacion-mundial-por-tipo-de-dieta/>
- Syama Dayal, J., Ponniah, AG., y Ambasankar, K. (2012). "Shrimp as Health Food". E-Publication Series. 15; 1-11. <http://www.ciba.res.in/Books/ciba0595.pdf>
- Syama Dayal, J., Ponniah, A. G., Imran Khan, H., Madhu Babu, E. P., Ambasankar, K., y Kumarguru Vasagam, K. P. (2013). Shrimps – a nutritional perspective. *Curent Science*, 104 (11): 1487-1491. <http://www.jstor.org/stable/24092471>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2 (2); 70-78.
- Téllez Villagómez, M.E. (2014). *Nutrición Clínica (2da Ed.) El Manual Moderno*.
- Thompson, J.L., Manore, M.M. y Vaughan, L.A. (2008). *Nutrición*. Pearson Educación.
- Vázquez, G., Castro, T., Hernández, A., Castro, J. y De Lara, R. (2013). Comparación del efecto anestésico del aceite de clavo, solución salina y solución coloidal en juveniles de *Chirostoma jordani* (Woolman, 1894). *Archivos de Medicina Veterinaria* 45, 59-66.
- Vega Franco, L. e Iñarritu Pérez, M.C. (2010) *Fundamentos de nutrición y dietética*. (1ª Ed.). Pearson Educación de México.

- Vegan Police (2016) Primer censo vegano en México 2016 (Blog no disponible). Consultado el 16 de Octubre de 2020 en: <https://www.scribd.com/document/357877990/Censo-Vegano-Mexico-2016ok>
- The Vegetarian Resource Group (VRG). (30 de Agosto de 2000). Humans are Omnivores. Adapted from a talk by John McArdle, Ph.D. Consultado el día/mes/año de: <https://www.vrg.org/nutshell/omni.htm>
- Veloso, A., Soto, E., Correa, C., Bachmann, P., Torres, M. y Méndez, M. (2004). Primeros antecedentes cromosómicos y moleculares del anuro *Xenopus laevis* introducido en Chile. En R. Solís Muñoz, G. Lobos Villalobos y A. Iriarte Walton (Eds.), Antecedentes sobre la biología de *Xenopus laevis* y su introducción en Chile (pp. 9-20) Universidad de Chile.
- Vértice. (2010). Nutrición y dietética. Vértice
- Veterian Key. Fastest Veterinary Medicine Insight Engine. (8 de enero de 2017). Reptile and Amphibian Nutrition. <https://veteriankey.com/reptile-and-amphibian-nutrition/>
- Walker, P., Rhubart-Berg, P., McKenzie, S., Kelling, K. y Lawrence RS. (2005). Public health implications of meat production and consumption. Public Health Nutrition. 8(4); 348-356. DOI: 10.1079/PHN2005727
- White, S.C., y Pharoah, M.J., (2009). Oral Radiology: Principles and Interpretation, 6th Ed. St. Louis, Missouri.
- Yoshimoto, S., Ikeda, N., Izutsu, Y., Shiba, T., Takamatsu, N. y Ito, M. (2010). Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. Development, 137, 2519-2526. doi:10.1242/dev.048751
- Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. y Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. PNAS. 105(7); 2469-2474. doi/10.1073/pnas.0712244105
- Young, V.R. (1991). Soy protein in relation to human protein and aminoacid nutrition. Journal of American Dietetic Association. 91:828-835.

Anexo 1. Resultados BLAST

Query: None Query ID: lc1| Query_37369 Length: 21
>Xenopus laevis DNA. BAC clone: XLB1-344G18, complete sequence
Sequence ID: AP013026.1 Length: 81273
Range 1: 75377 to 75397

Score:42.1 bits(21), Expect:0.17,
Identities:21/21(100%), Gaps:0/21(0%), Strand: Plus/Minus

```
Query 1      CCACACCCAGCTCATGTAAAG 21
            |||
Sbjct 75397  CCACACCCAGCTCATGTAAAG 75377
```

Figura 23. DM-W (Fwd)

Query: None Query ID: lc1|Query_505851 Length: 20
>Xenopus laevis DNA. BAC clone: XLB1-344G18, complete sequence
Sequence ID: AP013026.1 Length: 81273
Range 1: 75138 to 75157

Score:40.1 bits(20), Expect:0.63,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1      GGGCAGAGTCACATATACTG 20
            |||
Sbjct 75138  GGGCAGAGTCACATATACTG 75157
```

Figura 24. DM-W (Rev)

Query: None Query ID: lc1|Query_35093 Length: 21
>Xenopus laevis DNA, BAC clone: XLB1-061P14, strain: J, complete sequence
Sequence ID: AP014668.1 Length: 81455
Range 1: 41304 to 41324

Score:42.1 bits(21), Expect:0.17,
Identities:21/21(100%), Gaps:0/21(0%), Strand: Plus/Minus

```
Query 1      CACTTGACAGGGTTGCATTTTC 21
            |||
Sbjct 41324  CACTTGACAGGGTTGCATTTTC 41304
```

>Xenopus laevis DNA. BAC clone: XLB1-344G18, complete sequence
Sequence ID: AP013026.1 Length: 81273
Range 1: 4659 to 4679

Score:42.1 bits(21), Expect:0.17,
Identities:21/21(100%), Gaps:0/21(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1      CACTTGACAGGGTTGCATTTTC 21
            |||
Sbjct 4659  CACTTGACAGGGTTGCATTTTC 4679
```

Figura 25. W specific 1 (Fwd)

Query: None Query ID: lc1|Query_32769 Length: 20

>Xenopus laevis DNA, BAC clone: XLB1-061P14, strain: J, complete sequence
Sequence ID: AP014668.1 Length: 81455
Range 1: 41071 to 41090

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1      ATGCAGTTGTCCTGTGATC 20
             |||
Sbjct 41071 ATGCAGTTGTCCTGTGATC 41090
```

>Xenopus laevis DNA. BAC clone: XLB1-344G18, complete sequence
Sequence ID: AP013026.1 Length: 81273
Range 1: 4893 to 4912

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Minus

```
Query 1      ATGCAGTTGTCCTGTGATC 20
             |||
Sbjct 4912 ATGCAGTTGTCCTGTGATC 4893
```

Figura 26. *W specific 1 (Rev)*

Query: None Query ID: lc1|Query_35751 Length: 22

>Xenopus laevis DNA, BAC clone: XLB1-218F05, strain: J, complete sequence
Sequence ID: AP014673.1 Length: 119567
Range 1: 115422 to 115443

Score:44.1 bits(22), Expect:0.043,
Identities:22/22(100%), Gaps:0/22(0%), Strand: Plus/Minus

```
Query 1      AAAACCATGACCTCCCGGATAC 22
             |||
Sbjct 115443 AAAACCATGACCTCCCGGATAC 115422
```

Figura 27. *W specific 3 (Fwd)*

Query: None Query ID: lc1|Query_3857 Length: 21

>Xenopus laevis DNA, BAC clone: XLB1-218F05, strain: J, complete sequence
Sequence ID: AP014673.1 Length: 119567
Range 1: 115128 to 115148

Score:42.1 bits(21), Expect:0.17,
Identities:21/21(100%), Gaps:0/21(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1      TAGGGAGGGGTTGGAGGTTC 21
             |||
Sbjct 115128 TAGGGAGGGGTTGGAGGTTC 115148
```

Figura 28. *W specific 3 (Rev)*

Query: None Query ID: lc1|Query_60737 Length: 20

>PREDICTED: *Xenopus tropicalis* doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (dmrt1), mRNA
Sequence ID: XM_031890717.1 Length: 2540
Range 1: 1063 to 1082

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1 AACAGGAGCCCAATTCTGAG 20
      |||
Sbjct 1063 AACAGGAGCCCAATTCTGAG 1082
```

>PREDICTED: *Xenopus laevis* doublesex and mab-3 related transcription factor 1 L homeolog (dmrt1.L), transcript variant X1, mRNA
Sequence ID: XM_018250680.1 Length: 2259
Range 1: 1154 to 1173

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

>*Xenopus laevis* DNA. BAC clone: XLB1-234B17, complete sequence
Sequence ID: AP013016.1 Length: 12260
Range 1: 3187 to 3206

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

Figura 29. DMRT1 (Fwd)

Query: None Query ID: lc1|Query_56455 Length: 20

>*Xenopus borealis* doublesex- and mab-3-related transcription factor 1B (dmrt1.L) mRNA
Sequence ID: MK907575.1 Length: 2167
Range 1: 1332 to 1351

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Minus

```
Query 1 AACTGCTTGACCTCTAATGC 20
      |||
Sbjct 1351 AACTGCTTGACCTCTAATGC 1332
```

>PREDICTED: *Xenopus laevis* doublesex and mab-3 related transcription factor 1 L
Sequence ID: XM_018250680.1 Length: 2259
Range 1: 1338 to 1357

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Minus

>*Xenopus laevis* DNA. BAC clone: XLB1-234B17, complete sequence
Sequence ID: AP013016.1 Length: 12260
Range 1: 3371 to 3390

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Minus

Figura 30. DMRT1 (Rev)

Query: None Query ID: lc1|Query_50795 Length: 20

>Streptomyces venezuelae strain ATCC 21782 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP029190.1 Length: 7525322
Range 1: 7322711 to 7322730

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1      AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  20
              |||
Sbjct 7322711 AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  7322730
```

>PREDICTED: Xenopus laevis uncharacterized LOC108705497 (LOC108705497), ncRNA
Sequence ID: XR_001933792.1 Length: 690
Range 1: 357 to 376

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Minus

```
Query 1      AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  20
              |||
Sbjct 376    AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  357
```

>PREDICTED: Hyalella azteca very low-density lipoprotein receptor-like
(LOC108680555), mRNA
Sequence ID: XM_018169410.1 Length: 4622
Range 1: 1318 to 1337

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1      AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  20
              |||
Sbjct 1318   AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  1337
```

>Xenopus laevis DNA, fosmid clone: XLFIC-012019, strain: J, complete sequence
Sequence ID: AP014677.1 Length: 35069
Range 1: 357 to 376

Strand: Plus/Plus

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%)

```
Query 1      AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  20
              |||
Sbjct 376    AGTCGAACCAGTCCCGCCAG  357
```

Range 2: 1359 to 1373

Score:30.2 bits(15), Expect:640,
Identities:15/15(100%), Gaps:0/15(0%),
Strand: Plus/Plus

```
Query 6      AACCAGTCCCGCCAG  20
              |||
Sbjct 1359   AACCAGTCCCGCCAG  1373
```

Figura 31. Z specific 1 (Fwd)

Query: None Query ID: lcl|Query_14279 Length: 20

>PREDICTED: Xenopus laevis uncharacterized LOC108705497 (LOC108705497), ncRNA
Sequence ID: XR_001933792.1 Length: 690
Range 1: 6 to 25

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 1 CCTCGATCAAACACATCTCG 20
      |||
Sbjct 6 CCTCGATCAAACACATCTCG 25
```

>Xenopus laevis DNA, fosmid clone: XLFIC-012019, strain: J, complete sequence
Sequence ID: AP014677.1 Length: 35069
Range 1: 6 to 25

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

>Xenopus laevis DNA, BAC clone: XLB1-137C07, strain: J, complete sequence
Sequence ID: AP014671.1 Length: 119170
Range 1: 35948 to 35967

Score:40.1 bits(20), Expect:0.66,
Identities:20/20(100%), Gaps:0/20(0%), Strand: Plus/Plus

Figura 32. Z specific 1 (Rev)

Query: None Query ID: lcl|Query_50191 Length: 20

>Providencia rettgeri strain YPR31 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP053896.1 Length: 4605722
Range 1: 704162 to 704180

Score:38.2 bits(19), Expect:2.6,
Identities:19/19(100%), Gaps:0/19(0%), Strand: Plus/Minus

```
Query 2      GTTGCACTACCATTCTTC 20
      |||
Sbjct 704180 GTTGCACTACCATTCTTC 704162
```

Figura 33. Z specific 2 (Fwd)

Query: None Query ID: lcl|Query_26541 Length: 20

>PREDICTED: Alligator mississippiensis tripartite motif-containing protein 15-like
Sequence ID: XM_019499332.1 Length: 1955
Range 1: 684 to 702

Score:38.2 bits(19), Expect:2.6,
Identities:19/19(100%), Gaps:0/19(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 2 AAAGTGCCAGCAGGGAGCC 20
      |||
Sbjct 684 AAAGTGCCAGCAGGGAGCC 702
```

Figura 34. Z specific 2 (Rev)

Anexo 2. PCRs virtuales para determinar el tamaño del amplicón

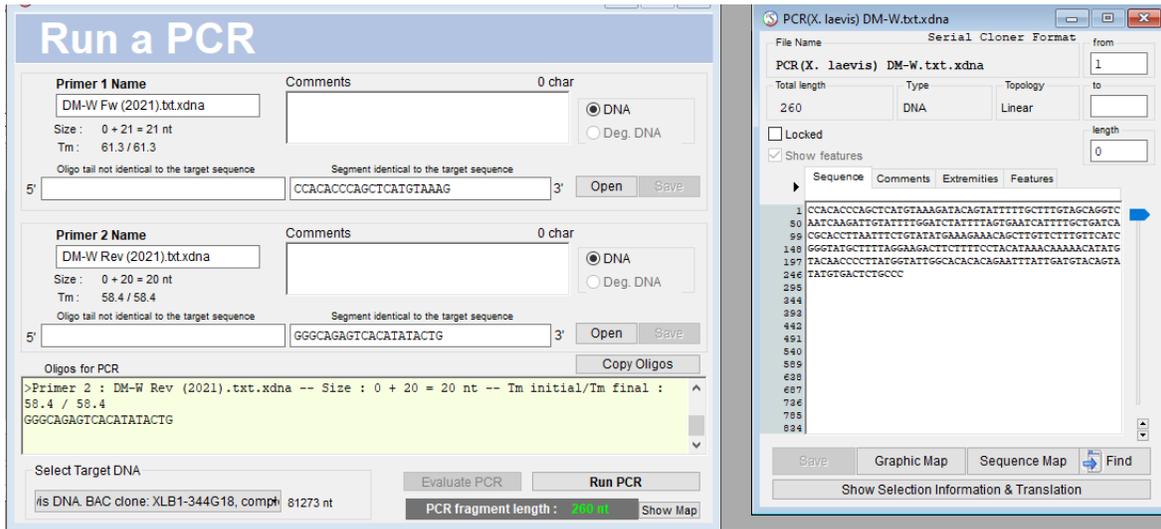


Figura 35. PCR de DM-W

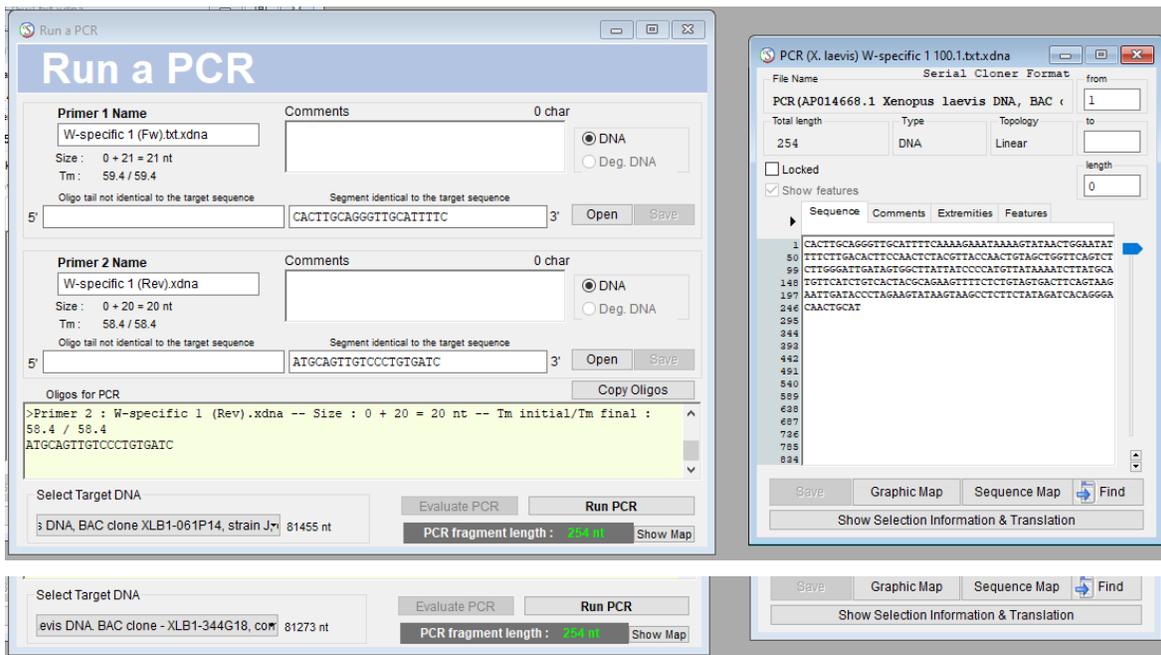


Figura 36. PCR de W-specific 1

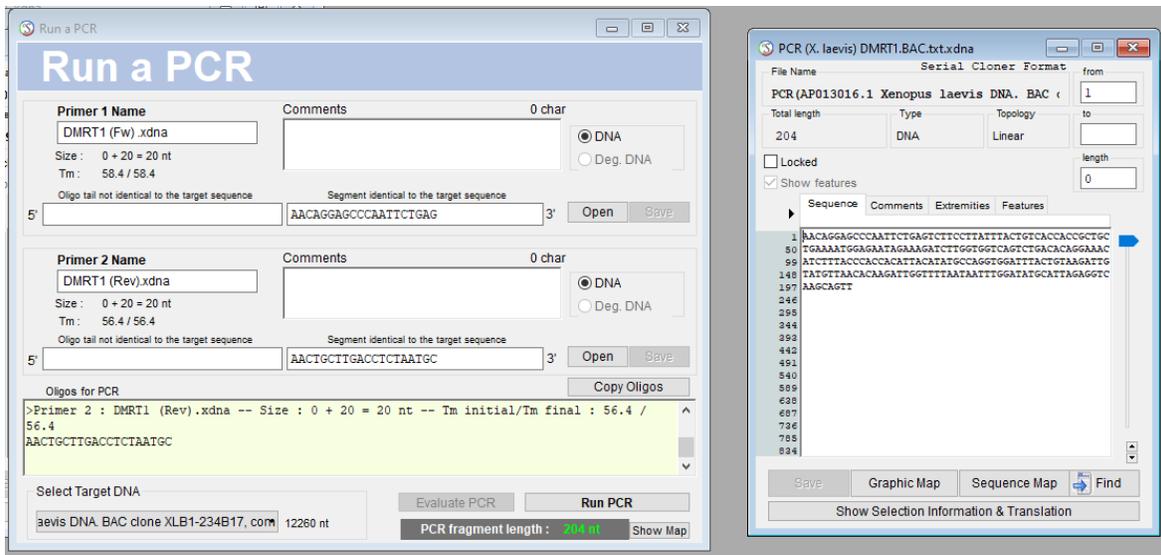


Figura 39. PCR de DMRT1 (DNA)

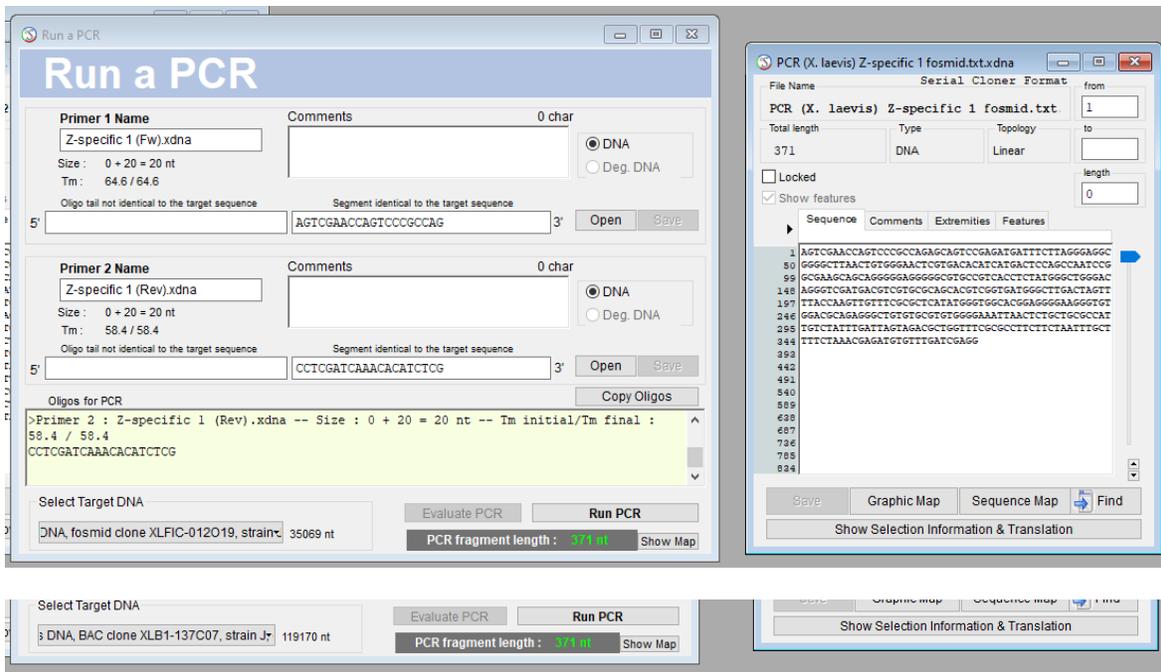


Figura 40. PCR de Z-specific 1