

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

Revisión sistemática para la elaboración de un manual de laboratorio sobre la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*)

Estefany Carolina Rubio Hernández

Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, 18 de mayo de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Revisión sistemática para la elaboración de un manual de laboratorio sobre la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*)

Estefany Carolina Rubio Hernández

Nombre del profesor, Título académico : Rommel Lenin Vinueza DMVZ, M.Sc

Quito, 18 de mayo del 2022

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Estefany Carolina Rubio Hernández

Código: 00202074

Cédula de identidad: 1750029108

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2022

ACLARACION PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El estudio de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) es fundamental en la investigación, debido a los grandes aportes que ha brindado a la medicina en los últimos años: estudios sobre enfermedades del sistema nervioso, cardiovascular, sistema urinario, entre otros. El propósito de este estudio fue realizar un análisis sistemático de artículos científicos, guías y libros. Se recopiló información comprendida entre los años 2005 a 2021 en diferentes repositorios académicos: *Research Gate*, *Scielo*, *PubMed*, *Google Scholar*, *ScienceDirect* y *Xenbase*. En el estudio se abordaron temas como: historia de la especie, bienestar animal, biología de la especie (etología, fisiología, anatomía), manejo y cuidado (alojamiento, temperatura, cuarentena, transporte, selección de la especie) y manejo experimental (manejo del dolor, eutanasia, destino final, anestesia, enriquecimiento ambiental). Utilizando criterios de exclusión e inclusión, se sistematizaron 29 fuentes bibliográficas, en su mayoría artículos, libros y guías de manejo. Se dividió la información en 4 capítulos: Introducción y Bienestar Animal, Biología de la Especie, Condiciones de Manejo y Cuidado, Manejo Experimental. Como resultado, la recopilación de información si permitió la elaboración de un manual de manejo, aunque hay temas que se recomienda profundizar más en futuros estudios como: analgesia, escalas de dolor, destino final y humedad.

Palabras clave: rana, bienestar, artículos, biología, investigación, manejo, laboratorio, protocolo.

ABSTRACT

The study of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) is fundamental in research, due to the great contributions it has made to medicine in recent years: studies on diseases of the nervous system, cardiovascular system, urinary system, among others. The purpose of this study was to perform a systematic analysis of scientific articles, guides and books. Information was collected from 2005 to 2021 in different academic repositories: Research Gate, Scielo, PubMed, Google Scholar, ScienceDirect and Xenbase. The study addressed topics such as: species history, animal welfare, species biology (ethology, physiology, anatomy), handling and care (housing, temperature, quarantine, transport, species selection) and experimental management (pain management, euthanasia, final destination, anesthesia, environmental enrichment). Using exclusion and inclusion criteria, 29 bibliographic sources were systematized, mostly articles, books and management guides. The information was divided into 4 chapters: Introduction and Animal Welfare, Species Biology, Management and Care Conditions, Experimental Management. As a result, the compilation of information did allow the elaboration of a management manual, although there are topics that should be studied in greater depth in future studies, such as: analgesia, pain scales, destination and humidity.

Key words: frog, welfare, articles, biology, research, handling, laboratory, protocol.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>INTRODUCCIÓN</i>	9
<i>DESARROLLO DEL ESTUDIO</i>	11
Metodología del Estudio.....	11
Búsqueda de Literatura.....	11
Criterios de Elegibilidad.....	11
Recopilación y Presentación de Datos.....	12
Manejo de Fuentes Bibliográficas.....	12
<i>RESULTADOS</i>	13
Tablas y gráficos de Resultados.....	13
Capítulos del Manual de Manejo.....	14
<i>DISCUSIÓN</i>	19
Capítulo 1: Introducción y Normas de Bioética.....	20
Capítulo 2: Biología de la Especie.....	20
Capítulo 3: Condiciones de Manejo y Cuidado.....	21
Capítulo 4: Manejo Experimental.....	22
<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	23
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	24
<i>ANEXO A: MANUAL DE MANEJO DE LA RANA DE UÑAS AFRICANA EN CONDICIONES DE LABORATORIO</i>	28
Capítulo 1: Introducción y Bienestar Animal.....	28
Capítulo 2. Biología de la Especie.....	29
Anatomía.....	29
Fisiología.....	31
Etología.....	33
Capítulo 3. Condiciones de Manejo y Cuidado.....	33
Selección de especie.....	33
Bioseguridad.....	34
Alojamiento.....	35
Nutrición.....	39
Capítulo 4. Manejo experimental.....	40
Manejo.....	40
Cirugía.....	40
Enriquecimiento ambiental.....	41
Analgesia.....	42
Anestesia.....	42
Eutanasia.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fuentes bibliográficas utilizadas en los capítulos "Introducción y Biología de la Especie"	16
Tabla 2: Fuentes bibliográficas utilizadas en el capítulo "Condiciones de manejo/cuidado, y Manejo experimental"	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fuentes bibliográficas en revisión sistemática.....	13
Figura 2: Curva de información en base a años.....	14
Figura 3: Número de referencias por capítulo	15

INTRODUCCIÓN

La rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) es un anfibio nativo de África, en el siglo XX se comenzó a exportar esta especie a otros continentes con el objetivo de ser usada en pruebas de laboratorio; hoy en día, se la considera una especie invasora (Contreras-López, 2020). Estos anfibios poseen características importantes que los distinguen de los demás, tales como: pulmones desarrollados, sistema auditivo avanzado, capacidad de camuflarse, en vida libre son naturalmente nocturnos y por otro lado, poseen glándulas mucosas secretoras de una capa babosa protectora con propiedades tanto antibacteriales como antifúngicas (McNamara et al., 2018).

A lo largo de los años su papel en la investigación ha evolucionado. Antes, la investigación era limitada debido a la falta de investigación de su genoma y por ende, las ventajas que representa como un modelo de estudio de laboratorio (Tandon et al., 2017). El empleo de esta especie se destacó en el siglo XX, siendo usados para diagnosticar gestación en humanos, posteriormente para estudiar el desarrollo celular y molecular, la seguridad de sustancias toxicológicas y en los últimos años enfermedades hereditarias y adquiridas de seres humanos (Schmitt et al., 2014).

Hoy en día, se conocen múltiples ventajas en cuanto al uso de esta especie en el ámbito experimental, en parte, debido al descubrimiento de su genoma completo en el 2016; por lo que se han podido realizar estudios importantes sobre el sistema inmunitario, genética, sistema nervioso, sistema cardiovascular, sistema urinario, sistema musculoesquelético, salud mental, entre otros (Nenni et al., 2019).

El uso de animales en laboratorios ha sido objeto de varias reglamentaciones para garantizar el bienestar animal y la bioseguridad del personal mediante requerimientos esenciales, como: protocolos de transporte, adquisición, alojamiento, condiciones ambientales, nutrición y atención veterinaria. Con el objetivo de garantizar el bienestar animal es fundamental realizar

un protocolo específico para cada especie; por lo que, conocer su anatomía, fisiología y etología es fundamental para poder cumplir con estos parámetros (Martínez et al., 2015).

En este trabajo la pregunta de investigación fue: ¿La bibliografía disponible permite la compilación de información para estructurar un manual aplicable de *Xenopus laevis* como ejemplo de modelo experimental? Mientras que la hipótesis propuesta fue: la bibliografía disponible permite establecer pautas o criterios para realizar un manual aplicable de *Xenopus laevis* en condiciones de experimentación.

Para responder la pregunta de investigación se realizó un análisis dirigido a investigadores, alumnos, médicos veterinarios, biólogos, biotecnólogos y todas las personas que pertenecen a la comunidad científica con el fin de incentivar a seguir investigando temas con información limitada y necesaria para garantizar el bienestar animal.

El objetivo principal de la investigación fue recopilar y sistematizar la información disponible para la elaboración de un manual de manejo de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) en condiciones de experimentación mediante la selección y análisis de la información arrojada de la revisión sistemática.

DESARROLLO DEL ESTUDIO

Metodología del Estudio.

Se realizó una revisión sistemática de información obtenido de libros, manuales y artículos científicos sobre el uso de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) en condiciones de laboratorio.

Búsqueda de Literatura.

Se revisó bibliografía comprendida en un determinado período de tiempo, en un rango de 2022 a 2012, en caso de ser necesario obtener más bibliografía se optará por tomar información desde 2005. Se obtendrá información de buscadores como *Research Gate*, *Scielo*, *PubMed*, *Google Scholar*, *ScienceDirect* y *Xenbase*. *Xenbase* es una base de datos del modelo de laboratorio *Xenopus laevis*; en la cual hay actualizaciones constantes sobre la secuenciación del genoma, protocolos experimentales, entre otra información de interés (Nenni et al., 2019). Se utilizaron palabras clave tanto en inglés como en español: *Xenopus laevis*, *manual*, *laboratory*, *investigation*, *housing*, *husbandry*, *biomedical*, *enrichment*, *nutrition*, *frog*, *welfare*, *anatomy*.

Criterios de Elegibilidad.

La revisión sistemática se sometió a un proceso de exclusión e inclusión. Los criterios de inclusión establecidos fueron: literatura confiable de 2005 a 2022, información actualizada que tome en cuenta un adecuado manejo en laboratorio y bienestar animal, publicaciones en revistas de alto impacto, guías de manejo de ranas, manuales para garantizar el bienestar animal de animales en laboratorio y bioseguridad del personal. Por otro lado, los criterios de exclusión establecidos son: falta de información actualizada en cuanto a bienestar animal, biología y manejo experimental de la especie.

Recopilación y Presentación de Datos.

Los gráficos se realizaron mediante matrices de datos en Excel, los cuales fueron tabulados en base a la información obtenida en la revisión sistemática. La cual, fue desglosada en cuadros realizados en Word que detallan: nombre del artículo/guía/libro, autor(es) y año.

Manejo de Fuentes Bibliográficas.

Las referencias bibliográficas se organizaron mediante el gestor bibliográfico *Zotero* en formato APA, 7ma edición.

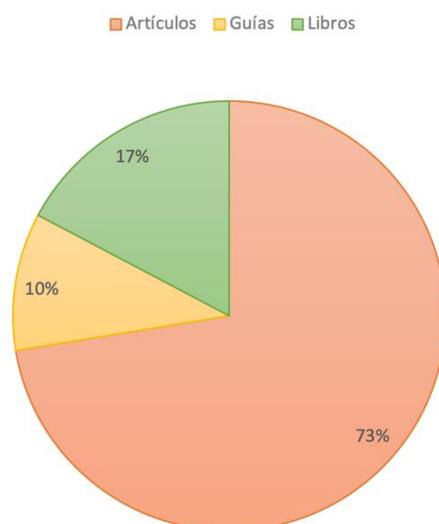
RESULTADOS

La búsqueda de fuentes bibliográficas en motores de búsqueda académica y científica resultó en un total de 45 documentos, los cuales se sometieron a un proceso de selección por criterios de exclusión e inclusión, los parámetros de exclusión fueron: falta de información actualizada en cuanto a bienestar animal, biología y manejo experimental de la especie. Por lo que, se clasificó, analizó y sistematizó un total de 29 fuentes literarias para la elaboración del manual ubicado en anexos.

Tablas y gráficos de Resultados.

Se clasificó, analizó y sistematizó un total de 29 fuentes literarias, entre ellas artículos, guías y libros. De los cuales la mayoría, como indica la figura 1, son artículos (73%), seguido por libros (17%) y guías (10%).

Figura 1: Fuentes bibliográficas en revisión sistemática



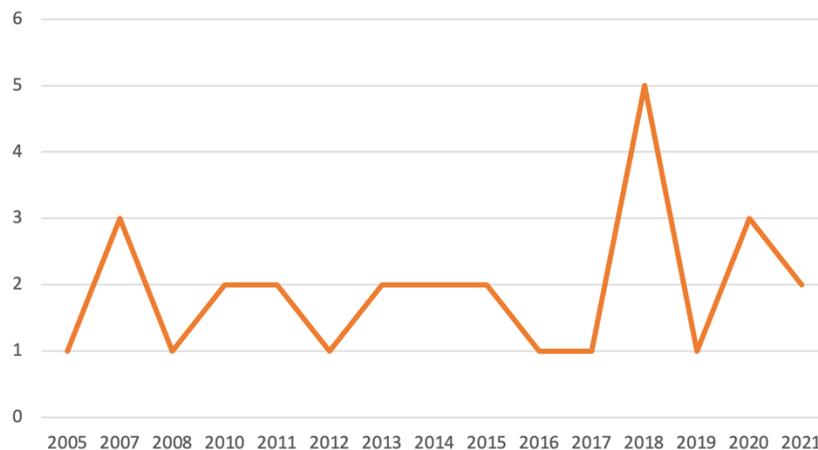
Nota: Se determinó que los artículos son la fuente bibliográfica más empleada, seguido por guías y libros.

Capítulos del Manual de Manejo

Para la realización del manual, se establecieron 4 capítulos: Introducción y Bienestar Animal, Biología de la Especie, Condiciones de Manejo y Cuidado y Manejo Experimental de la Especie. Los cuales, fueron seleccionados meticulosamente utilizando como referencias índices de guías y libros de manejo.

La bibliografía empleada para la elaboración del manual tuvo un crecimiento exponencial en el año 2018 como se puede observar en la figura 2, debido a la secuenciación completa de su genoma en el año 2016. Este hallazgo permitió la elaboración de parámetros y protocolos específicos para la rana de uñas africanas (*Xenopus laevis*).

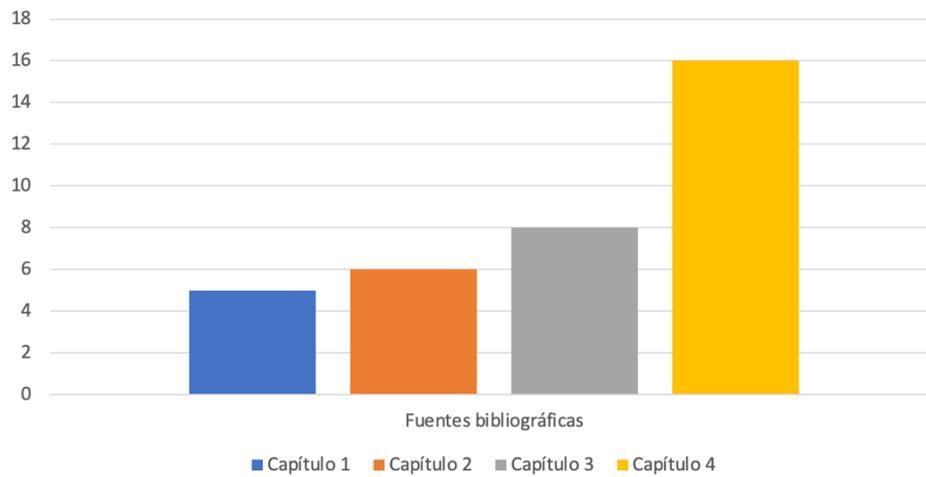
Figura 2: Curva de información sobre el uso de *Xenopus laevis* en condiciones de laboratorio



Descripción: Curva de información que demostró que después de la secuenciación completa de su genoma en el año 2016, se realizaron más estudios con este espécimen, especialmente en el año 2018 y 2020.

En todos los capítulos se utilizaron al menos 5 fuentes literarias. Siendo el capítulo con menos fuentes utilizadas “Introducción” debido a que es el capítulo más corto, seguido por “Biología de la Especie” y “Condiciones de Manejo y Cuidado”, mientras que el capítulo con más fuentes fue el capítulo de “Manejo Experimental”; como se puede observar en la figura 3.

Figura 3: *Número de referencias por capítulo*



Descripción: Número de referencias bibliográficas utilizadas en cada capítulo, donde el capítulo “Manejo Experimental” utiliza la mayor cantidad de fuentes literarias. De las cuales la mayoría son desde el año 2016.

En la tabla 1 se detalla el nombre de artículo/guía/libro, autor y año de los capítulos “Introducción y Bienestar Animal” y “Biología de la especie”. En la tabla 2 se detalla el nombre de artículo/guía/libro, autor y año de los capítulos “Condiciones de Manejo y Cuidado” y “Manejo Experimental”.

Tabla 1: Fuentes bibliográficas utilizadas en los capítulos "1: Introducción y Bienestar Animal, y 2: Biología de la Especie"

<i>Nombre del artículo/guía/libro</i>	<i>Autor/es</i>	<i>Año</i>	<i>Capítulo 1</i>	<i>Capítulo 2</i>
<i>Bioética y el empleo de animales de experimentación en investigación</i>	Barrios, E. E., Espinoza, M., Leal, Ruiz, N., Pinto, V., & Jurado, B.	2011	x	-
<i>CCAC guidelines: Amphibians</i>	Canadian Council on Animal Car	2021	-	<u>xxx</u>
<i>Biochemical and hematologic reference intervals for aged Xenopus laevis in a research colony</i>	Chang, A. G., Hu, J., Lake, E., Bou D. M., & Johns, J. L.	2015	-	x
<i>Amphibian biology and husbandry</i>	Harvey Pough, F.	2007	-	<u>xx</u>
<i>Xenopus: bioindicador modelo en pruebas de laboratorio</i>	<u>Islas, H.</u>	s.f.	-	<u>xx</u>
<i>Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica</i>	Jar, A. M.	2014	<u>xx</u>	-
<i>Guidance on the housing and care of the African clawed frog Xenopus laevis</i>	Reed, B. T.	2005	x	<u>xxx</u>
<i>Engineering Xenopus embryos for phenotypic drug discovery screening</i>	Schmitt, S. M., Gull, M., & Brändli, .	2014	x	-
<i>Expanding the genetic toolkit in Xenopus: approaches and opportunities for human disease modeling</i>	Tandon, P., Conlon, F., Furlow, J. & Horb, M. E.	2010	x	-
<i>Serum clinical biochemical and hematologic reference ranges of laboratory-reared and wild-caught Xenopus laevis</i>	Wilson, S.	2011	x	-

Descripción: Nombre del artículo/guía/libro, autor y año de publicaciones utilizadas para realizar los capítulos "Introducción" y "Biología de la especie". El símbolo "x" representa la frecuencia citada por el autor: x mínimo, xx medio y xxx máximo.

Tabla 2: Fuentes bibliográficas utilizadas en el capítulo “3: Condiciones de Manejo y Cuidado, y 4: Manejo experimental”

Nombre del artículo/guía/libro	Autor/es	Año	Capítulo 3	Capítulo 4
<i>Effect of enrichment on the behaviour and growth of juvenile Xenopus laevis.</i>	Archard, G. A.	2012	-	x
<i>AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals</i>	AVMA	2020	-	xx
<i>CCAC guidelines: Amphibians</i>	Canadian Council on Animal Care.	2021	xxx	xx
<i>Amphibian biology and Biology, behavior, and environmental enrichment for the captive African clawed frog (Xenopus spp)</i>	Chum, H., Felt, S., Garner, J., & Green, S.	2013	-	xx
<i>Evaluation of effective and practical euthanasia methods for larval African clawed frogs (Xenopus laevis</i>	Galex, I.	2020	-	x
<i>Veterinary Nursing of Exotic Pets</i>	Girling S. J.	2013	xx	-
<i>The Laboratory Xenopus sp.</i>	Green S.L.	2010	x	-
<i>Amphibian biology and husbandry</i>	Harvey Pough, F..	2007	.	x
<i>Clinical technique: amphibian hematology: A practitioner’s guide.</i>	Heatley J.J. and Johnson M.	2009	x	-
<i>Amphibian biology and husbandry</i>	Holmes, A. M. et al.	2016	xx	-
<i>Impact of tank background on the welfare of the African clawed frog, Xenopus laevis (Daudin)</i>	Holmes A.M., Emmans C.J., Coleman R., Smith T.E. and Hosie C.A.	2018	x	-
<i>Adaption of a dermal in vitro method to investigate the uptake of chemicals across amphibian skin</i>	Kaufmann K. and Dohmen P.	2016	-	x
<i>Husbandry, general care, and transportation of Xenopus laevis and Xenopus tropicali</i>	Mcnamara, S., Wlizla, M., & Horb, M. E.	2018	xxx	x
<i>Evaluation of presurgical skin preparation agents in African clawed frogs (Xenopus laevis)</i>	Philips, B. et al.	2015	-	x
<i>Evaluation of environmental enrichment for Xenopus laevis using a preference test</i>	Ramos, J., & Ortiz-Díez, G.	2021	-	x

<i>Guidance on the housing and care of the African clawed frog Xenopus laevis</i>	Reed, B. T.	2005	xxx	xx
<i>Comparison of etomidate, benzocaine, and MS222 anesthesia with and without subsequent flunixin meglumine analgesia in African clawed frogs (Xenopus laevis)</i>	Smith, B. et al.	2018	-	x
<i>Amphibians, with special reference to Xenopus</i>	Tinsley R.	2010	xx	-
<i>Refuge cover decreases the incidence of bite wounds in laboratory South African clawed frogs (Xenopus laevis)</i>	Torreilles, S. L., & Green, S. L.	2007	-	x

Descripción: Nombre del artículo/guía/libro, autor y año de publicaciones utilizadas para realizar los capítulos “Condiciones de manejo y cuidado” y “Manejo experimental”. El símbolo “x” representa la frecuencia citada por el autor: x mínimo, xx medio y xxx máximo.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue recopilar y sintetizar la información disponible para la elaboración de un manual de manejo de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) en condiciones de experimentación. El presente estudio analizó 29 fuentes bibliográficas, con lo cual, se determinó que la bibliografía disponible si permite la compilación de información para estructurar un manual aplicable de *Xenopus laevis* como ejemplo de modelo experimental. Sin embargo, la falta de información actualizada dificultó la búsqueda de fuentes bibliográficas que cumplan con los criterios de inclusión por lo que múltiples guías y libros se descartaron.

Los artículos científicos desempeñaron un papel importante para desarrollar exitosamente el manual de manejo, siendo esta la fuente bibliográfica más utilizada (gráfico 1). Debido a que analizan información nueva y actualizada acerca de las ventajas del uso de la rana de uñas africana (Schmitt et al., 2014; Tandon et al., 2017), parámetros hematológicos comparativos entre ejemplares jóvenes y geriátricos (Chang et al., 2015; Wilson et al., 2011), enriquecimientos ambientales (Archard, 2012; Chum et al., 2013; Holmes et al., 2016; Torreilles & Green, 2007), métodos de analgesia, anestesia y eutanasia (Galex et al., 2020; Guénette et al., 2008; Philips et al., 2015; Smith et al., 2018). Desde el año 2016, ha existido un creciente interés en realizar más investigaciones con este espécimen debido a la secuenciación completa de su genoma en ese mismo año.

Por otro lado, los libros no brindan información actualizada sobre los temas antes planteados, sin embargo, proveen información sobre biología de la especie (Reed, 2005; Tinsley, 2010), alojamiento (Harvey Pough, 2007) y sujeción (Girling, 2013). Mientras que las guías brindan información sobre transporte y alimentación (McNamara et al., 2018), analgesia, cuarentena y anatomía (Canadian Council on Animal Care, 2021) y sobre métodos de eutanasia (AVMA, 2020).

El manual comprende 4 capítulos: Introducción y Bienestar Animal, Biología de la Especie, Condiciones de Manejo y Cuidado, Manejo Experimental. En el capítulo Manejo Experimental, se identificaron y sistematizaron más fuentes bibliográficas debido a que cumplen los criterios de inclusión, aparte de ser uno de los capítulos más extensos del manual. Mientras que la Introducción es el capítulo con menos fuentes bibliográficas debido a la falta de información actualizada y del corto desarrollo del capítulo.

Capítulo 1: Introducción y Bienestar Animal

En este capítulo se utilizaron un total de 5 fuentes bibliográficas. No se encontró un documento que establezca las normas bioéticas específicas para *Xenopus laevis* en Ecuador, por lo que se debería extrapolar información de otras especies, aunque no hay registros de exportación ni importación de *Xenopus laevis* en el territorio ecuatoriano por lo que no hay un precedente que permita conocer el estado de regulación de la especie dentro del país.

En este capítulo se describe la historia de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) en la investigación, características importantes que la diferencia de otras especies de anfibios y su hábitat que ocupa (Reed, 2005); por otro lado, se describe como la secuenciación completa del genoma brinda oportunidades únicas para estudiar enfermedades humanas (Tandon et al., 2017) y la aplicación de drogas para manejar dichas enfermedades, así como también estudiar la toxicología de fármacos (Schmitt et al., 2014). Otros autores citados describen la importancia de la formación de comités de bioética para establecer criterios y protocolos de manejo en animales de experimentación con el fin de garantizar el bienestar animal y poner en práctica en concepto de las 3 R's (Barrios et al., 2011; Jar, 2014).

Capítulo 2: Biología de la Especie

En este capítulo se utiliza un total de 6 fuentes bibliográficas. Los autores más citados fueron (Canadian Council on Animal Care, 2021; Reed, 2005), ya que proveen información valiosa en cuanto a fisiología, anatomía y etología. Así mismo, solo se encontraron 2 autores

que describen la hematología específica de esta especie, permitiendo comparar la bioquímica sérica y el hemograma de ranas jóvenes y geriátricas (Chang et al., 2015; Wilson et al., 2011).

Uno de los temas indispensables del capítulo son las etapas del ciclo de vida de la rana ya que dependerá de la etapa en la que se encuentre para determinar el manejo del mismo (Islas, 2018). En cuanto a la etología, solo se encontró información relevante en 3 fuentes, donde habla de su comportamiento normal y social (Canadian Council on Animal Care, 2021; Harvey Pough, 2007; Reed, 2005).

Los parámetros de constantes fisiológicas y el peso según la edad de la especie, no se encontraron en ninguna fuente bibliográfica, lo cual dificulta establecer criterios importantes para identificar dolor o estado de salud del ejemplar.

Capítulo 3: Condiciones de Manejo y Cuidado

En este capítulo se sistematizaron 8 fuentes bibliográficas, donde se detallan parámetros importantes para garantizar el bienestar animal y buenos resultados de laboratorio. Los autores más citados son (Canadian Council on Animal Care, 2021; McNamara et al., 2018; Reed, 2005), aportando información sobre transporte, enriquecimiento animal, parámetros óptimos del agua, requerimientos nutricionales, selección de animal, iluminación, temperatura, alojamiento, entre otros.

Es el capítulo en que se usan más libros (Harvey Pough, 2007; Reed, 2005; Tinsley, 2010), debido a la información que proveen acerca de alojamiento y parámetros adecuados para la elaboración de un microambiente adecuado para el desarrollo de los anfibios en etapa larvaria y del éxito reproductivo de los adultos.

Es el capítulo que más tuvo dificultades debido a que múltiples fuentes bibliográficas no cumplieron los criterios de inclusión y debieron ser descartadas, además, no se encontraron parámetros específicos sobre ventilación y humedad.

Capítulo 4: Manejo Experimental

En este capítulo se observó un total de 16 fuentes bibliográficas. Para la sujeción, toma de muestras y vías de administración se encontraron 5 fuentes bibliográficas que cumplían con los criterios de inclusión (Girling, 2013; Green, 2010; Heatley & Johnson, 2007; Kaufmann & Dohmen, 2018; Reed, 2005). En cuanto a procesos quirúrgicos, contraindicaciones y complicaciones solo se encontraron 2 fuentes, siendo uno de los apartados más cortos del manual (Canadian Council on Animal Care, 2021; Philips et al., 2015).

El apartado de enriquecimiento ambientales fue uno de los más largos, lo cual evidencia un aumento significativo del interés para garantizar el bienestar de los animales en el proceso investigativo, no solo promoviendo el uso de los enriquecimientos ambientales sino también comparando cual tiene un mayor beneficio social, etológico y sanitario del animal.

El apartado de analgesia fue el más corto de todo el manual, lo cual es preocupante debido a la falta de estudios de escalas del dolor y del sistema nervioso en anfibios, solo se encontró un tratamiento analgésico el cual con una alta dosis tiene una alta mortalidad (Smith et al., 2018).

En cuanto a la información en anestesia y eutanasia, los métodos según todos los autores son efectivos; pese a eso, siempre se deben realizar mínimo dos para asegurarnos de la muerte del animal para evitar un proceso doloroso y agónico. Por otro lado, se determinó que no se dispone de información actualizada en guías o libros sobre el destino final de la especie aparte de la eutanasia; aunque, este método se usa más en ejemplares enfermos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La bibliografía disponible si permite la compilación de información para estructurar un manual aplicable de *Xenopus laevis* como ejemplo de modelo experimental. Pese a esto, la revisión bibliográfica evidenció que la información actualizada es limitada y que muchos aspectos importantes para garantizar el bienestar animal de esta especie no están estandarizados.

La falta de estudio e información sobre constantes fisiológicas, sistema nervioso, establecer escalas de dolor y terapia analgésica fue lo más alarmante que arrojó la revisión sistemática, debido a que son bases importantes para cumplir con los parámetros de bienestar animal y no reconocer estos detalles puede resultar en un bienestar deficiente de los animales y puede a su vez, tener impactos negativos en las investigaciones.

El capítulo 4 fue el que tuvo más limitantes y donde se evidenció la falta de información, principalmente sobre manejo del dolor, escalas de dolor y destino final por lo que se recomienda realizar investigaciones sobre estos temas para garantizar el bienestar animal de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) en condiciones de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Veterinary Medical Association – AVMA. (2020). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals* (accessed on 2022-04-21).
- Archard, G. A. (2012). Effect of enrichment on the behaviour and growth of juvenile *Xenopus laevis*. *Applied Animal Behaviour Science*, 139(3-4), 264-270.
- Barrios, E. E., Espinoza, M., Leal, U., Ruiz, N., Pinto, V., & Jurado, B. (2011). Bioética y el empleo de animales de experimentación en investigación. *Salus*, 15(2), 28-34.
- Canadian Council on Animal Care. (2021). CCAC guidelines: Amphibians. Fecha de acceso: 02 de abril de 2022.
- Chang, A. G., Hu, J., Lake, E., Bouley, D. M., & Johns, J. L. (2015). Biochemical and hematologic reference intervals for aged *Xenopus laevis* in a research colony. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(5), 465-470.
- Chum, H., Felt, S., Garner, J., & Green, S. (2013). Biology, behavior, and environmental enrichment for the captive African clawed frog (*Xenopus* spp). *Applied Animal Behaviour Science*, 143(2-4), 150-156.
- Contreras-López, M., & Figueroa-Nagel, P. (2020). Hallazgo de *Xenopus laevis* D.(AMPHIBIA: ANURA) en el Humedal Mantagua (32° 51'S; 71° 30'W) producto de un tsunami en Chile Central. *Ecología Aplicada*, 19(1), 43-48.
- Galex, I. et al. (2020). Evaluation of effective and practical euthanasia methods for larval African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 59(3), 269-274.
- Girling S. J. (2013) *Veterinary Nursing of Exotic Pets*, 2nd ed. Ames IA: Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Green S.L. (2010) *The Laboratory Xenopus sp.* (Suckow M.A., ed.). Boca Raton FL: CRC Press.

- Guénette, S. A., Beaudry, F., & Vachon, P. (2008). Anesthetic properties of propofol in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(5), 35-38.
- Harvey Pough, F. (2007). Amphibian biology and husbandry. *ILAR journal*, 48(3), 203-213.
- Heatley J.J. and Johnson M. (2009) Clinical technique: amphibian hematology: A practitioner's guide. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18(1):14-19.
- Holmes, A. M. et al. (2016). Impact of tank background on the welfare of the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Daudin). *Applied animal behaviour science*, 185, 131-136.
- Holmes A.M., Emmans C.J., Coleman R., Smith T.E. and Hosie C.A. (2018) Effects of transportation, transport medium and re-housing on *Xenopus laevis* (Daudin). *General and Comparative Endocrinology* 266: 21-28.
- Islas, H.. *Xenopus: bioindicador modelo en pruebas de laboratorio*. UNIVERSITARIA, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 20-21, ene. 2018. ISSN 2594-004X. Disponible en: <<https://revistauniversitaria.uaemex.mx/article/view/9437>>. Fecha de acceso: 01 abr. 2022
- Jar, A. M. (2014). Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Revista argentina de microbiología*, 46(2), 77-79.
- Kaufmann K. and Dohmen P. (2016) Adaption of a dermal in vitro method to investigate the uptake of chemicals across amphibian skin. *Environmental Sciences Europe* 28(1):10 (accessed on 2022-03-23).
- Martínez, J. et al. (2015). Bioética en la experimentación animal. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(2), 1-19.
- Mcnamara, S., Wlizla, M., & Horb, M. E. (2018). Husbandry, general care, and transportation of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. In *Xenopus* (pp. 1-17). Humana Press, New York, NY.

- Nenni, M. J. et al. (2019). Xenbase: facilitating the use of *Xenopus* to model human disease. *Frontiers in physiology*, *10*, 154.
- Philips, B. et al. (2015). Evaluation of presurgical skin preparation agents in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *54*(6), 788-798.
- Ramos, J., & Ortiz-Díez, G. (2021). Evaluation of environmental enrichment for *Xenopus laevis* using a preference test. *Laboratory Animals*, *55*(5), 428-434.
- Reed, B. T. (2005). Guidance on the housing and care of the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Report. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals, Horsham, United Kingdom.*
- Schmitt, S. M., Gull, M., & Brändli, A. W. (2014). Engineering *Xenopus* embryos for phenotypic drug discovery screening. *Advanced drug delivery reviews*, *69*, 225-246.
- Smith, B. et al. (2018). Comparison of etomidate, benzocaine, and MS222 anesthesia with and without subsequent flunixin meglumine analgesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *57*(2), 202-209.
- Tandon, P., Conlon, F., Furlow, J. D., & Horb, M. E. (2017). Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: approaches and opportunities for human disease modeling. *Developmental biology*, *426*(2), 325-335.
- Tinsley R. (2010). Amphibians, with special reference to *Xenopus*. In: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, 8th ed. (Hubrecht R. and Kirkwood J., eds.). Chapter 48, pp.741-760. Oxford UK: Wiley-Blackwell.

Torreilles, S. L., & Green, S. L. (2007). Refuge cover decreases the incidence of bite wounds in laboratory South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(5), 33-36.

Wilson, S. et al. (2011). Serum clinical biochemical and hematologic reference ranges of laboratory-reared and wild-caught *Xenopus laevis*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 635-640.

ANEXO A: MANUAL DE MANEJO DE LA RANA DE UÑAS AFRICANA EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Capítulo 1: Introducción y Bienestar Animal

La rana de uñas africana o platanna común (*Xenopus laevis*), es nativa de África; fue exportada a otros continentes en el siglo XX para realizar estudios en laboratorio, entre las cuales se destaca: pruebas de embarazo (Reed, 2005). A lo largo de los años su papel en la investigación ha evolucionado; antes, la investigación en estos ejemplares era limitada debido al desconocimiento de su genoma completo el cual fue secuenciado por primera vez en 2016 (Tandon et al., 2017).

En cuanto a su ubicación geográfica y hábitat, habitan en aguas estancadas o piscinas, lagos, zanjas o estanques. Poseen características importantes que los distinguen de los demás anfibios, tales como: pulmones desarrollados para intercambio gaseoso mientras están en la superficie, su desarrollado sistema auditivo, células cutáneas llamadas cromatóforos las cuales contienen pigmento utilizadas para camuflarse, naturalmente son nocturnos y tienen glándulas mucosas que secretan una capa babosa protectora con propiedades antibacteriales y antifúngicas (Reed, 2005).

Se comenzaron a utilizar estos ejemplares para el desarrollo de técnicas endocrinas; en donde las hembras eran usadas para diagnosticar gestación en humanos inyectando orina humana en las ranas, las cuales producían huevos si las hormonas asociadas con el embarazo humano (GCH) estaban presentes, posteriormente fue utilizado para el desarrollo celular y molecular; y por otro lado, para la evaluación de la seguridad de contaminantes ambientales y otras sustancias toxicológicas (Schmitt et al., 2014).

El uso de animales en laboratorio debe tener en cuenta el bienestar animal, es decir, condiciones adecuadas en base a necesidades físicas y etológicas; por lo que se deben tomar en cuenta bases importantes, tales como: nutrición, alojamiento y sanidad. Debido a la gran

diversidad de especies usadas en procesos experimentales es necesario delimitar las necesidades específicas de la especie con la que se va a trabajar (Jar, 2014), en este caso la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*).

En el año 1993 se estableció el centro “*European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)*” el cual estableció la importancia de la instauración de las “tres erres” o 3 R’s: reemplazo, reducción y refinamiento; esta premisa tiene como base encontrar métodos alternativos de experimentación, en caso de ser necesario el uso de animales reducir la cantidad de ejemplares utilizados para llegar a los resultados esperados y a su vez disminuir el estrés y/o dolor de los animales mejorando el manejo experimental en base a su anatomía, fisiología y etología (Jar, 2014).

La creación de Comités Éticos de Investigación (CEI) en instituciones para el cuidado y uso de animales es vital, especialmente en facultades de Ciencias para la Salud. El cual, debe estar acorde a la normativa nacional e internacional y basada en protocolos de manejo, así como también con asesoramiento de médicos veterinarios, investigadores, alumnos, etc, para garantizar un crecimiento bioético colectivo (Barrios et al., 2011).

Capítulo 2. Biología de la Especie

Anatomía

La rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) pertenece a la familia Anura (Reed, 2005). Una de las características principales es su ciclo de vida complejo cuyas etapas están detalladas en la tabla 1. El estudio de su ciclo de vida es importante debido a que el desarrollo de los huevos y su metamorfosis dependerán del microambiente provisto en el laboratorio, y por consiguiente el éxito de los resultados de la investigación (Canadian Council on Animal Care, 2021).

Tabla 1. Ciclo de vida de *Xenopus laevis*

# de etapa	Nombre de etapa
1	Embrionaria
2-6	Segmentación
7-9	Blástula
10-12	Gástrula
13-21	Néurula
22-28	Larval temprana
29-46	Larval tardía
47-54	Renacuajo premetamórfico
55-60	Renacuajo prometamórfico
61-65	Clímax
66	Juvenil
67	Adulto

Nota. Ciclo de vida de la rana de uñas africana detallado por etapas (Islas, 2018).

Por otro lado, es importante establecer sus características físicas durante la etapa adulta, detalladas en la tabla 2; debido a que el manejo adecuado de los adultos determinará el éxito reproductivo, fecundativo y la calidad de los huevos en condiciones de laboratorio (Islas, 2018).

Tabla 2. Características anatómicas y su función en *Xenopus laevis*

Sistemas	Característica	Función
Visual	Posición de los ojos para visión atmosférica en lugar de la submarina.	Permiten detectar presas o a reaccionar a ataques de predadores.
Auditivo	Los oídos no son visibles externamente, pero tienen un desarrollado sistema auditivo.	Facilita la comunicación acústica subacuática entre individuos.
Olfativo	Las fosas nasales están posicionadas en la parte superior de la cabeza y poseen dos cavidades nasales (vomeronasal y rostral) lo que le permite oler en aire y agua.	Su sentido olfativo altamente desarrollado otorga a esta especie la rara habilidad de localizar y consumir alimentos no vivos.
Locomotor	<i>Miembros anteriores:</i> cortos con 4 dedos no palmeados. <i>Miembros posteriores:</i> largos con 5 dedos palmeados, 3 dedos interiores con garras.	<i>Miembros anteriores:</i> ayuda a alimentarse. <i>Miembros posteriores:</i> impulsarse en el agua y cazar o triturar presas.
Órganos sensoriales	Línea lateral de órganos sensoriales especializados, se encuentran en la zona caudal del cuerpo, cabeza y alrededor de los ojos.	Permite localizar presas y perturbaciones en el medio ambiente a través de la percepción del movimiento y velocidad del agua.
Respiratorio	<i>Respiración cutánea:</i> no está bien desarrollada en este género. <i>Respiración pulmonar:</i> posee pulmones desarrollados para intercambio gaseoso mientras están en la superficie.	Puede ahogarse si es impedido respirar aire ya que la ingesta de oxígeno a través de la piel no es suficiente.
Tegumentario	<i>Glándulas mucosas:</i> secretan una capa babosa protectora. <i>Glándulas serosas:</i> presentes en cabeza y hombros, sintetizan y secretan componentes con propiedades antibacteriales y antifúngicas. <i>Cromatóforos:</i> células que contienen pigmento.	<i>Glándulas mucosas:</i> prevenir daño mecánico y proveer una barrera contra los patógenos. <i>Glándulas serosas:</i> protección contra depredadores y químicos. <i>Cromatóforos:</i> les permite camuflarse, este mecanismo está bajo control hormonal.
Nervioso	Bien desarrollado con nociceptores y vías para la percepción y procesamiento de estímulos nocivos.	La nocicepción se transmite al sistema nervioso central; sin embargo, existe información limitada sobre si estas vías llegan al centro del cerebro, lo que resulta en una percepción consciente del dolor. De igual manera se debe minimizar el sufrimiento potencial.

Nota. Características anatómicas importantes para el manejo experimental de la especie (Canadian Council on Animal Care, 2021; Reed, 2005).

El sentido del olfato y los órganos sensoriales son algunos de los componentes más importantes al momento de realizar el cuidado y manejo experimental de esta especie, a diferencia de la visión, ya que individuos ciegos en el mismo tanque no han demostrado tener desventajas frente a los demás. Es esencial mencionar que el sistema de órganos sensoriales es altamente sensible y se suele encontrar con mayor frecuencia en anfibios predominantemente acuáticos (Reed, 2005).

Además, el dimorfismo sexual de la especie se puede establecer por dos pautas: tamaño (hembras son más largas que los machos) o las solapas cloacales visibles en la hembra, el cual es el método más eficaz para determinar el sexo (Reed, 2005).

Fisiología

En cuanto a fisiología no se encontró datos como: peso por edad o constantes fisiológicas. En cuanto a alimentación y por ende sus necesidades fisiológicas dependen de la etapa del ciclo de vida. Los renacuajos son herbívoros y se alimentan en su mayoría de partículas de plantas, mientras que durante la metamorfosis adoptan una dieta carnívora (Reed, 2005).

El uso biomédico de *Xenopus laevis* ha aumentado en los últimos años por lo que se ha permitido estudiar referencias hematológicas (Chang et al., 2015), detalladas en la tabla 3 y de bioquímica sérica, detalladas en la tabla 4, de ejemplares jóvenes y geriátricos.

Tabla 3. Referencias hematológicas de *Xenopus laevis*

Analito	Referencias de ejemplar joven	Referencias de ejemplar geriátrico
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.64–9.56	3.13–15.93
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0.80–1.48	0.84–1.84
Hemoglobina (g/dL)	6.06–15.19	6.25–19.10
Hematocrito (%)	23.3–47.0	32.8–61.6
Volumen corpuscular medio (fL)	31.6–62.8	24.78–52.96
Hemoglobina corpuscular media (pg)	6.9–22.1	5.80–16.91
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL)	19.3–32.3	21.29–38.12

Nota. Referencias hematológicas de ejemplares *X. laevis* jóvenes y geriátricos (Chang et al., 2015; Wilson et al., 2011).

Tabla 4. Referencias de bioquímica sérica de *Xenopus laevis*

Análito	Referencias de ejemplar joven	Referencias de ejemplar geriátrico
Albúmina (g/dL)	0.1–2.3	1.3–2.5
ALP (IU/L)	59–282	78–279
ALT (IU/L)	10–39	2–25
Amilasa (IU/L)	43–617	71–1498
Anión gap	13.1–36.1	4.1–29.3
AST (IU/L)	27–1774	49–480
BUN (mg/dL)	2–10	2–17
BUN: creatinina	3.0–36.0	4.2–47.5
Calcio (mg/dL)	5.2–12.3	7.9–11.9
Ca ²⁺ : Fósforo	0.7–2.0	0.9–3.9
CO ₂ (mmol/L)	8.4–34.3	14.2–37.1
Cloruro (mmol/L)	72.7–92.7	75–86
Colesterol (mg/dL)	56–563	29–325
CK (IU/L)	10–5400	431–5716
Creatinina (mg/dL)	0.1–1.1	0.2–0.5
GGT (IU/L)	1–19	54–206
Globulina (g/dL)	1.1–4.1	1.2–3.1
Glucosa (mg/dL)	18–111	13–61
HDL (mg/dL)	14–63	29–125
LDH (IU/L)	264–3893	ND
LDL (mg/dL)	21–240	2–136
Lipasa (IU/L)	58–163	30–97
Fósforo (mg/dL)	3.5–11.6	1.0–9.7
K ⁺ (mmol/L)	2.3–7.3	2.6–6.1
Na ⁺ (mmol/L)	111–134	112–126
Na ⁺ : K ⁺	14.7–53.8	17.6–41.4
Proteína total (g/dL)	2.0–4.6	2.3–5.2
Triglicéridos (mg/dL)	57–555	18–104
Ácido úrico (mg/dL)	0.1–0.4	ND

Nota. Referencias de bioquímica sérica de ejemplares *X. laevis* jóvenes y geriátricos, no disponible (ND) (Chang et al., 2015; Wilson et al., 2011).

Etología

X. laevis es un animal totalmente acuático en condiciones normales, la migración por cuerpos terrestres es limitada debido a que fuera del agua son susceptibles a deshidratación rápida que podría desencadenar la muerte. Naturalmente son nocturnos y pasan la mayoría del tiempo bajo el agua inmóviles con los miembros anteriores extendidos (Reed, 2005).

Los comportamientos normales de los anfibios son: nadar, saltar, correr y escalar según la especie. *Xenopus laevis* se caracteriza especialmente por nadar; además, debido a que son ectotermos regulan su temperatura migrando a un microclima apropiado (Harvey Pough, 2007). Suelen ocultarse evitando luces muy brillantes o estímulos nocivos. Los anfibios suelen ser solitarios excepto en época reproductiva, donde se comunican a través de señales químicas para establecer dominancia y disponibilidad de pareja (Canadian Council on Animal Care, 2021).

Capítulo 3. Condiciones de Manejo y Cuidado

Selección de especie

Se puede seleccionar tanto animales criados en laboratorio como en vida libre, sin embargo, por razones de salud y bienestar animal se sugiere no introducir animales de vida libre en colonias de laboratorio debido a que puede alterar la fiabilidad de los resultados y esparcir patógenos a la colonia (Reed, 2005). Además, se ha demostrado que los *Xenopus* criados artificialmente se acostumbran al movimiento de las personas y no reaccionan frente a estímulos bruscos o repentinos. En caso de que se decida utilizar anfibios de vida libre debe ser con una razón justificada (mantener diversidad genética de colonia) y teniendo en cuenta los protocolos de bioseguridad (Canadian Council on Animal Care, 2021).

Diversos patógenos en anfibios están latentes y el estrés podría ocasionar un brote de la enfermedad, los patógenos más comunes en *Xenopus* son: virus (*Ranavirus*), bacterias (*Mycobacterium spp.*, *Chlamydomphila spp.*) y hongos (*Chytrid* y *Cryptosporidium*). Los anfibios que muestren signos de enfermedad deben aislarse del alojamiento (McNamara et al., 2018)

Bioseguridad

Durante el transporte de los ejemplares se debe tratar de simular un microclima adecuado y en caso de que las condiciones climáticas comprometan el bienestar animal se debe posponer el transporte (Reed, 2005). El contenedor principal debe ser de un material resistente al agua ya que los anfibios necesitan estar permanentemente húmedos, aparte, un contenedor externo de un material duro para proteger el contenedor principal el cual debe tener un suministro de aire adecuado. Los contenedores usados deben ser nuevos o lavados meticulosamente con químicos que no sean nocivos para las ranas, y en caso de hacer agujeros para la circulación de oxígeno se los debe hacer de adentro hacia fuera para evitar bordes afilados que puedan herir a los anfibios (Canadian Council on Animal Care, 2021).

Por otro lado, se puede mantener la humedad del contenedor con esponjas mojadas, lo cual aparte da un sistema de amortiguación durante el transporte; el contenedor debe restringir el movimiento de las ranas para evitar lesiones y no se deben juntar ejemplares de diferentes tamaños para evitar el canibalismo o agresión. En caso de transportar a los anfibios durante la etapa larvaria, se los puede colocar en una funda con agua sin someterlos a cambios bruscos de temperatura; en este caso también se recomiendan contenedores secundarios con el fin de que si existe alguna fuga de agua se filtre a este contenedor y no genere retraso en el transporte (Canadian Council on Animal Care, 2021).

El transporte y alojamiento en el nuevo recinto de *X. laevis*, puede causar un aumento de corticoesterona y disminución de masa corporal hasta por un mes; aparte de que en caso que

la temperatura sea excesiva durante el transporte puede causar cambios estructurales en la piel y afecta a la calidad de los huevos en las hembras (Holmes et al., 2018). En caso de los anfibios en etapa larvaria, se recomienda transportarlas en fundas con 2/3 de aire y 1/3 de agua (Green, 2010).

Una vez que los ejemplares llegan a su destino es fundamental establecer un tiempo de cuarentena, con el fin de evitar el ingreso de patógenos. Idealmente, la cuarentena debe ser en habitaciones separadas, pero en caso de no disponer de diferentes espacios, debe existir una barrera física entre cada estanque para evitar la transmisión de patógenos por aerosoles. Las instalaciones destinadas a cuarentena deben disponer de todo lo necesario para el cambio de sustrato de los estanques, herramientas del personal destinadas solo a esta zona y materiales de desinfección (Reed, 2005).

Durante la cuarentena se debe hacer una inspección visual a todos los ejemplares en búsqueda de signos de enfermedad (palidez, caquexia, lesiones cutáneas), en especial de quitridiomycosis y en caso de sospecha se debe consultar con un médico veterinario. El tiempo mínimo de permanencia en cuarentena de animales criados en cautiverio varía de 10 – 30 días, mientras que de animales de vida libre es de 90 días; esto puede variar dependiendo del microclima durante la cuarentena, el transporte previo y los procedimientos de manejo (Canadian Council on Animal Care, 2021).

En caso de requerir un método de identificación individual debe estar justificado y se deben usar los métodos menos invasivos para evitar el estrés de las colonias, los más usados en anfibios son: marcas naturales y elastómero de implante visible (VIE) (Canadian Council on Animal Care, 2021).

Alojamiento

Las habitaciones destinadas al manejo de anfibios deben tener pisos diseñados para soportar el peso de las estanterías con estanques, pisos, paredes y techo impermeables para

facilitar la limpieza, materiales que soporten la humedad, enchufes eléctricos a prueba de agua, fuente de energía de emergencia y un área destinada para limpieza y desinfección del equipo (Canadian Council on Animal Care, 2021), aparte de la zona de cuarentena descrita anteriormente. Deben ser habitaciones con entrada restringida a insectos; en caso de que exista una plaga de insectos debe controlarse con métodos físicos (papel adhesivo), no químicos, debido a que los insecticidas tienen un efecto altamente nocivo en los anfibios (McNamara et al., 2018).

El estanque debe permitir el comportamiento social y movimiento natural del animal, es decir, que pueda nadar, girar fácilmente, acceder a la superficie y al fondo del tanque, descansar, flotar y esconderse; aparte, es importante tomar en cuenta que las hembras y machos deben ir en estanques separados, a menos que sea un estanque de reproducción (Canadian Council on Animal Care, 2021). Por otro lado, en un estudio se determinó que el fondo del estanque influye en la producción de corticoesteroides y disminución de la masa corporal (blanco) mientras que en el fondo de color negro mejora y garantiza el bienestar de esta especie (Holmes et al., 2016). Proveer un escondite es importante debido a que es parte de la etología de la especie, si no se les brinda este espacio serán sometidos a estrés al no poder expresar su comportamiento natural (Harvey Pough, 2007).

En cuanto a la iluminación, existen varias fuentes de luz que pueden ser usadas en el laboratorio (aluminio o fibra de vidrio recubierta de vinilo); para que haya más exposición a la luz se puede poner una malla más grande en el techo, pero hay que tener cuidado para que las ranas no puedan escapar (Harvey Pough, 2007). El fotoperíodo influye directamente en el ciclo reproductivo y de vida de esta especie por lo que se recomienda simular la luz de su hábitat natural, de ser posible hacer ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, o 14 horas de luz y 10 de oscuridad (McNamara et al., 2018).

Como sustrato pueden utilizarse piedras o plantas artificiales, aunque son difíciles de limpiar para el personal; pero por otro lado objetos naturales podrían ingresar un patógeno a la colonia por lo que se recomienda desinfectarlos antes de su uso (Canadian Council on Animal Care, 2021).

La temperatura es un factor esencial en el desarrollo de los anfibios, ya que temperaturas muy altas pueden llegar a ser letales, incluso más que las temperaturas bajas; se deben evitar los cambios bruscos de temperatura, y no debe fluctuar más de 6 °C en un período de 24 horas. Los cambios de temperatura pueden causar inapetencia, inmunodepresión o un choque térmico (Tinsley, 2010).

El flujo de aire debe ser cambiado de 12 a 15 veces por hora, sobre todo en habitaciones donde se encuentren especies acuáticas, el flujo de aire debe ser renovado con el fin de evitar transmisión de patógenos por aerosoles y para mantener un microambiente adecuado, ya que, una alta rotación de aire puede causar deshidratación, mientras que una alta rotación puede provocar crecimiento microbiano, corrosión del metal y contaminación (Canadian Council on Animal Care, 2021).

La calidad del agua también juega un papel importante en la salud y bienestar animal, el agua debe estar libre de químicos como el cloro y la cloramina ya que daña la capa mucosa de la rana. Los principales parámetros del agua que se deben medir a diario son: pH, temperatura, conductividad y salinidad (Green, 2010). Los parámetros del agua se encuentran detallados en la tabla 5.

Existen otros factores a tomar en cuenta para garantizar buenos resultados, tales como: densidad poblacional, temperatura, profundidad y sistemas de recirculación, detallados en la tabla 6.

Tabla 5. Parámetros del agua para *Xenopus laevis*

Parámetro	Valores
pH	6.5-8.5
Salinidad	0-5 ppt
Dureza	175-300 mg/L
Alcalinidad	50-200 mg/L
Oxígeno disuelto	>80% saturación
Dióxido de carbono	<5 mg/L
Amoníaco no ionizado	<0.02 mg/L
Nitrito	<1 mg/L
Nitrato	<50 mg/L
Cloro	<0.01 mg/L ⁶

Nota. Parámetros para evaluar la calidad del agua específicamente para *Xenopus laevis* (Green, 2010; Reed, 2005; Tinsley, 2010)

Tabla 6. Condiciones de alojamiento para *Xenopus laevis*

Condiciones de alojamiento	Características
Densidad poblacional	<i>Adultos:</i> 2,6-3,8 L por animal. <i>Juveniles:</i> 1-2 L por animal.
Profundidad del agua	30-50 cm, debe haber un espacio de aire adecuado entre superficie de agua y tapa por si salta.
Sistemas de recirculación	<i>Sistemas de recirculación:</i> miden y controlan automáticamente parámetros del agua. <i>Flujo continuo:</i> miden y regulan los mismos parámetros, pero son considerablemente menos económicos. <i>Vaciado y llenado estáticos:</i> son los menos usados.
Tanques	<i>Adultos:</i> tanques de inundación y descarga (limpieza automática de sólidos: restos de comida y productos de excreción). Minimizan tiempo y esfuerzos necesarios para eliminar sólidos y mantiene el agua limpia. <i>No</i> para renacuajos en crecimiento. <i>Renacuajos:</i> tanques con líneas de aire o burbujeadores instalados para oxigenar el agua. Cuidado, tasa de burbujeo demasiado rápida tiene un impacto negativo en los renacuajos.
Temperatura	<i>Temperatura óptima:</i> 18-22 °C. <i>Temperatura mínima:</i> 16 °C. <i>Temperatura máxima:</i> 24 °C. <i>Renacuajos:</i> 27 °C promueve crecimiento.

Nota. Condiciones de alojamiento, en los cuales se describe los tipos de sistemas de recirculación, de tanques y protocolos establecidos en cuanto a densidad poblacional, profundidad del agua y temperatura (Green, 2010; Harvey Pough, 2007; McNamara et al., 2018; Reed, 2005).

Nutrición

La información en cuanto a su alimentación es limitada por lo que en cautiverio suelen haber deficiencias nutricionales en sus dietas, por lo general se mantienen con sus dietas naturales (insectos) que provengan de un criadero confiable, y aparte administrar suplementos vitamínicos esparcidos en el insecto con el que se va a alimentar (Harvey Pough, 2007).

Con el fin de un adecuado desarrollo, maduración y éxito reproductivo de los animales es indispensable establecer un horario de alimentación, aparte de tener en cuenta los diferentes requerimientos nutricionales de renacuajos pre metamórficos, durante y después de la metamorfosis (McNamara et al., 2018).

Xenopus suele desarrollar preferencias alimentarias por lo que se puede combinar este alimento con nuevos para suplir deficiencias nutricionales (Green, 2010); los alimentos que no han sido consumidos de 3 a 5 horas después de suministrarlos deben ser retirados del tanque con el fin de no contaminar el microambiente, aparte esto es un indicador de que se colocó más comida de lo requerido (Reed, 2005).

Durante las primeras etapas de desarrollo se los debe alimentar con algas dos veces al día, cuando la cola empieza a reabsorberse se empieza a dar gránulos de comida una vez al día cinco días a la semana y cuando son adultos se los alimenta 2 veces a la semana dependiendo del horario que se tenga establecido (McNamara et al., 2018).

Capítulo 4. Manejo experimental

Manejo

El método de restricción del anfibio dependerá de su tamaño, en caso de ser pequeño la restricción química es la mejor opción para no hacer daño durante la sujeción; por otro lado, las ranas medianas o grandes deben sujetarse por la cintura con los miembros posteriores completamente extendidos. No se debe permitir que los animales flexionen las articulaciones de la cadera y la rodilla durante la sujeción para evitar patadas. En caso de manejar un animal más grande, también se tiene que inmovilizar los miembros anteriores (Girling, 2013).

Las vías de administración van a depender de la sustancia y de la especie; para las especies acuáticas la vía de administración principal es la inmersión (Kaufmann & Dohmen, 2018), en caso de que la sustancia no sea soluble en agua se puede optar por una inyección intramuscular en el muslo o intraperitoneal con la rana colocada en posición decúbito dorsal (Green, 2010).

Recolectar una muestra de sangre es complicado debido al tamaño de los anfibios, sin embargo, las venas de elección son: vena caudal ventral de la cola y la vena abdominal ventral (Reed, 2005), también puede emplearse una punción cardíaca o la vena facial pero son técnicas más invasivas, por lo que se requiere anestésico al ejemplar, siendo esta la última opción. En el caso de *Xenopus* la mayoría de estas venas son inaccesibles, por lo que se recurre a puncionar un dedo para adquirir aproximadamente unos 0,5 ml de sangre, lo cual puede causar dolor y estrés por lo que se debe administrar un anestésico local (Green, 2010). La selección de la aguja es un factor importante para reducir el trauma tisular (Heatley & Johnson, 2007).

Cirugía

Para la recolección de ovocitos el animal debe encontrarse en buen estado de salud, establecer un máximo de cirugías por individuo, tener un protocolo de analgesia/anestesia y un buen manejo postoperatorio, es decir, monitorear a los animales para analizar si hay signos de

inflamación, dehiscencia de las suturas u otros signos de enfermedad (Canadian Council on Animal Care, 2021). El anfibio debe estar hidratado en el pre y postoperatorio para evitar un cuadro de deshidratación severo, por otro lado, no es necesario una desinfección exhaustiva en el sitio de incisión debido a que la piel tiene propiedades antibióticas, en caso de desinfectar se debe usar solución salina estéril, no clorhexidina ya que provoca daños en la piel y complicaciones clínicas posteriores (Philips et al., 2015).

Enriquecimiento ambiental

Parte del bienestar animal es brindar herramientas para que los animales puedan expresar su conducta natural, lo cual se puede lograr mediante enriquecimientos ambientales; para esto, hay que tomar en cuenta las diferentes etapas de vida y por lo tanto de locomoción de los anfibios. Este método puede ayudar a disminuir el estrés sin afectar el potencial reproductivo de *Xenopus laevis* (Archard, 2012). Al contrario, se ha demostrado que el uso de enriquecimiento ambiental reduce el canibalismo en la colonia y agresiones físicas, mejorando así el bienestar físico y social de la especie en condiciones de laboratorio (Torreilles & Green, 2007).

Cualquier estructura que se añada al estanque como enriquecimiento debe tener una superficie lisa y bordes redondeados para no provocar lesiones en la rana, tampoco debe interferir en la circulación del agua ni en el proceso de limpieza del recinto (Canadian Council on Animal Care, 2021).

El enriquecimiento ambiental no debe ser excesivo para evitar la formación de algas, se pueden utilizar tuberías de PVC cortadas en la mitad con los bordes alisados para que las ranas puedan esconder (McNamara et al., 2018). Aunque, en un estudio se determinó que *Xenopus laevis* prefiere plantas sintéticas como enriquecimiento ambiental, lo cual facilita la observación de las mismas sin estresarles y reduce la acumulación de detritos (Ramos & Ortiz-Díez, 2021), sin embargo hay que tener cuidado con el material y estar seguros que no causa

lesiones en la piel (Canadian Council on Animal Care, 2021); además, es importante mencionar que si se colocan piedras como enriquecimiento ambiental no deben ser muy pequeñas para reducir el riesgo de ingesta (Chum et al., 2013).

Analgesia

La información de la analgesia en anfibios es bastante limitada, sin embargo, se ha determinado la dosis de flunixin meglumina para el manejo del dolor, siendo la dosis 25 mg/kg, en caso de una sobredosis la mortalidad es alta (Smith et al., 2018).

Anestesia

En caso de que el animal se someta a un proceso potencialmente doloroso o a manipulación durante un tiempo prolongado se recomienda el uso de anestesia para reducir el estrés y minimizar el riesgo de lesiones. Durante este proceso debemos mantener estable la temperatura de la rana para que se metabolicen exitosamente los fármacos; durante todo el procedimiento los animales deben ser monitorizados, aparte, se deben anotar las dosis y volúmenes del protocolo anestésico empleado para futuros procedimientos (Girling, 2013).

La anestesia se puede evaluar por la ausencia del reflejo de enderezamiento, pérdida de reflejo corneal y pérdida del reflejo de retirada frente a estímulos nociceptivos. Para la inducción se debe colocar a la rana con las fosas nasales sobre la superficie del agua (Green, 2010). Existen múltiples anestésicos que pueden ser empleados en anfibios, los cuales se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Agentes anestésicos para *Xenopus laevis*

Fármaco	Característica
TMS	Anestésico común; sin embargo, debe ser tamponado y utilizado solo en animales sanos. <i>Inmersión:</i> 300-500 mg/L de agua. <i>Inyectable:</i> 50-150 mg/kg.
Benzocaína	Induce la anestesia más rápido, pero tiene un tiempo de recuperación prolongado y variable. <i>Inmersión.</i>
Isoflurano líquido	Administración <i>tópica</i> , solo sirve para procedimientos cortos.
Propofol	No se recomienda. Posee estrecha ventana de dosis-efecto, corta duración y bajo nivel de anestesia.

Nota. Agentes anestésicos usados en esta especie detallado con vías de administración y recomendaciones (Canadian Council on Animal Care, 2021; Chum et al., 2013; Guénette et al., 2008).

Eutanasia

La eutanasia es el destino final de los ejemplares, la cual, en anfibios de uso común, como es el caso de *Xenopus laevis* se recomienda un método físico con el animal anestesiado; también se recomienda que se usen dos métodos de eutanasia para asegurar la muerte del animal (AVMA, 2020). El método más usado de eutanasia es la inmersión, seguido por inyección intravenosa, aunque es complicado en *Xenopus laevis* y por último anestésicos inhalatorios lo cual no es aplicable en los anfibios debido a que pueden realizar apnea voluntaria e incluso podría ser irritante y un proceso estresante para el animal (Green, 2010). En la tabla 8 se detallan algunos medicamentos usados para eutanasia.

Tabla 8. Agentes eutanásicos para *Xenopus laevis*

Fármaco	Característica
TMS	Se prefiere la <i>inmersión</i> en una sobredosis de TMS, es uno de los métodos menos estresantes para los animales. Al menos una hora en solución tamponada con una concentración de 5 g/L.
Benzocaína	<i>Inmersión</i> a una concentración ≥ 250 mg/L o como gel tópico sobre la zona ventral del anfibio. produce la muerte después de 3-5 horas.
Eugenol	Se recomienda como un medio efectivo y práctico para sacrificar renacuajos de <i>X. laevis</i> , no adultos.
Pentobarbital sódico	Sobredosis mediante inyección intracardíaca (bajo anestesia), intracelómica o subcutánea en el saco linfático.
Decapitación	Solo se realiza en un animal totalmente anestesiado

Nota. Agentes eutanásicos usados en esta especie detallado con vías de administración y recomendaciones (AVMA, 2020; Chum et al., 2013; Galex et al., 2020; McNamara et al., 2018; Reed, 2005).