

## MODELOS ANIMALES EN ANFIBIOS

### AMPHIBIAN ANIMAL MODELS

Marcos Pérez, Carlos Rojo, M. Teresa Encinas

Dpto. de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. UCM.

#### RESUMEN

Un modelo animal es aquel que emplea animales de especies distintas a la humana, seleccionados por sus características específicas, para ser utilizados en investigación o docencia. En el diseño de los mismos las claves son la elección de la especie animal y la viabilidad de extrapolación de los datos obtenidos a la especie en que se vayan a aplicar los resultados obtenidos. En este trabajo se revisan los aspectos anatómicos, fisiológicos y ecológicos que han convertido a algunas especies de anfibios en unas de las más utilizadas como modelos animales en experimentación dentro de campos diversos (fisiología, toxicología): facilidad de mantenimiento en cautividad, excelente adaptabilidad a diversos hábitats, elevada prolificidad, capacidad de regeneración de tejido y gran sensibilidad de los individuos adultos y de sus embriones a los cambios del medio ambiente. Así mismo, se hace una revisión de las especies más utilizadas por campos de investigación.

**Palabras clave:** modelo animal, modelo experimental, anfibios, ranas, sapos, salamandras.

#### ABSTRACT

An animal model is a non-human animal useful for research and teaching because it has specific characteristics that resemble a human or superior animal. In the design of those animal models, the keys are the election of the correct species and the viability to extrapolate the data obtained to the species in which these are going to be used. In this work the anatomic, physiologic and ecological aspects that turn some of the amphibian species in the most employed animal models in investigation are reviewed. These are: easy breeding, tolerance to diverse habitats, high prolificity, phylogenetic and ecological diversity, tissue regeneration capability, unique ability to undergo metamorphosis, high sensitivity to climatic and habitat changes. The most important amphibian models used in research are reviewed in this article.

**Keywords:** animal model, experimental model, amphibians, frogs, toads, salamanders.

#### INTRODUCCIÓN

El concepto de modelo animal empezó a usarse antiguamente en Grecia donde el filósofo y médico Galeno (131-201AC) transfirió sus conocimientos sobre la anatomía de cerdos y

monos a la anatomía humana. Así, un modelo animal en experimentación es aquel que utiliza animales no humanos, seleccionados en función de sus características específicas, para ser utilizados en investigación o docencia. Gracias al empleo de modelos animales se han comprendido mejor los principios básicos de la genética, bioquímica, fisiología y comportamiento humanos y se han descubierto numerosos tratamientos y terapias para humanos. En el diseño de los mismos las claves son: la elección de la especie animal que más se adapte al estudio y la viabilidad de la extrapolación de los resultados desde la especie modelo a la especie en que se vayan a aplicar los resultados obtenidos, incluyendo el hombre (Shanks *et al.*, 2009). Uno de los Phylum más utilizados como modelos experimentales es el grupo Amphibia, ya que éstos presentan unas enormes ventajas entre las que se incluyen un buen conocimiento de su fisiología, gran diversidad taxonómica, tolerancia a grandes variaciones en el ambiente, fácil mantenimiento en cautividad y mayor similitud con los humanos en comparación con otras especies animales utilizadas en experimentación. Todas estas ventajas han hecho que los anfibios constituyan un tercio de los modelos animales, siendo utilizados por varios investigadores galardonados con el Premio Nobel (Tabla 1).

Tabla 1: Utilización de modelos animales con anfibios en las investigaciones de Premios Nobel.

<b>Fecha</b>	<b>Galardonados</b>	<b>Campos de estudio</b>	<b>Especies utilizadas</b>
1920	A. Krogh	Regulación capilar	<i>Rana esculenta</i> <i>Rana temporaria</i>
1922	A.V. Hill O.F. Meyerhof	Metabolismo muscular	<i>Rana temporaria</i>
1935	H. Spermann	Centros orgánicos	<i>Triton cristalus</i> <i>Triton laeniatus</i>
1936	H. Dale O. Loewi	Bases químicas en la transmisión nerviosa	<i>Rana esculenta</i>
1947	B.A. Houssay	Regulación del metabolismo de carbohidratos	<i>Buto arenarum</i> <i>Rana pipiens</i>
1963	J.C. Eccles A.L. Hodgkin A.F. Huxley	Base de los iones en los potenciales de acción	<i>Rana esculenta</i> <i>Rana temporaria</i>
1991	E. Neher B. Sakmann	Función de los canales iónicos	<i>Rana esculenta</i>

El empleo de los anfibios como modelos experimentales ha variado a lo largo de la historia de forma paralela a como lo han hecho los conocimientos y métodos científicos. En los comienzos de la fisiología experimental se emplearon debido a su pequeño tamaño, su ubicuidad y la tolerancia a procedimientos quirúrgicos; Galvani, en 1780, usó órganos aislados de ranas para demostrar la importancia de la actividad eléctrica en la activación

muscular, lo que fue posible gracias a que las ranas son poiquilotermos (no necesitan bombas de perfusión ni reguladores de temperatura). Posteriormente, fueron utilizados en investigaciones de biología celular que requerían una observación directa e individual de las células, utilizando eritrocitos de los anfibios que tienen un gran tamaño y permitían llevar a cabo esta técnica. En los años 1930-1940 la facilidad para mantener y criar *Xenopus* permitió que se empleasen como método de diagnóstico de gestación, basándose en su capacidad de ovular ante el estímulo de la gonadotropina coriónica humana (hCG) presente en la orina de mujeres gestantes. En la actualidad se llevan a cabo numerosos estudios sobre fisiología y otros campos científicos que emplean anfibios como modelos animales y cuya revisión es el objetivo de este trabajo.

## **DESARROLLO**

### **Características especiales de los anfibios de interés como modelos animales**

August Krogh, un gran fisiólogo danés, expresó que para cada cuestión fisiológica hay una especie animal adecuada para ser usada como modelo. Según esto, los anfibios son uno de los modelos de elección por las siguientes razones (Burgreen y Warburton., 2007):

**Fisiología básica:** Existen una gran cantidad de estudios que describen y explican las características anatómicas, fisiológicas y ecológicas de los anfibios. En muchos de ellos el objetivo es el conocimiento de los anfibios *per se*, ya que estos animales despiertan un gran interés por su posición clave en la escala evolutiva. Sin embargo, los resultados aportados pueden ser utilizados en la creación de modelos animales, extrapolables incluso a animales mamíferos.

**Facilidad de mantenimiento en cautividad:** los anfibios utilizados en experimentación presentan una talla media comprendida entre 1 y 20 cm, por lo que requieren espacios relativamente pequeños para su confinamiento en jaulas; se estima que las necesidades medias son de 80 L por animal. Sí es importante realizar un perfecto mantenimiento de las condiciones de humedad (que ha de ser elevada) y ventilación, para asegurar el buen estado físico de los individuos y evitar la proliferación de microorganismos. Por otro lado, su alimentación no es compleja y de fácil adquisición en tiendas dedicadas a artículos de pesca: insectos y otros pequeños invertebrados como moscas del vinagre, moscas domésticas, cresas de moscas, cigarras y grillos de reducido tamaño, coleópteros, pulgones, pequeños saltamontes y arañas, mosquitos (adultos y larvas) (Browne *et al.*, 2007).

**Prolificidad elevada:** algunas especies exóticas son poco prolíficas porque tienen que llevar los huevos o renacuajos en la espalda, en bolsas de la piel, o incluso en el estómago durante

una gran parte de su juventud. Sin embargo, la mayoría de las especies del género *Rana* cría a principio de la primavera alcanzando los 20.000 huevos por puesta. Hay también dos especies de sapos, y algunas salamandras y cecilias que paren crías vivas que tienen una conformación corporal similar a la de sus progenitores.

**Elevado número de especies:** existen 3.140 especies de anfibios conocidas que se han dividido en tres ordenes: *Anura* o *Salientia* (2660 especies de ranas terrestres y arborícolas y de sapos), *Urodela*, o *Caudata* (320 especies de salamandras) y *Apoda*, o *Gymnophiona* (160 especies de cecilias). Esta gran diversidad de especies permite realizar estudios comparativos con facilidad.

**Gran diversidad de hábitats:** la diversidad de especies, a su vez se traduce en una amplia distribución geográfica y gran capacidad de adaptación a distintos medios naturales. Así, podemos encontrar anfibios en muy diversos hábitats, adquiriendo morfologías distintas y mostrando diversas adaptaciones fisiológicas al ambiente. Algunos, como *Xenopus laevis*, son completamente acuáticos aunque tengan la capacidad de respirar aire directamente, lo que hace que predomine un tipo de respiración cutánea no habiendo perdido la forma de respiración pulmonar. Otra clase de anfibios han sido encontrados a más de 4000 metros de altitud (*Rana sauteri* en Taiwan) con una gran capacidad de resistencia a las bajas temperaturas y a la concentración reducida de oxígeno en el aire. También es conocida la capacidad de sapos encontrados en altas latitudes de resistir la congelación completa de su cuerpo. Otras especies (*Rana cancrivora*, o rana comedora de cangrejos), incluso han desarrollado la capacidad de hacer inmersiones en agua salada de mar consiguiendo resolver los problemas osmoreguladores que se presentan en este medio. Estas adaptaciones y cambios filogenéticos han sido de gran interés y han permitido la realización de numerosos estudios evolutivos. Krogh, en 1920, resumió en un principio con su nombre (*principio de Krogh*) cómo algunas cuestiones en los campos de la fisiología evolutiva y del desarrollo filogenético, han de ser explicados y estudiados sobre modelos anfibios debido a su inigualable capacidad de adaptación a hábitats específicos (Bennet, 2003).

### **Modelos animales con anfibios**

Para su exposición hemos clasificado algunos ejemplos de modelos animales que utilizan distintas especies de anfibios en función del campo experimental en el que se resultan de aplicación, explicando brevemente su aplicabilidad al método experimental.

Tabla 2: Resumen de los modelos experimentales realizados con anfibios.

Área científica	Experimentos	Especie anfibia
<b>Fisiología cardiovascular</b>	Desarrollo cardiaco	Ajolote ( <i>Ambystoma mexicanum</i> )
	Reparación del daño tras infarto	Tritón ( <i>Notophthalmus viridescens</i> )
	Permeabilidad vascular	Rana africana de uñas ( <i>Xenopus laevis</i> )
	Relación con el comportamiento	Anuros en general
<b>Fisiología del músculo esquelético</b>	Metabolismo celular	Rana africana de uñas ( <i>Xenopus laevis</i> )
	Corrientes de activación de calcio	Sapo de las Montañas Rocosas ( <i>Bufo woodhousei</i> )
	Canales de membrana	Rana leopardo ( <i>Rana pipiens</i> )
	Cinética de alta velocidad	Ajolotes ( <i>Ambystoma mexicanum</i> , <i>Ambystoma tigrinum</i> )
<b>Función renal</b>	Desarrollo del riñón	Sapo marino ( <i>Bufo marinus</i> )
<b>Fisiología sensorial</b>	Canales iónicos y conexiones neuronales	Salamandra tigre ( <i>Ambystoma tigrinum</i> )
	Evaluación del sentido del gusto	Sapo moteado ( <i>Bufo punctatus</i> )
	Neurofisiología del oído interno	Coquí común ( <i>Eleutherodactylus coqui</i> ) Salamandra olm ( <i>Proteus anguinus</i> )
<b>Fisiología respiratoria</b>	Desarrollo del sistema respiratorio	Salamandras (fam. <i>Plethodontidae</i> )
<b>Fisiología reproductiva</b>	Desarrollo embrionario	Coquí común ( <i>Eleutherodactylus coqui</i> )
	Evolución del aparato reproductor	Cecilias ( <i>Gymnophiona</i> )
<b>Fisiología evolutiva</b>	Adaptación a la terrestrialidad	Tritón vientre de fuego chino ( <i>Cynops orientalis</i> )
<b>Fisiología ambiental</b>	Indicadores de la calidad ambiental	Rana de bosque ( <i>Rana sylvatica</i> ) Rana leopardo ( <i>Rana pipiens</i> )
	Ambientes extremos	
	Criogenización	Rana africana de uñas ( <i>X. laevis</i> )

**Fisiología del músculo esquelético:** muchos de los estudios iniciales sobre inervación y actividad muscular fueron realizados en anfibios, con protocolos de trabajo que hoy todavía se emplean, con ciertas modificaciones, en laboratorios para docencia.

La forma y la función del músculo esquelético de los anfibios continúan siendo un campo muy fértil, aplicando nuevos protocolos y técnicas científicas, para el estudio de procesos básicos de metabolismo celular, corrientes de activación de calcio, cinética de canales de membrana (Novo *et al.*, 2003), y otros procesos más específicos como los estudios de la cinética de alta velocidad responsable de los movimientos de la lengua. Una de las últimas revisiones sobre la activación muscular por calcio enfatiza el papel clave de los anfibios en la comprensión de la fisiología muscular (Klein y Schneider, 2006).

**Estudios del sistema cardiovascular:** en este campo, dentro de los estudios realizados con modelos anfibios se incluyen los que realizó el Premio Nobel August Krogh en 1920 sobre regulación capilar.

En la actualidad el ajolote (*Ambystoma mexicanum*) se emplea frecuentemente en investigaciones sobre el desarrollo cardiaco, ya que existen individuos que sufren una

mutación que les produce una carencia de corazón; realmente, éste se desarrolla a lo largo de la vida del animal, si bien nunca llega a latir ya que sus miofibrillas están mal organizadas (Zhang *et al.*, 2006). En otros vertebrados se produce también esta mutación que resulta letal en estadios iniciales del desarrollo; sin embargo, el ajolote es capaz de sobrevivir y continuar su desarrollo durante varios días.

Otra característica interesante de algunos anfibios es su capacidad para “regenerar” miocitos, a diferencia de los mamíferos; esta característica se está utilizando en modelos para el estudio de la recuperación miocárdica tras un infarto (Stocum, 2003). Realmente los miocitos de los anfibios no se regeneran sino que tienen capacidad potencial para dividirse y “repoblar” la zona cardíaca dañada (Bettencourt-Diaz *et al.*, 2003).

Dentro de la investigación microvascular se utilizan anfibios en el desarrollo de nuevas técnicas para estudiar la permeabilidad vascular, basándose en el gran desarrollo de su sistema linfático, que incluye incluso un corazón linfático pulsátil (Williams *et al.*, 1998).

Por último el estudio de la relación entre el comportamiento y la función cardiovascular en anuros es de gran interés ya que son el único grupo de animales terrestres cuya hidratación no depende de la ingesta de agua o de su producción a partir del metabolismo; estos animales absorben agua a través de una zona en la piel y, mediante cambios posturales, pueden conducirla al sistema circulatorio y regular así su volumen sanguíneo.

**Función renal:** para una adecuada filtración renal en mamíferos es necesario el desarrollo del riñón desde pronefros hasta el metanefros, pero el pronefros no es funcional en estadios iniciales del desarrollo y es difícil estudiar su funcionalidad “in útero”. En los anfibios el pronefros es funcional en estadios iniciales y sirve de órgano filtrador de sangre, lo que nos permite estudiar más fácilmente el desarrollo de este órgano.

**Fisiología sensorial:** los anfibios han sido el modelo animal de elección en estudios sobre visión durante años, y se siguen empleando en la actualidad. Las células retinianas de los anfibios tienen un gran tamaño, lo que hace que sean el modelo ideal para estudiar la actividad de los canales y la conexión neuronal. La investigación de otros sistemas sensoriales también se ha beneficiado de algunas de las características fisiológicas de los anfibios, ya que los anfibios (como las aves) tienen la capacidad de regenerar las células ciliadas del oído interno, a diferencia de los mamíferos, una de las principales causas de sordera en humanos. Además, *Bufo punctatus* ha sido empleado para evaluar el sentido del gusto en humana, ya que este sapo que habita en zonas desérticas tiene una zona especial de la piel capaz de absorber agua y posee unos sensores que detectan la salinidad de dicho agua (para poder regular su osmolaridad).

**Fisiología respiratoria:** la fisiología respiratoria de estos animales concede un amplio campo de estudio. Los individuos adultos intercambian gases a través de los pulmones y la piel, aunque existe un grupo de salamandras que carecen de pulmones y cuya respiración es completamente cutánea. Las branquias están presentes normalmente durante el desarrollo larvario y se mantienen en ciertos casos durante las fases adultas. El paso de una respiración branquial a pulmonar se lleva a cabo durante el proceso de metamorfosis, que es sumamente interesante para el estudio del control respiratorio desde el punto de vista de la fisiología de la evolución, fisiología del desarrollo y fisiología ambiental (Straus, 2000).

**Fisiología reproductiva:** la mayoría de los anfibios se reproducen por fecundación externa de huevos de los cuales nacen larvas que sufren un proceso de metamorfosis hasta alcanzar la fase adulta. Este patrón no es constante, ya que algunas especies presentan ciertas variaciones; por ejemplo la especie *E. coqui* carece de formas larvarias libres, ya que éstas sufren metamorfosis en el interior del huevo. Las cecilias tienen fecundación interna y paren crías vivas; para que esto se produzca los machos poseen una adaptación de los conductos que funcionan como glándulas accesorias (próstata y vesículas seminales en mamíferos) por lo que las cecilias constituyen un eslabón intermedio en el desarrollo del aparato reproductor de los vertebrados.

**Fisiología evolutiva:** debido a que los anfibios ocupan un puesto de transición entre los animales acuáticos y los tetrápodos terrestres, su empleo para el estudio de la adaptación a la terestrialidad y la respiración de aire es de gran importancia. La invasión del medio terrestre requiere de una serie de retos a superar, como son regular el equilibrio ácido-base y eliminar los productos nitrogenados (el CO<sub>2</sub> y el amonio son muy solubles en el agua, y pueden ser eliminados fácilmente a través de las branquias). Con la migración hacia el medio terrestre y la respiración aérea, la eliminación del CO<sub>2</sub> se hizo más difícil y comenzó a acumularse en el organismo permitiendo así su participación en la regulación del equilibrio ácido-base (en animales acuáticos el CO<sub>2</sub> no participa en este proceso ya que no puede acumularse en los tejidos). Algo similar ocurre con el amonio, que en el medio terrestre debe excretarse en forma de productos nitrogenados (urea y ácido úrico) con el consiguiente gasto de energía.

**Fisiología ambiental:** los anfibios han sido muy utilizados como indicadores de la calidad ambiental. Gran parte de los estudios se referían a calidad de agua en relación con la mortalidad de los anfibios, pero tras la drástica disminución de la población de anfibios muchos biólogos se decantan más por una respuesta fisiológica a este suceso. Concretamente, se cree que la liberación de disruptores endocrinos desde las industrias y las zonas urbanas, pueden ser la causa de graves alteraciones en los ciclos reproductivos y del desarrollo de estos

animales. Por ello, la investigación de estos procesos no tiene sólo un fin medioambiental, sino también de salud pública y los anfibios se han consolidado como organismos centinelas de contaminantes perjudiciales para los humanos (Kloas, 2002). Además, los anfibios también se han empleado como modelos fisiológicos en ambientes extremos; por ejemplo en hipogravedad e hipergravedad aunque, debido a las limitaciones existentes, los estudios se han centrado más en los cambios morfológicos y del comportamiento de estadios larvarios (Yamashita *et al.*, 2002). Finalmente, los anfibios también se han empleado en estudio de criogenización, ya que muchas ranas poseen crioprotectores naturales que evitan su congelación. Esta característica no sólo es interesante desde el punto de vista de la adaptación a ambientes extremos, sino también para el desarrollo de métodos más eficientes para almacenar tejidos (Feder y Burggren, 1992).

## CONCLUSIONES

Los anfibios como animales de experimentación presentan gran interés para la realización trabajos de Herpetología y como modelos animales de aplicación en múltiples disciplinas. Sus características anatómicas, fisiológicas, reproductivas y ecológicas ofrecen múltiples posibilidades de estudio, algunas de ellas únicas en el reino animal, como los procesos de metamorfosis o la capacidad de regenerar tejidos y miembros.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bennet, AF.** 2003. Experimental evolution and the Krogh principle: Generating biological novelty for functional and genetic analyses. *Physiol. Biochem. Zool.*, 76: 1-11
- Bettencourt-Diaz, M y Brookes,JP.** 2003. Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J. Cell. Ser.*, 116: 4001-4009
- Browne, RK; Odum, RA; Herman, T y Zippel, K.** 2007. Facility design and associated services for the study of amphibians. *ILAR Journal*, 48: 189-202.
- Burgreen, W y Warburton, S.** 2007. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR Journal*, 48: 260-269.
- Feder, ME y Burggren, WW.** 1992. Environmental physiology of the amphibians. The University of Chicago press.
- Hopkins, W.** 2007. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR Journal*, 48: 270-277
- Klein, MG y Schneider, MF.** 2006. Ca<sup>2+</sup> sparks in skeletal muscle. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, 92: 308-332

- Kloas, W.** 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int. Rev. Cytol.*, 216: 1-57.
- Novo, D; DiFranco, M y Vergara, JL.** 2003. Comparison between the predictions of diffusion-reaction models and localized  $Ca^{2+}$  transients in amphibian skeletal muscle fibers. *Biophys J.*, 85: 1080-97
- Shanks, N.; Greek, R y Greek, J.** 2009. Are animal models predictive for humans? *Philos. Ethics Humanit Med.*, 4:1-20.
- Stocum, DL.** 2003. The regenerative biology of amphibians: gateway to a regenerative medicine. *J. Regenerative Med.* 4, 1-6.
- Straus, C.** 2000. Ontogeny of respiratory muscle control. Evidence from the amphibian model. *Rev. Mal. Respir.*, 17: 585-90
- Williams, JG; Jones, JM y Toews, DP.** 1998. Effects of hypervolemia and hypovolemia on cardiac and posterior lymph heart function in the toad *Bufo marinus*. *Physiol. Zool.*, 71: 458-468
- Yamashita, M; Naitoh, T y Wassersug, RJ.** 2002. Perspective on gravitational biology of amphibians. *Biol. Sci. Space.*, 16: 245-270.
- Zhang, C; Pietras, KM; Sferrazza, GF; Jia, P; Athauda, G; Rueda-de-Leon, E; Maier, JA; Dube, DK; Lemanski, SL; Lemanski, LF.** 2007. Molecular and immunohistochemical analyses of cardiac troponin T during cardiac development of Mexican axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J. Cell. Biochem.*, 100: 1-15.