

Evaluación del desarrollo físico y funcional en ratas recién nacidas para su uso en estudios de toxicología perinatal y postnatal.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2**},

Yulieé López Fera^{3*}, Lisset Ortiz Zamora^{4***}, Dayisell Lazara Curveco

Sánchez^{5****}.

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

²Licenciado en Microbiología

³Doctor en Medicina Veterinaria

⁴Licenciado en Ciencias farmacéuticas, MSc

⁵Técnico Medio en Farmacia.

* Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

** Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

*** Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Farmacia, Calle Patricio Lumumba s/n, Municipio Santiago de Cuba, Apartado Postal 90900, Santiago de Cuba, Cuba.

**** Centro de Productos Naturales (CPN, CNIC), Calle 198 e/19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

El diseño de tres estudios que abarcan de forma directa o indirecta todos los estadios del proceso de la reproducción, se considera que es el más adecuado para la evaluación de la mayoría de los productos medicinales y vacunas. Se deben tener en cuenta todos los datos farmacológicos, cinéticos, y toxicológicos para decidir cuáles de los estudios se realizarán. La opción más probable es la combinación de estudios sobre, la fertilidad y el desarrollo embrionario temprano, el desarrollo pre y postnatal incluyendo la función reproductiva y el desarrollo embriofetal. El estudio de los efectos sobre el desarrollo pre y postnatal el cual en este artículo es del que nos compete hablar, detecta los efectos tóxicos en la hembra durante la preñez y la lactancia y aquellos producidos en las crías por la exposición de las madres desde la implantación hasta el destete. Este estudio se realiza al menos en una especie, preferiblemente la rata. Estos procedimientos se aplican para determinar los efectos sobre las crías de los tratamientos dados a sus padres. En el mismo se detalla una metodología para evaluar el desarrollo físico y funcional de roedores desde el nacimiento hasta el destete. Los diferentes parámetros que se describen a continuación, se refieren al desarrollo físico, sensorial, motor y de comportamiento, en la rata. Cada uno de los parámetros descritos, aparecen normalmente en la rata en un margen de edad concreto, por lo que varía el momento de su observación.

Palabras clave: Desarrollo físico, desarrollo sensorial y motor, comportamiento, ratas recién nacidas.

Abstract

Evaluation of the physical and functional development in recently born rats for their use in perinatal and postnatal study

The three studies design that they embrace of direct or indirect form all the stage of the reproduction process, is considered that it is the most appropriate for the evaluation of most medicinal products and vaccine. They should be kept in mind all the pharmacological, kinetic data, and toxicologies to decide which of the studies they will be carried out. The most probable option is the studies combination of, fertility and the early embryonic development, prenatal and postnatal development including the reproductive function and the embriofetal development. The study of prenatal and postnatal effects on the development which is of the one that concerns us to speak, in this article detects the toxic effects in the female during the pregnancy and the lactation and that taken place in the breedings by the exhibition of the mothers from the implantation until the wean. This study is carried out at one species, preferably the rat. These procedures are applied to determine the effects on the breedings of the treatments given to their parents. In the same one is detailed a methodology to evaluate the physical and functional development of rodents from the birth until the wean. The different parameters that are described in this work, it refers to the physical development, sensorial and motor development and the behavior, in rat. Each one of the described parameters, usually appears in rat at a concrete age margin, for what varies the observation moment.

Key words: Physical development, sensorial and motor development, behavior, recently born rats.

Introducción

El diseño de tres estudios que abarcan de forma directa o indirecta todos los estadios del proceso de la reproducción, se considera que es el más adecuado para la evaluación de la mayoría de los productos medicinales y vacunas.¹ Se deben tener en cuenta todos los datos farmacológicos, cinéticos, y toxicológicos para decidir cuáles de los estudios se realizarán. La opción más probable es la combinación de estudios sobre: ²

- La fertilidad y el desarrollo embrionario temprano.
- El desarrollo pre y postnatal incluyendo la función reproductiva.
- El desarrollo embriofetal.

El estudio de fertilidad evidencia los efectos tóxicos que se producen como resultado del tratamiento desde antes del apareo, durante el apareo y hasta la implantación. Detecta efectos sobre el ciclo estral, la implantación y el desarrollo en los estadios preimplantacionales del embrión. En el macho permite evaluar efectos funcionales sobre la libido y la maduración epididimal.³

Por su parte el estudio de los efectos sobre el desarrollo pre y postnatal el cual en este artículo es del que nos compete hablar, detecta los efectos tóxicos en la hembra durante la preñez y la lactancia y aquellos producidos en las crías por la exposición de las madres desde la implantación hasta el destete. Este y el anterior estudio se realizan al menos en una especie, preferiblemente la rata.⁴

El estudio de los efectos sobre el desarrollo embriofetal detecta efectos adversos en la hembra preñada y el desarrollo embriofetal, debido a la exposición de las madres desde la implantación hasta el cierre del paladar duro. Debe hacerse en dos especies: un roedor, preferiblemente la rata, y un no roedor, preferiblemente el conejo.⁵

Existen procedimientos los cuales se aplican en cualquier estudio para determinar los efectos sobre las crías de los tratamientos dados a sus padres. Por lo general se plantea que las camadas no deben ser reducidas a menos que se especifique en un protocolo experimental particular. Aunque parece existir una fuerte relación entre tamaño de la camada y media del peso del cuerpo de los neonatos, esta relación es determinable, mientras la reducción puede producir efectos no determinables.⁴

Los diferentes parámetros que se describen a continuación, se refieren al desarrollo físico, sensorial, motor y de comportamiento, en la rata. Cada uno de los parámetros descritos, aparece normalmente en la rata en un margen de edad concreto, por lo que varía el momento de su observación.³

Este procedimiento detalla una metodología para evaluar el desarrollo físico y funcional de roedores desde el nacimiento hasta el destete.

Desarrollo

Para este tipo de estudio se tienen en cuenta dos diseños, en el primero por lo general los investigadores seleccionan al azar un macho y una hembra de cada camada, por cada hembra parida de las 20 hembras que con anterioridad formo los grupos en el diseño experimental del estudio durante el apareo y la preñez, otros hacen una reducción de camada, teniendo en cuenta que la rata paré alrededor de 12-16 crías, toman 8 crías de cada camada seleccionadas al azar, las cuales serán las analizadas. Luego en ambas variantes se procede a marcarlos para permitir su futura identificación. Las crías seleccionadas serán usadas para todos los estadios de evaluación a menos que ocurra la muerte, en cuyo caso se seleccionara una cría de reemplazamiento de la misma camada. El desarrollo de las crías debe ser evaluado los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21, considerando como día 0 el día de su nacimiento. La presencia o ausencia de todos los signos descritos a continuación, excepto la actividad exploratoria y la marcha, debe ser determinada en cada una de estos días. La actividad exploratoria y la marcha deben ser determinadas el día 22 solamente.³

La mayoría de las medidas del desarrollo son subjetivas por lo que el criterio para la evaluación ha de ser tan preciso como sea posible. Cuando se requiera más de un observador para un estudio en particular, es importante que los diferentes observadores aseguren que sus evaluaciones tienen una base común, antes de trabajar individualmente.⁴ Cuando no se evalúe un signo particular, se debe dibujar una línea diagonal a través de la casilla de entrada de datos de que se trate. Esto debe ocurrir sólo cuando el desarrollo físico del neonato no ha alcanzado un estadio donde sea posible evaluar el signo. Por ejemplo, si los ojos no se han abierto, entonces el reflejo corneal no puede ser evaluado.

Parámetros del desarrollo.

Desarrollo físico.

A continuación explicaremos como se deben medir algunos de estos parámetros, sobre todos aquellos más difíciles de determinar por estar expuestos a un rango de mayor error.

- Vibrisas. Registrar la presencia o ausencia de vibrisas como (+) o (-).
- Oreja. Registrar la ausencia de cualquier desarrollo de la oreja como (-). Registrar ambas orejas no plegadas como "U". Separación completa de la oreja de la cabeza y su grado de elevación debe ser registrado como "1/4", "1/2", "3/4", etc, este es analizado el día 7 de nacido cuando se verifique la abertura de los orejas.⁶
- Apertura de los ojos. El ojo izquierdo abierto debe ser reportado como "I" y el ojo derecho abierto como "D", este parámetro debe ser analizado el día 14 de nacido.
- Crecimiento del pelo. El crecimiento del pelo debe ser graduado en una escala de uno a siete, como se detalla a continuación: ⁷
 - 1- Primeros signos de crecimiento los cuales pueden no ser inmediatamente aparentes.
 - 2- Pelo corto dorsalmente, aparente como una coloración ligera blanca pero sin crecimiento ventral.
 - 3- Pronunciado color blanco dorsalmente, sin crecimiento ventral.
 - 4- Engruesada la cubierta blanca dorsalmente, comienzo de crecimiento ventral.
 - 5- Gruesa cubierta blanca dorsal, crecimiento ventral, comienzo de crecimiento sobre las patas.
 - 6- Completa cubierta de pelo, no totalmente desarrollado.
 - 7- Cubierta de pelo totalmente desarrollada.
- Crecimiento de las uñas. Registrar la presencia (+) o ausencia (-) de uñas endurecidas en las patas traseras.
- Erupción de los dientes (incisivos). Registrar la erupción de los dientes como (+).
- Observaciones anormales. Todos los signos anormales o inusuales observados en el comportamiento o las condiciones físicas tienen que ser anotados. (Ver Tabla 1)

Respuesta auditiva.

Para observar la respuesta auditiva se han de examinar las crías una por una en una habitación diferente a la del alojamiento para evitar que el resto de los animales de la misma camada o de las restantes camadas se habitúen al sonido que se utiliza para la prueba. Como fuente de sonido puede usarse una "rama metálica", o bien aparatos de ultrasonidos, etc. Se coloca al animal de forma que la oreja quede enfocada hacia la fuente de sonido. Se efectúa un sonido breve y se observa la respuesta del animal. Se considera que la prueba es positiva al apreciarse un movimiento ó un pequeño salto en el animal. Registrar la respuesta como presente (+) o ausente (-). La cría no debe ser sujeta durante este proceso.⁸⁻⁹

Respuesta visual.

Se examinan las crías individualmente. Se coge la cría por la cola y con la cabeza dirigida hacia abajo, se avanza despacio hacia un objeto. Se considera que la prueba es positiva cuando las patas delanteras alcanzan el objeto antes que el animal lo toque con la cara.^{10, 11}

Reflejo pupilar.

Se examinan las crías individualmente. Se realiza con un rayo de luz poco intenso, en una habitación a oscuras. Se acerca el foco de luz al ojo del animal y con la ayuda de una lupa, se observa la contracción pupilar. Se examinan ambos ojos de cada animal.¹⁰⁻¹²

Reflejo corneal.

Se examinarán las crías individualmente. Con un hilo rígido (seda o nylon) se toca brevemente con suavidad la córnea del animal, observando si se da alguna respuesta (parpadeo, movimiento de la cabeza). Se examinarán ambos ojos. Si el reflejo esta presente la cría parpadeara rápidamente. Registrar el reflejo como (+) o (-).¹³

Reflejo parpebral.

Se examinarán las crías individualmente. Con un hilo rígido (seda, nylon). Se tocan brevemente y con suavidad los párpados del animal, observando si se da alguna respuesta (parpadeo, movimiento de la cabeza). Se examinarán ambos ojos.^{11, 14} Registrar el reflejo como (+) o (-).

Reflejo ipsilateral flexor.

Pinchar la almohadilla de un dedo trasero con pinzas y liberarlo rápidamente. Si el reflejo está presente la pata trasera rápidamente se doblará hacia la rodilla. Registrar el reflejo (+) o (-).¹⁵

(Ver Tabla 2)

Desarrollo motor.

Reflejos posturales.

Se examinarán individualmente todas las crías de una camada.

Enderezamiento en superficie.

A cada una de las crías se le permiten 2 intentos de un máximo de 15 segundos para enderezarse por completo, estando de espaldas sobre una superficie llana. El enderezamiento antes de 3 segundos se considera como signo de madurez de este reflejo.¹⁶

Enderezamiento en el aire.

Se lanza el animal en posición horizontal de espaldas al suelo, hacia una superficie acolchonada situada aproximadamente a una distancia de 30 cm. El criterio de madurez del reflejo de enderezamiento en el aire es el siguiente: de 3 intentos, el animal debe caer un mínimo de 2 veces sobre las 4 patas.¹⁷

Geotaxis negativa.

Se mide la tendencia del animal a girar la cara y la cabeza hacia arriba cuando, cogido por la cola por el experimentador, se avanza boca abajo hacia una superficie.

Desarrollo locomotor.

Los 3 estadios de madurez del patrón locomotor pueden definirse de la siguiente forma:

1. Pivotamiento: Se observan movimientos espontáneos de las patas delanteras (sin separación de los dígitos). Las patas posteriores no siguen estos movimientos de una forma coordinada y las patas delanteras producen una locomoción circular llamada pivotamiento. Frecuentemente este tipo de movimiento aparece hacia el final de la primera semana de vida. Puede observarse de dos formas: o bien la cabeza se mueve hacia un brazo, donde se apoya y subsiguientemente, el brazo se desplaza en el sentido del giro del cuerpo, o bien, finalmente puede apreciarse otro movimiento de giro proporcionado por un impulso del brazo opuesto.¹⁸

2. Arrastramiento: Se inicia normalmente hacia el octavo día de vida. El animal separa los dedos de las extremidades anteriores durante el movimiento. En ocasiones se da todavía pivotamiento, si las extremidades posteriores permanecen pasivas. Sin embargo, pueden proporcionar una propulsión, aunque con movimientos incoordinados, de lo que resulta el arrastramiento. Si estos movimientos lentos de las patas traseras no siguen a las delanteras, las primeras pueden ser arrastradas en una posición extendida. Sobre los días 10-11 de edad aparece el control individualizado de los dedos posteriores, lo que favorece la tracción. Aquí empieza la locomoción cuadrúpeda con el tronco elevado, aunque las patas traseras todavía no siguen durante mucho tiempo a las delanteras y acaban siendo arrastradas en posiciones extravagantes.¹⁹

3. Andar coordinado: Hacia los días 12-13 de edad el estilo de locomoción predominante es con el tronco elevado sobre las 4 patas. Se produce un andar coordinado en esta posición, a pesar de que en ocasiones fallan las patas traseras, al abrir los ojos (día 14-15) el animal camina de forma normal, elevando quizás de forma exagerada las patas traseras. A partir de aquí la locomoción mejora. El método empleado para examinar el desarrollo locomotor de las crías es el siguiente: Las crías se emplazan individualmente en el centro de un campo abierto construido con metacrilato, con una base de 45 x 60 cm. El suelo se halla marcado con cuadrados de 15 cm de lado. Las crías se examinan individualmente, durante un período de 1 ó 2 minutos. Se monitoriza visualmente lo siguiente: ²⁰

- a) Estudio del desarrollo locomotor, pivota (P), se arrastra (A), o anda coordinadamente (C).
- b) La máxima distancia recorrida desde el centro del campo.
- c) El número de entradas a los cuadrados centrales ó adyacentes a las paredes. Se considera una entrada cuando el animal ha pasado las dos patas delanteras dentro de un cuadro diferente al de su posición original (inicial).

Actividad locomotora.

Se examinan las crías individualmente. Se coloca una cría en el campo abierto registrando el número de veces que se producen las siguientes observaciones, en una sesión de 5 minutos: ²¹

- Entrar en un cuadro con ambas patas delanteras.
- Defecar u orinar.

- Elevarse.

En ocasiones puede ser preciso ampliar el tipo de observaciones, añadiendo las veces que el animal se queda quieto, en señal de atención, las veces que se asea o que olfatea.

Desarrollo del comportamiento en campo abierto.

En un campo abierto como el descrito con anterioridad se realiza la siguiente prueba a fin de examinar la sociabilidad y el hacinamiento de las crías. Dicha prueba se realiza normalmente entre 4-14 días de edad de las crías.²²

Se dispersa a todas las crías de una camada a la vez, en el campo abierto, equidistante del centro y entre ellos. Transcurridos 3 minutos se mide lo siguiente: ²³

1. No. de grupos de 2 ó más crías que se tocan entre sí.
2. No. de crías aisladas.
3. No. de cuadros ocupados por todos ellos.

(Ver Tabla 3)

Análisis de datos.

Para cada día desde el nacimiento, las diferencias significativas ($p < 0.05$) en la frecuencia de ocurrencia de un signo entre todos los grupos de tratamiento debe ser determinada usando la prueba de homogeneidad de (χ^2) . Los datos de los machos y las hembras deben ser analizados separadamente.^{15, 19}

Las diferencias entre los grupos de tratamiento deben ser analizadas para buscar significado estadístico ($p < 0.05$) usando el análisis de varianza (ANOVA) de cumplir con los supuestos de distribución normal (Kolmogorov Smirnov) y de homogeneidad de varianza según la prueba de Levene. En casos de no cumplir con tales supuestos puede utilizar la prueba de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los datos de los machos y hembras deben ser analizados separadamente.^{15, 19}

Tabla 1. Parámetros más importantes del desarrollo físico.

Parámetros más importantes del desarrollo físico	Edad (días de nacido) de la observación
Separación del pabellón de la oreja	2-4 (X=4)
Crecimiento del pelo	4-7 (X=7)
Erupción de los incisivos	7-12 (X=12)
Abertura de las orejas	17
Separación de los párpados	15
Descenso de los testículos	21-25 (X=25)
Abertura de la vagina	30-37 (X=37)

X=día más reportado o utilizado para medir este parámetro.

Tabla 2. Parámetros del desarrollo sensorial.

Parámetros del desarrollo sensorial	Margen de días de observación (días de nacido)
Respuesta auditiva	10-21 (X=17)
Respuesta visual	14-25 (X=17)
Reflejo pupilar	14-25 (X=21)
Reflejo corneal	14-25 (X=20)
Reflejo parpebral	14-25 (X=20)
Reflejo ipsilateral flexor	14-25

X=día más reportado o utilizado para medir este parámetro.

Tabla 3. Parámetros del desarrollo motor.

Parámetros del desarrollo motor	Margen de días de observación (días de nacido)
Enderezamiento en superficie	1-10 (X=4)
Enderezamiento en el aire	14-21 (X=14)
Geotaxis negativa	10
Desarrollo locomotor	4-7-10-14
Actividad locomotora	desde el día 21
Desarrollo del comportamiento en campo abierto	4-7-10-14

X=día más reportado o utilizado para medir este parámetro.

Referencias Bibliográficas

1. Simister N.E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21:3365-3369.
2. Gruber M.F. Maternal immunization: US FDA regulatory considerations. *Vaccine* 2003; 21:3487-3491.
3. Barrow P.C. Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. *Toxicol* 2003; 185:205-212.
4. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002; 21:471-495.
5. Verdier F, Barrow P.C, Burge J. Reproductive toxicity testing of vaccines. *Toxicology* 2003;185:213-219.
6. Alemán C.L, Más R, Rodeiro I, Noa M. Reference database of the main physiological parameters in *Sprague Dawley* rats from 6 to 32 months. *Lab Animals* 1998; 32:457-466.
7. Anderson C.A, Clark R.L. External genitalia of the rat: normal development and the histogenesis of 5 alpha-reductase inhibitor-induced abnormalities. *Teratology* 1990; 42(5):483-496.
8. Haschek W.M, Rousseaux C.G, Wallig M.A. *Handbook of toxicologic pathology* (2nd ed). San Diego, CA: Academic Press; 2002.p.342-343.
9. EPA. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3800. Reproduction and Fertility Effects. United States Environmental Protection Agency 712-C-98-208; 1998.p.3-6.
10. Plaza J.A, López M.F, Gutiérrez A, Masmudi M, López J.F, Navarro I. La proteína RGS14 multiplica la memoria visual de las ratas. *Science* 2009; 325: 87-89.
11. Rojas L.M, Suárez S.M, Lemus M. Estrés oxidativo como posible causante de retinopatía en ratas en desarrollo sometidas a hiperoxia. *Revista de Ciencia y Tecnología de América* 2004; 29(10):556-561.
12. Henck J.W, Craft W.R, Black A, Colgin J, Anderson J.A. Pre- and postnatal toxicity of the HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin in rats. *Toxicological Sciences* 1998; 41:88-99.
13. Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 2002; 19:43-55.

14. Landsdown A.B. Perspectives-The evaluation of reproductive toxicity and teratogenicity. Evaluation of reproductive toxicity and teratogenicity. Experimental Toxicology, 2d edition; 1993.p.456-458.
15. Piegorsch W.W, Haseman J.K. Statistical methods for analyzing developmental toxicity data. Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis 1991; 11:115-133.
16. Rodríguez M.D, Gámez R, González J, García H, Acosta P, Goicochea E. Lack of Developmental Toxicity of D-003: a Mixture of Long-chain Fatty Acids in Rats. Food and Chemical Toxicol 2003; 41: 89-93.
17. Rodríguez M.D, Gonzalez J.E, Aleman C. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of the D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats and rabbits. Food Chem Toxicol 2004; 42(12):1977-1985.
18. Rodríguez M.D, González J.E, León F, Gutiérrez A. Perinatal and postnatal study of D-003, a mixture of long-chain fatty acids, in rats. J. Med. Food 2006; 9:223-230.
19. Wier P.J, Ventre J.R. Statistical analyses of reproductive and developmental toxicology studies. Drug Information Journal 1990; 24:395-405.
20. Mark D.J, Semler D.E, Shayne C.G. Animal Models in toxicology. Chapter 3, The Rat. Toxicology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p.180-183.
21. OECD. Guidelines for testing of chemicals. 416 regulation number, two-generation reproduction toxicity study animal test; 2001.p.3-4.
22. Repetto M. Toxicología Fundamental. Toxicología Experimental. Estudio de comportamiento animal. Tercera Edición. Editado por ENPSES-MERCIE GROUP, España; 2002.p.300-303.
23. Cavagnaro J.A. Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals, John Wiley & Sons Editor, New Jersey; 2008.p.56-58.

Recibido: 06/10/09

Aceptado: 07/10/09