

Procedimiento post mortem para evaluar el segmento III en estudios de toxicología de la reproducción (teratología de ratas).

Tamara Hernández Salazar^{*}, Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*}, Yulieé

López Feria^{*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{}**

Instituciones:

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

^{**}Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

Correspondencia a: Tamara Hernández Salazar.

Email: thernandez@finlay.edu.cu

Resumen

El objetivo de este trabajo fue describir los métodos y técnicas para sacrificar las madres y evaluar el posible efecto tóxico sobre los fetos. Tuvimos en cuenta los locales, personal requerido, condiciones previas, equipamiento, procedimiento de disección, variables analizadas, sexado de los fetos, peso de los fetos, técnica para la tinción con alizarina de los fetos de rata y evaluación de los fetos de rata fijados en Bouin. Pensamos que este trabajo sea útil para los lectores de la revista así como para la comunidad científica en general.

Palabras claves: Segmento III, toxicología de la reproducción, teratología, ratas.

Abstract

Post mortem procedure to evaluate the III segment in reproduction toxicology study (rats teratology).

The aim of this work was to describe the methods and technical for sacrifice the mothers and to evaluate the possible toxic effect on the fetuses. We kept in mind the local, required personnel, previous condition, equipment, dissection procedure, variables analyzed, sexing of the fetuses, fetuses weight, technique for the tint with alizarin of the rat fetuses and evaluation of the rat fetuses fixed in Bouin. We think that this work is useful for the journal readers as well as for the scientific community in general.

Key words: III segment, reproduction toxicology, teratology, rats.

Introducción

El nacimiento de miles de niños con focomelia como consecuencia del consumo por parte de sus madres de un sedante que había mostrado ser muy poco tóxico para el adulto, llevó a la inclusión de los estudios de teratogenicidad como parte de las pruebas de inocuidad requeridas para la aprobación de nuevos medicamentos, aditivos alimenticios o plaguicidas.¹⁻³

En la actualidad se utilizan protocolos experimentales estandarizados que se consideran evaluaciones aceptables y sólidas del desarrollo embrio-fetal. Con ellos es posible evaluar el efecto de una sustancia dada sobre prácticamente todas las fases del proceso reproductivo.⁴

Sin embargo, el gran número de sustancias químicas que deben ser evaluadas con estos métodos han llevado al desarrollo de sistemas in vitro que podrían utilizarse para establecer prioridades en las pruebas con animales, pero aún así estos sistemas no han podido reemplazar las pruebas en animales, siendo aún necesarios estos ensayos in vivo los cuales manifiestan con mayor veracidad el efecto teratogénico o no de un producto a evaluar.⁵

El objetivo de este trabajo fue describir los métodos y técnicas para sacrificar las madres y evaluar el posible efecto tóxico sobre los fetos. Tuvimos en cuenta los locales, personal requerido, condiciones previas, equipamiento, procedimiento de disección, variables analizadas, sexado de los fetos, peso de los fetos, técnica para la tinción con alizarina de los fetos de rata y evaluación de los fetos de rata fijados en Bouin. Pensamos que este trabajo sea útil para los lectores de la revista así como para la comunidad científica en general.

Desarrollo

Describir los métodos y técnicas a seguir para sacrificar las madres y evaluar el posible efecto tóxico sobre los fetos.

Locales: Antes de que los animales sean apareados el investigador principal tiene que asegurar que los locales estarán disponibles en las fechas requeridas. En el caso de la rata los postmortem serán normalmente realizados el día 20 del período de gestación a menos que se indique otra cosa en el protocolo.⁶

Personal requerido: Cada equipo consistirá normalmente de dos personas: un teratólogo experimentado encargado de la disección y un asistente para buscar los animales y pesar, sexar y colocar los fetos en el fijador.

Condiciones previas:

Toda la documentación, frascos para especímenes y equipamiento, necesarios para un día de trabajo, deben estar listos e instalados en el local de autopsia antes de que sean introducidos los animales. Cada animal tiene que tener preparado un modelo de teratología materna donde indique todas las variables que serán analizadas así como las observaciones pertinentes.⁷ Debe llenarse la siguiente información: Código del estudio, grupo de tratamiento y número del animal. Preparar frascos para especímenes, para cada animal:

<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

- Para las preparaciones con alizarina; un frasco de cristal de 250 ml, a medio llenar con alcohol al 95%.
- Para la preparación de las secciones de Wilson; un frasco de cristal de 250 ml, a medio llenar con líquido de Bouin.

Equipamiento:

- Instrumentos de disección: Tijeras pequeñas, pinzas pequeñas (punta curva y punta recta), tijeras grandes, pinzas grandes.
- Equipos: Balanza (precisión: dos lugares decimales), microscopio de disección.
- Soluciones: Líquido de Bouin, Alcohol 95 %
- Otros: Cámara letal para asfixia por éter, placas petri, dos bandejas plásticas esponja y jabón líquido o detergente, papel absorbente desechable, bolsas para los cadáveres y desechos, etiquetas adhesivas.

Procedimiento de disección: Antes de comenzar se tomará el peso del cuerpo de los animales que serán sacrificados. Los animales para sacrificar serán transportados al local en sus jaulas, en carro transportador. La primera jaula se cogerá del carro y se llevará a un área separada de sacrificio. En el área de sacrificio, debe encontrarse dos etiquetas para frascos. El número del animal según identificación en la jaula será reflejado en el modelo y las etiquetas, además se anotará la fecha del sacrificio.

El asistente debe comprobar que el número individual del animal coincida con el número anotado en el modelo, la ficha de la jaula y las etiquetas de los frascos. La rata será sacrificada por asfixia con éter y llevada a la mesa de disección, acompañada del modelo correspondiente.⁸ Dos bandejas plásticas o tablas de corcho se cubrirán con papel absorbente y se marcarán una "Izquierdo" y la otra "Derecho", listas para recibir los fetos de los respectivos cuernos del útero. La rata debe colocarse sobre su lomo en la tabla de disección y la superficie ventral se humedecerá con agua usando una esponja, observar la figura 1.

La piel por encima del perineo será levantada ligeramente y se hará un corte usando la tijera más grande y curva. Usando la punta de las tijeras y comenzando en el corte, la piel se cortará en la línea media hasta el esternón punto (2).⁸ La pared peritoneal se sujetará con las pinzas dentadas y se cortará encima del perineo. De nuevo usando las tijeras grandes se hará

una incisión en la línea media hasta el esternón punto (2). Dos incisiones más en la pared peritoneal, como se muestra en el diagrama de abajo, completarán la abertura de la cavidad abdominal puntos (3 y 4)

Variables analizadas: Las vísceras maternas serán examinadas macroscópicamente y se registrarán las observaciones principales. Los ovarios serán extraídos y colocados en un recipiente previamente marcado. Los cuerpos lúteos (CL) serán contados inmediatamente bajo el microscopio de disección y su número registrado en el modelo.⁹

El útero grávido será extraído con cuidado de no confundir los cuernos derecho e izquierdo. Usando una pinza y una tijera pequeñas se abrirá el cuerno uterino izquierdo desde el extremo ovárico hasta la vagina a lo largo del lado opuesto a los sitios de implantación, exponiendo los sacos amnióticos. Debe tenerse cuidado de no dañar los fetos durante esta operación.¹⁰

Se abrirán los sacos amnióticos y de nuevo comenzando desde el extremo ovárico y trabajando hacia la vagina, los implantes (IMP) deben ser examinados y clasificados como: ¹¹

- Vivos (FV),
- Recientemente muertos, muerte fetal (FM), fetos completamente formados pero más pálidos que los normales,
- Muerte tardía o reabsorción tardía (RTA), en la cual la organogénesis ha ocurrido así que el embrión es visible pero el desarrollo no ha progresado al estadio fetal,
- Muerte temprana o reabsorción temprana (RTE), cuando la muerte ha ocurrido poco después de la implantación así que no es visible el embrión, el implante es un área de tejido placentar degenerado.

Los resultados de las evaluaciones tienen que ser registrados en el modelo usando las iniciales adecuadas para denotar un feto vivo y las muertes fetales, tardías o tempranas.

Tiene que ser registrado el número total de cada categoría de implante y sitios de implantación.

Luego corte el cordón umbilical de cada feto y colóquelo en la bandeja plástica en el orden que tenían en el cuerno uterino correspondiente. Hay que poner el número de identificación materna en cada bandeja.

Los fetos deben ser cuidadosamente examinados en busca de anormalidades morfológicas.

Debe hacerse un examen externo de cabeza a cola con particular referencia a aquellas anormalidades las cuales son más difíciles de detectar post fijación, ej. micrognatia, macroglosia, torsión de miembros, artrogriposis.¹² Si existe duda en la naturaleza de una anomalía debe consultarse a un especialista experimentado.

Bajo un microscopio de disección se examinarán los labios y el paladar abriendo la boca suavemente con las pinzas, a fin de revisar si estas estructuras están hendidas. Examinar la forma de la cabeza de perfil. Examinar la forma y tamaño de los ojos (cerrados), orejas, maxilares, hocico.

Las malformaciones externas del tronco son fáciles de determinar. Ellas incluyen: cranioraquisquisis, gastrosquisis, hernia umbilical, espina bífida, etc.

Los miembros se examinarán respecto a la forma, tamaño y posición y los dígitos en cuanto a su número y profundidad de los surcos digitales. Ejemplos de anomalías son: polidactilia (dígitos extra), ectrodactilia (dígitos ausentes) y sindactilia (dígitos fusionados).⁹

La cola se examinará fijándose en la presencia, tamaño, forma, y posición. Una cola normal es ligeramente curva y de 3 cm de largo en la rata.

Cualquier anomalía encontrada debe ser anotada, antes de que los fetos sean colocados en la bandeja.

Si se considera necesario preservar un feto muerto, éste debe ser colocado inmediatamente en un frasco para espécimen separado, marcado con el número del animal, la fecha y el código del estudio. El hecho de la preservación debe ser anotado en algún modelo.

La madre, el útero abierto y los otros desechos deberán ser colocadas en bolsas y se amarrará el cuello de la bolsa. La mesa de disección debe limpiarse para antes de comenzar con la próxima rata.

Sexado de los fetos:

Examinar la distancia entre la papila genital y la base de la cola. En los machos esta distancia es mayor que en las hembras.

La balanza debe haber sido chequeada para su exactitud. Las bandejas de fetos deben ser llevadas al banco de peso por el asistente, junto con el modelo y las etiquetas de los frascos. Las etiquetas deben ser pegadas a los frascos los cuales deben estar listos para recibir los fetos. Cada feto debe ser secado sobre el papel absorbente que cubre la bandeja, pesado a dos lugares decimales, y el peso registrado en el modelo. El cero de la balanza debe ser chequeado después de cada pesada y corregido si fuera necesario usando el dispositivo de tara dado el peso tan bajo. Los fetos de ambos cuernos derecho e izquierdo deben ser pesados antes de fijar los fetos.

- Fotografía.

Los fetos con malformaciones externas deben ser fotografiados, si existiesen las condiciones, al concluir el examen externo, antes de ser fijados como constancia del hallazgo encontrado.

- Fijación.

La mitad de los fetos vivos de cada camada son seleccionados al azar para examen visceral en fresco o son preservados en líquido de Bouin, según lo indique el Protocolo. Se registrará el dato de cuales fetos se fijarán en alcohol (A) y cuales en Bouin (B). Si en el examen postmortem se encuentra un feto con una anomalía que sería mejor investigar después de preservado en alcohol que en Bouin, o viceversa, ese feto debe ir al fijador apropiado. Los fetos seleccionados deben ser colocados en el frasco de Bouin. ⁹

La mitad restante debe ser colocada en el frasco de espécimen que contiene alcohol etílico 95 %. A estos fetos se les puede practicar un pequeño corte en la zona ventral, extrayéndoles parte de las vísceras abdominales (hígado e intestinos).

Tinción de alizarina para fetos de rata.

Este procedimiento describe el tratamiento que se dará a los fetos de rata para poder llevar a cabo el examen del esqueleto, los requerimientos para la preparación de la tinción lo podemos observar en la tabla 1. ¹⁴

Soluciones:

Las soluciones deben prepararse en lotes de 5 litros en un frasco que permita la mezcla apropiada.

A Solución al 1% de Hidróxido de Potasio (KOH).

Precaución: Esta solución es caústica. Cuando se manipule o prepare deben usarse ropas protectoras, guantes y espejuelos de seguridad. Cualquier contaminación de la piel debe ser lavada inmediatamente.

- Pesar 50 g de KOH con + 1g de precisión.
- Colocar 1L de agua destilada en el frasco, y añadir el KOH.
- Cuando el sólido se haya disuelto, agregar los restantes 4L de agua destilada y mezclar.
- Transferir la solución preparada a un dispensador etiquetado.

B. Rojo Alizarina S.

- Colocar 1 litro de agua destilada en un frasco.
- Añadir 0.5 g de rojo alizarina S y agitar vigorosamente para dispersar el material.
- Añadir 50 g de KOH y agitar.
- Completar con 4 litros de agua destilada y agitar.
- Antes de usar, filtrar la solución en un frasco limpio y descartar el sedimento.

C. Solución de aclaramiento.

- Colocar 1 litro de agua destilada en un frasco y añadir 10 g de hidróxido de potasio y agitar
- Añadir otros 4 litros de agua destilada y agitar.

Añadir 1 litro de glicerina y agitar.

Pasos a seguir

El régimen de procesamiento debe ser flexible, de acuerdo a la experiencia. El que aquí se da se refiere a fetos de rata que no han sido eviscerados ni despellejados. Si se realizan estas operaciones, se pueden disminuir los tiempos de los diferentes pasos.

Deshidratación

- La deshidratación toma un mínimo de una semana en alcohol al 95 %. Los fetos deshidratados están rígidos y de color beige pálido.
- El alcohol tiene que ser cambiado al menos una vez durante la fijación. Cambiar los frascos uno a uno.
- Recipiente de desechos.
- Añadir alcohol fresco, suficiente para cubrir los fetos.

- Durante el procedimiento, comprobar el número del animal en el frasco.

Maceración

- Este paso toma aproximadamente 1-3 días en la rata.
- La maceración es completa cuando los huesos de los fetos se muestran claramente a través del tejido blando.
- Escurrir el alcohol usando el colador y el embudo, y añadir KOH al 1%.
- Si es necesario, cambiar el KOH diariamente, de nuevo usando colador y embudo. Es importante tratar el tejido ablandado muy suavemente.

Tinción

- Este paso debe ser combinado con las últimas etapas de la maceración y toma aproximadamente 24 horas.
- Añadir la solución de rojo alizarina a cada uno de los frascos.
- Examinar los frascos regularmente para chequear la intensidad del color. La coloración es completa cuando los huesos son obvios. Debe evitarse la sobretinción.

Aclaramiento

- Botar el KOH y el colorante escurriendo los fetos adecuadamente.
- Añadir la solución de aclaramiento. Los fetos inicialmente flotarán en esta mezcla, pero después se hundirán por su propio peso.
- Si es necesario la solución de aclaramiento será cambiada.

Almacenaje

- Escurrir la solución de aclaramiento y transferir los fetos a una solución a partes iguales de glicerina y agua destilada.
- Si se quieren conservar los fetos se debe aumentar paulatinamente la cantidad de glicerina disminuyendo la de agua destilada.
- Después de 5 años, los especímenes pueden ser destruidos.

***Evaluación de los fetos de rata fijados en Bouin.*¹⁵**

Este procedimiento describe el examen visceral microscópico de fetos de rata obtenidos el día 20 de la gestación, con referencia a especímenes estándar.

Materiales, instrumentos y equipos

Microscopio estereo binocular, cajas Petri plásticas de 3", cuchillas de afeitar, pinzas curvas de 3", alcohol 70%, tabla de corcho, papel absorbente y etiquetas adhesivas.

Evaluación¹⁶

1. Seleccionar un frasco conteniendo fetos para ser examinados.
2. Localizar el correspondiente modelo post mortem de la camada.
3. Comprobar que coinciden el número anotado de fetos y el número de los fetos en el frasco.
4. Pasar los fetos del frasco a un recipiente con alcohol 70% a fin de "lavarlos".
5. Colocar los fetos sobre papel absorbente en la tabla de corcho.
6. Escribir una etiqueta adhesiva identificada para cada feto, conteniendo todos los datos necesarios para su identificación.
7. Seleccionar un feto y secarlo con el papel.
8. Usando tijeras, cortar la cola y los miembros, separándolos del cuerpo.
9. Cortar el tope de la cabeza usando una cuchilla interpuesta entre los maxilares y debajo de las orejas.
10. Comenzando por la parte de atrás de la cabeza hacer cortes transversales en secuencia, a un intervalo máximo de 1mm. Debe ser tomado particular cuidado para asegurar que sean seccionados el tallo del cerebro, los ventrículos laterales, los ojos y la nariz.
11. Colocar las secciones de la cabeza en secuencia a lo largo del margen de la caja Petri.
12. Seccionar el cuerpo del feto desde el cuello hasta el final del hígado y colocar las secciones en secuencia en la caja Petri. Las secciones a través del tórax tienen que ser tan delgadas como sea posible para mostrar la disposición de los vasos y la estructura interna del corazón.
13. Ambos riñones tienen que ser seccionados transversalmente por la mitad. Colocar una etiqueta de identificación sobre la caja Petri.
14. Examinar las gónadas y vejiga *in situ* en el piso de la cavidad abdominal y determinar el sexo de los fetos.

15. Repetir del paso 7 al 14 para cada feto de la camada.
16. Colocar la primera caja Petri sobre el microscopio y ajustar la iluminación para dar luz reflejada.
17. Examinar las secciones a una magnificación x4 a x10.
18. Poner particular atención a las secciones a través de la cabeza en la región de los ventrículos laterales y la médula, los órganos torácicos, los riñones y los uréteres. Registrar todas las observaciones.
19. Repetir el examen microscópico para todos los fetos de la camada

Figura 1. Proceso de disección.

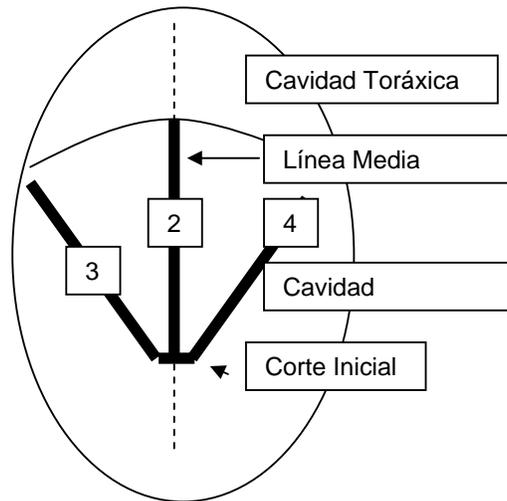


Tabla 1. Requerimientos.

Reactivos	Cantidades (rata)
Alcohol etílico 95 %	25 L
Glicerina	25 L
Hidróxido de potasio	750 g
Rojo alizarina S	2.5g

Referencias

1. Barlow SM, Greig JB, Bridgesc JW, Carered A. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food and Chemical Tpxicology 2002; 40:145-191.
2. Collins TF, Sprando RL, Shackelford ME, Hansen DK. Food and Drug Administrattion Proposed Testing Guidelines for Developmental Toxicity Studies. Regulatory Toxicology and Pharmacology 1999; 30:39-44.
3. Uso de medicamentos durante o embarazo. Boletín de Farmacoterapéutica da Área de A Coruña 2000; 1:1-6.
4. Szekeres J. Immunological relationship between the mother and the fetus. Int Rev Immunol 2002; 21:471-495.
5. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. Vaccine 2003; 21:3365-3369.
6. Verdier F, Barrow PC, Burge J. Reproductive toxicity testing of vaccines. Toxicology 2003; 185:213-219.
7. FDA, CBER. Guidance for industry. Considerations for reproductive toxicity studies for preventive vaccines for infectious disease indications; 2000.p.21-22.
8. Friman M, González S, Fraga J, Domínguez Y, Oquendo D, Pérez C. Evaluación de la toxicidad embrionaria y fetal de la vacuna antileptospirosica vax-spiral. Anuario Toxicología 2001; 1(1):30-34.
9. Arencibia DF, Rosario LA, López Y, Infante JF, Fariñas M, Díaz D. Algunas consideraciones sobre el uso de modelos animal en el ensayo de teratogénesis. Retel 2009; 21(2):22-36.
10. Kalter H. Teratology 1974; 9:257-258.
11. Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology. Vaccine 2001; 19:3331-3346.
12. Rodriguez MD, Gonzalez JE, 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.
13. Mark J, Shayne G. Animal Models in toxicology. Chapter 3, The Rats. Toxicology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p.150-193.

14. Dawson AB. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain. Technol 1926; 123:540-544.
15. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten C, Behringer R. Fijación de los embriones y de los tejidos del ratón. Harb.Protoc 2007; 10(1101)/pdb.prot4702. ISSN en línea: 1559-6095.
16. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten C, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press©; 2003.p.346-367. Hardcover • ISBN 978-087969574-3.

Recibido: 12/03/10

Aceptado: 22/03/10