

Procedimiento para el examen esquelético y visceral en fresco de fetos de rata y de conejo en el estudio de teratogénesis.

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

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

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

Correspondencia a: Luis Alfredo Rosario Fernández. Email: lrosario@ifal.uh.cu

Resumen

Se entiende por Teratología a la disciplina científica que, dentro de la zoología, estudia a las criaturas anormales, aquellos individuos naturales en una especie que no responden al patrón común. El objetivo de este trabajo fue describir los métodos y técnicas para el examen esquelético y visceral en fresco de fetos de rata y de conejo en el estudio de teratogénesis. Tuvimos en cuenta el procedimiento para describir el examen microscópico de fetos de rata y conejo obtenidos el día 20 de la gestación, con referencia a especímenes estándares, así como describir el examen visceral de fetos de rata y conejo, sin que éstos hayan sido previamente fijados (el examen visceral tiene lugar el día de la cesárea).

Palabras claves: Examen esquelético, examen visceral en fresco, fetos de rata y de conejo, teratogénesis.

Abstract

Procedure for the skeletal and visceral exam in fresh of rat and rabbit fetuses in the teratogenesis study.

Teratology is the scientific discipline that, inside the zoology, it studies the abnormal creatures, those natural individuals in a species that it don't respond to the common pattern. The aim of this work was to describe the methods and techniques for the skeletal and visceral exam in fresh of rat and rabbit fetuses in the teratogenesis study. We kept in mind the procedure to describe the microscopic exam of rat and rabbit fetuses obtained the day 20 of the gestation, with reference to standard specimens, as well as to describe the visceral exam of rat and rabbit fetuses, without these have been previously fixed (the visceral exam takes place the day of the caesarean operation).

Key words: Skeletal exam, visceral exam in fresh, rat and rabbit fetuses, teratogenesis.

Introducción

Se entiende por Teratología a la disciplina científica que, dentro de la zoología, estudia a las criaturas anormales, es decir, aquellos individuos naturales en una especie que no responden al patrón común.¹

Proviene del antiguo Griego, Theratos que significa monstruo y logia que significa estudio o tratado de, entonces es la ciencia que estudia las malformaciones congénitas o mutaciones, ya sean inviables (abortos) o viables. Las malformaciones o anomalías congénitas suelen desarrollarse en etapa embrionaria, por lo que es importante un suficiente punto el que modifique conocimiento de la disciplina conocida como embriología. Se excluyen, para algunos casos, las malformaciones posteriores al nacimiento o realizadas por fuente externa antes de que ocurra y causadas por traumatismos, éstos en los artrópodos suelen ser considerados como hemiterias o "semi-monstruos" y son incluidos en las teratologías, en cambio para animales como vertebras se utiliza la denominación de "lesión", así como los daños producidos por afecciones bacterianas o virales que se establecen una vez que el órgano ya se ha formado. Por ejemplo, un animal puede nacer con hepatitis y su hígado presentar las lesiones características. Se hablará entonces de una "enfermedad fetal" y una "lesión fetal".^{2, 3}

Se denominan teratógenos aquellos agentes que pueden inducir o aumentar la incidencia de las malformaciones congénitas cuando se administran o actúan en un animal preñado durante su organogénesis. Las muertes intrauterinas y las reabsorciones no siempre son incluidas como efectos teratológicos.⁴

El desarrollo del semen junto con el fetal pueden ser alterados por diferentes factores externos (radiaciones, calor, sustancias tóxicas, virus) o internos (alteraciones genéticas o cromosómicas). También los defectos congénitos pueden ser el resultado de los dos conjuntos de factores relacionados: el acervo génico (genoma) y los factores ambientales.

El objetivo de este trabajo fue describir los métodos y técnicas para el examen esquelético y visceral en fresco de fetos de rata y de conejo en el estudio de teratogénesis.

Desarrollo

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

Especímenes estándar son fetos de madres normales o madres no tratadas, mantenidos en condiciones idénticas a aquellas del estudio actual. Los especímenes estándar en uso serán almacenados en armarios identificados dentro de la unidad.⁵

A causa de la posibilidad de deriva genética dentro de una cepa, es necesario preparar nuevos especímenes estándar a intervalos apropiados y comparar éstos con los estándares existentes. Los especímenes reemplazados, identificados apropiadamente, tienen que ser archivados. El examen y la evaluación se harán a ciegas, es decir, el operador no conocer el grupo de dosis de la camada que está siendo evaluada.

Cada operador puede tener sólo un frasco de especímenes abierto a un tiempo. Cuando un operador ha comenzado a evaluar una camada, esa camada tiene que ser completada de una vez. No este permitido hacer rupturas entre fetos, abandonando un frasco de especímenes abierto en el puesto de trabajo. Cuando se evalúe el estado de osificación de un esqueleto o parte de él, es importante tener en cuenta los tamaños absoluto y relativo de los huesos o áreas de osificación, y no ser influenciado por la intensidad del color sino por su distribución en el hueso.⁶

Equipos requeridos

- Un estereo microscopio con un rango de poderes bajos que permita magnificaciones de aproximadamente x4 a x20. Los fetos de conejo se ven mejor usando solamente la platina iluminada del estereo-microscopio.
- Dos pares de pinzas.
- Placas de cristal limpias conteniendo el mismo fluido en que están sumergidos los fetos que serán examinados.
- Un frasco de espécimen vacío que servirá como frasco auxiliar para los fetos evaluados.
- Los especímenes estándar para las especies y cepas bajo estudio.

Procedimiento

- ❖ Tomar un pequeño número de frascos de especímenes del banco de procesamiento y agruparlos al alcance de la mano en el banco de trabajo.⁷
- ❖ Seleccionar uno de estos frascos.
- ❖ Abrir el frasco y comprobar el número de fetos contra el número anotado en el modelo de evaluación. Si los números no se corresponden investigar las causas y hacer un añadido al modelo firmado y fechado.
- ❖ Poner el número de fetos en la camada en el modelo de evaluación.
- ❖ Verter aproximadamente la mitad del fluido del frasco de espécimen en el recipiente auxiliar listo para recibir los fetos evaluados.
- ❖ Usando pinzas, transferir un feto del frasco de especímenes a la placa de examen, totalmente sumergido en el fluido.
- ❖ Para los propósitos de la evaluación éste debe ser designado feto 1.
- ❖ Colocar la placa en el microscopio y examinar los fetos bajo una magnificación la cual permita incluir el cuerpo entero en el campo (x4 a x10).
- ❖ Registrar todas las observaciones en el modelo de evaluación. Las partes del esqueleto son nombradas en el modelo. Cuando se encuentre una desviación de lo normal se registrará en tinta roja y si es necesario se describirá más completamente en la sección "Observaciones" del modelo. Serán hechas referencias donde sea necesario a los especímenes estándar.⁸
- ❖ Colocar los fetos sobre su superficie ventral y examinar los huesos del cráneo. Precisar la estructura y osificación normal, poniendo particular atención a las suturas del cráneo y el paladar.
- ❖ Mover los fetos para examinar la columna vertebral y las costillas.
- ❖ Determinar el grado de osificación y la normalidad de morfología de las costillas y contar los elementos de la columna vertebral.
- ❖ Examinar las cinturas escapular y pélvica de manera similar.
- ❖ Virar los fetos sobre su lomo y contar y examinar las costillas y esternones.

- ❖ Examinar los miembros anteriores. Contar los elementos osificados y evaluar el grado de osificación.⁹
- ❖ Examinar los miembros posteriores. Contar los elementos osificados y evaluar el grado de osificación.
- ❖ Colocar los fetos examinados en el frasco auxiliar.
- ❖ Repetir el examen para cada uno del resto de los fetos de la camada.
- ❖ Cuando todos los fetos en la camada hayan sido examinados, retornarlos al frasco de la camada y cerrarlo.

2. Este procedimiento describe el examen visceral de fetos de rata y conejo, sin que éstos hayan sido previamente fijados (el examen visceral tiene lugar el día de la cesárea).

Equipamiento

Microscopio estereoscópico Bloque de parafina

Agujas

Tijeras pequeñas

Pinzas pequeñas

Procedimiento

1. Los fetos se fijan con alfileres a bloques de parafina con el lado ventral hacia arriba.
2. El examen visceral se lleva a cabo bajo un microscopio de disección.
3. El abdomen es cortado horizontalmente a nivel del ombligo y longitudinalmente desde el pubis hasta debajo del nivel del diafragma.
4. Se examina el tamaño y posición de los intestinos, estómago, bazo y páncreas.
5. El hígado tiene 4 lóbulos: el lóbulo derecho que tiene a su vez los lóbulos anterior y posterior; el lóbulo izquierdo que es grande; el mediano o lóbulo cístico el cual presenta una fisura profunda por el *ligamentum teres*; y el lóbulo caudato que es un pequeño lóbulo sobre la superficie caudal que rodea el esófago. La rata no presenta vesícula.^{10,11}
6. Los órganos reproductores se observan apartando los intestinos y las vísceras de la pared dorsal con una mota de algodón.

7. La hembra tiene un útero bicornes. Los dos cuernos se fusionan en sus terminaciones cervicales pero tienen aberturas separadas en la vagina. Los cuernos se extienden desde la vagina, cranealmente casi hasta los polos caudales de los riñones. Superiormente los cuernos uterinos están relacionados a los oviductos y los ovarios.¹⁰
8. En el feto macho, los testículos no han descendido completamente y descansan en la cavidad pélvica a ambos lados de la vejiga. Frente a los testículos y estrechamente pegados a ellos descansa el caput o cabeza del epidídimo. El corpus o cuerpo del epidídimo descansa a lo largo de la superficie del testículo y se continúa en la cauda o cola del epidídimo. El conducto deferente está conectado al epidídimo y conduce a la uretra. Las vesículas seminales son relativamente grandes y lobuladas.¹²
9. Se examina el tamaño y la posición de las adrenales y los riñones. En la rata, el riñón izquierdo descansa más cefálicamente que el derecho y sobre el polo superior de cada uno están las adrenales. Se hará un corte transversal del riñón para exponer las papilas y la pelvis renales. Tiene que hacerse una distinción entre retardo "normal" y malformación (hidronefrosis). Seguir los uréteres desde el riñón hasta la vejiga. Se puede aplicar una pequeña cantidad de Bouin con un algodón para facilitar la visibilidad. Un grado moderado de tortuosidad del uréter es normal.¹²
10. Apartar el hígado con cuidado con una mota de algodón para examinar si hay aberturas anormales o herniaciones del diafragma.
11. Para el examen de la cavidad torácica se hace un corte longitudinal a la derecha del centro para no dañar la integridad de las esternebras. Este corte es superficial para evitar dañar los órganos subyacentes o los vasos sanguíneos. Cada lado del diafragma es retirado para descubrir los órganos torácicos.^{13, 14}
12. Los apéndices auriculares izquierdos y derecho del corazón son usualmente asimétricos, su tamaño y forma dependen del estado del órgano al tiempo de la muerte. La porción anterior del corazón está principalmente ocupada por el ventrículo derecho, el ventrículo izquierdo descansa detrás y hacia la izquierda. El ápice del corazón señala a la izquierda.¹⁵

13. El pulmón derecho tiene 4 lóbulos y el izquierdo tiene uno; el lóbulo medio del pulmón derecho se extiende sobre el lóbulo izquierdo y está dorsal y caudal al corazón. Contar los lóbulos y examinar su tamaño y madurez.¹⁵
14. Comprobar el tamaño y la posición del timo y retirarlo con una pinza.
15. Examinar la tráquea y el esófago en busca de fístula traqueoesofagal.
16. Abrir el saco pericárdico y quitar el pericardio. En el lado derecho está la vena cava anterior (superior), el nervio vago derecho y la arteria innominata. Esta última surge del arco aórtico y se divide en arteria subclavia derecha y arteria carótida derecha común. En el lado izquierdo del arco aórtico están la arteria carótida común y la arteria subclavia izquierda. Distinguir el nervio vago izquierdo y la vena cava izquierda anterior (superior).¹⁶
17. En la línea media observar la arteria pulmonar que surge de la base del ventrículo derecho ventral a la aorta; es relativamente corta y se divide en las ramas pulmonar derecha e izquierda las cuales se extienden a los lóbulos derecho e izquierdo del pulmón. La arteria pulmonar está conectada a la aorta por el ductus arterioso, un vaso fetal que se atrofia al nacer. La aorta surge del ventrículo izquierdo, dorsal a la arteria pulmonar y se extiende anteriormente, entonces se dobla lateralmente a la izquierda antes de extenderse posteriormente como la aorta dorsal descendente.¹⁶
18. El corazón consiste en 4 cámaras de paredes musculosas: el atrio derecho e izquierdo y los ventrículos derecho e izquierdo. Los lados derecho e izquierdo del corazón están separados por el septo interatrial y el septo interventricular. Los septos atrioventriculares separan los atrios de los ventrículos. Para examinar la anatomía interna del corazón, se hacen 2 cortes usando tijeras de microdissección.¹⁶
19. El 1er. corte comienza a la derecha de la superficie media ventral del ápice y se extiende anteriormente y ventralmente dentro de la arteria pulmonar. Esta incisión es abierta con pinzas y se inspeccionan la válvula tricúspide entre el atrio derecho y el ventrículo derecho y las 3 cúspides de la válvula semilunar de la arteria pulmonar. Examinar el septum interventricular.

20. El 2do. corte es hecho a la izquierda de la superficie media ventral del ápice y se extiende a través del ventrículo izquierdo dentro de la aorta ascendente. Se observan la válvula bicúspide entre el atrio izquierdo y el ventrículo izquierdo y las 3 cúspides de la válvula semilunar de la aorta.¹⁶
21. Cuando se termine el examen visceral, el feto ser decapitado y la cabeza colocada en fijador de Bouin para ser seccionado con una cuchilla de afeitar.
22. El primer corte se hace en el plano que pasa a través de la abertura de la boca y las orejas. Se separa la parte superior de la cabeza, se retira la lengua y se examina el cierre del paladar.
23. La parte superior de la cabeza se coloca en su posición original y se hacen 5 cortes para visualizar las estructuras internas. Cada una de estas secciones se coloca en una caja Petri con la cara anterior mirando hacia arriba e inmersos en alcohol al 70 %.
24. Las secciones son examinadas bajo un microscopio de disección. Se examinan ambos lados de la sección y se compara con la precedente y la siguiente.
25. En la 1era. y 2da. secciones de la cabeza se examinan la simetría de los orificios nasales, los cornetes, septo nasal y paladar.¹⁷
26. Si hay paladar hendido clasificarlo como unilateral o bilateral.¹⁷
27. En la 3era. sección se examinan los lentes y las retinas de ambos ojos en cuanto a tamaño, uniformidad y curvatura. También se examina el desarrollo de los bulbos olfatorios.
28. En la 5ta. sección se examinan los ventrículos laterales y el tercer ventrículo del cerebro; el grado de agrandamiento es usado para el diagnóstico de hidrocefalia.^{18,19}
29. El resto de la cabeza es medioseccionado para observar el desarrollo del cerebelo y el tallo del cerebro.^{18,19}
30. Fotografíar las malformaciones observadas.
31. Fijar en Bouin las estructuras que vayan a continuar estudiándose histológicamente.²⁰

Conclusiones

El presente trabajo de revisión permitirá profundizar sobre el procedimiento para el examen esquelético y visceral en fresco de fetos de rata y de conejo en el estudio de teratogénesis. Será un material de ayuda y soporte primario para aquellos centros que realizan evaluaciones de toxicología de la reproducción. Teniendo en cuenta que independientemente de que en la literatura existen varios protocolos para este tipo de investigación, pensamos que los investigadores que se dediquen o vayan a dedicarse a esta rama de la toxicología deben tener un gran conocimiento sobre embriología, reproducción y frecuencia espontánea de aparición de malformaciones congénitas en el biomodelo animal a utilizar, teniendo en cuenta siempre que debe utilizar el biomodelo con índices espontáneos mas bajo de malformaciones, que hasta nuestros días se destacan la rata como roedora y el conejo como no roedora. Además esta rama es totalmente descriptiva, lo que la hace ser prácticamente repetitiva para ganar en experiencia, evaluando productos que sean teratogénicos y otros que no lo sean, así como provoquen malformaciones en diferentes sistemas de órganos, lo cual presupone una gran memoria visual o fotográfica. Dado los grandes problemas que han traído drogas que se comercializan desde esta óptica, se le otorga hoy día a los estudios teratogénicos gran peso en cuanto a seguridad, inocuidad y/o riesgo beneficio.

Referencias bibliográficas

1. Delatour P, Daudon M, Garnier F, Benoit E. Relationship of metabolism and embryotoxicity of febantel in the rat and sheep. *Ann. Rech. Vet* 1982; 13(2):163-170.
2. Cristófol C, Navarro M, Franquelo C, Valladares JE, Carretero A, Ruperto J, Arboix M. Disposition of netobimin, albendazole, and its metabolites in the pregnant rat developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1997; 144(1):56-61.
3. Bradley M, Horton J. Assessing the risk of benzimidazole therapy during pregnancy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* 2001; 95(1):72-73.
4. Cummings AM, Harris ST, Rehnberg GL. Effects of methyl benzimidazole carbamate during early pregnancy in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol* 1990; 15(3):528-535.
5. Cunha SA, Contrera MG, Lopes RA, Azoubel R, Contrera JD. Experimental hypervitaminosis A in the rat. XXV. The effect of a high single dosis of vitamin A on umbilical cord length. *Anais 44 Reunión SBPC* 1992; 1(1):712-714.
6. Palmer AK. Spontaneous malformations of the New Zealand White rabbit: the background to safety evaluation test. *Lab. Anim* 1968; 2:195-206.
7. Khera KS. Common foetal aberrations and their teratologic significance: a review. *Fund Appl Toxicol* 1981; 1:13-18.
8. Manson J, Kang T. Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. *Developmental Toxicology. In Principles and Methods of Toxicology.* Edited by A. Wallace Hayes, Raven Press Ltd, New York; 1989.p.311-359.
9. Wilson JG. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *Teratology, principles and techniques.* Eds.: J.G Wilson y J. Warkany. University of Chicago; 1975.p.262-277.
10. Stuckhart JL, Poppe SM. Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing. *Ter, Car, and Mut* 1984; 4:181-188.
11. Carrara DL, Lopes RA, Vinha D, Sala MA, Semprini M, Friedrichi Ch. Efectos del albendazol en el hígado de feto de rata. Estudio morfológico y morfométrico. *Int Jour of Morpho* 2005; 23(2):111-120.

- 12.Landsdown AB. Perspectives- The evaluation of reproductive toxicity and teratogenicity. Evaluation of reproductive toxicity and teratogenicity. Experimental Toxicology, 2d edition; 1993.p.126-132.
- 13.Chernoff N, Rogers JM, Turner CI, Francis BM. Significance of supernumerary ribs in rodent developmental toxicity studies. Fundam. Appl. Toxicol 1991; 17:448-453.
- 14.Wickramaratne GA. The post-natal fate of supernumerary ribs in rat teratogenicity studies. J. Appl. Toxicol 1988; 8:91-94.
- 15.Rodríguez MD, García H. Teratogenic and reproductive studies of policosanol in the rat and rabbit. Ter, Car and Mut 1994; 14:107-113.
- 16.Shayne G. Animal Models in toxicology. Chapter 3, The Rats. Pathology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p.194-216.
- 17.Rodríguez MD, Menéndez S, Gómez M, García M. Estudio teratogénico del ozono administrado por insuflación rectal a ratas Wistar. Rev CENIC Cien Biol 1989; 20(1)2-3.
- 18.Yazdani M, Joseph F, Grant S, Hartman AD, Nakamoto T. Various levels of maternal caffeine ingestion during gestation affects biochemical parameters of fetal rat brain differently. Dev. Pharmacol. Therap 1990; 14:52-61.
- 19.Yazdani M, Fontenot F, Gottschalk SB, Kanemaru Y, Joseph F, Nakamoto, T. Relationship of prenatal caffeine exposure and zinc supplementation on fetal rat brain growth. Dev. Pharmacol. Therap 1992; 18:108-115.
- 20.Tomé O. Estudio en ratas Sprague Dawley de los posibles efectos teratogénico y abortivo de la Sheilina. RevistaCiencias.com 2007; 9:1-10.

Recibido: 25/03/10

Aceptado: 29/03/10