

## Tres procedimientos a tener en cuenta en los estudios de toxicología de la fertilidad, peri y postnatales en ratas.

---

**Tamara Hernández Salazar\***, **Daniel Francisco Arencibia Arrebola\***, **Yulieé López Feria\***, **Luis Alfredo Rosario Fernández\*\***.

\* 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: Daniel Francisco Arencibia Arrebola. Email: [darencibia@finlay.edu.cu](mailto:darencibia@finlay.edu.cu)

## Resumen

El objetivo de esta carta al editor fue dar a conocer tres procedimientos a tener en cuenta en los estudios de toxicología de la fertilidad, peri y postnatales en ratas. Dichos procedimientos son la preparación de exudados vaginales para verificar que ha ocurrido el apareo, pasos a seguir el día del nacimiento asumiendo como día 0 la fecha del apareo y una guía para comprobar si las crías están lactando. Pensamos que este trabajo pueda servir de material de soporte para aquellos investigadores que les realizan a sus productos este tipo de estudios.

**Palabras claves:** Procedimientos, toxicología de la fertilidad, toxicología peri-postnatal, exudado vaginal, nacimiento, agalactia.

## Abstract

*Three procedures to keep in mind in the fertility, peri and postnatal toxicology studies in rats.*

The objective of this letter to the editor went to give and to know three procedures to keep in mind in the fertility, peri and postnatal toxicology studies. These procedures are the preparation of exudates vaginal to verify the mating, steps to continue the day of the birth assuming as 0 day the date of the mating and the guide to check if the breedings are suckling. We think that this work can serve as support material for those investigators that carry out to its products this type of studies.

**Key words:** Procedures, fertility toxicology, peri-postnatal toxicology, exudates vaginal, birth, agalactia.

## Introducción

En la rata el ciclo estral dura 4 días aproximadamente y está formado por las fases siguientes: proestro, estro, metaestro (o diestro I) y diestro (o diestro II).<sup>1</sup> La corta duración del ciclo estral en las ratas permite que esta sea una especie ideal para la investigación de los cambios que se producen durante el ciclo reproductivo, a su vez que facilita el apareo para ser utilizada en los estudios de toxicología de la reproducción en cada uno de los segmentos de los cuales componen estudio.<sup>2</sup>

Además es utilizada investigaciones sobre la influencia del ciclo estral en funciones no reproductivas,<sup>3</sup> la citología del exudado vaginal es usada para la determinación de las fases del ciclo estral.<sup>3</sup>

La caracterización de cada fase está basada en la proporción entre los 3 tipos de células observados en el exudado vaginal: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos.

Por otra parte es de vital importancia conocer los procedimientos a realizar el día 0 de nacidas las crías en los estudios perinatales, destacando sobre todo los parámetros de tipo conductual de la madre durante el parto, observando si este se realizó de forma normal, anotando sobre todo el conteo total de crías y el número de crías vivas, así como tener en cuenta los cuidados de la madre después del parto para con las crías.<sup>4</sup>

Otro procedimiento importante en los estudios de toxicología postnatal es comprobar si las crías están lactando, pues se ha destacado en numerosas investigaciones que algunos fármacos inhiben este proceso, tanto la cantidad de leche que produce la madre como la vivacidad de las crías para lactar.<sup>5</sup>

Tomado en consideración estos tres aspectos, esta carta al editor tuvo por objetivo dar a conocer tres procedimientos a tener en cuenta en los estudios de toxicología de la fertilidad, peri y postnatales en ratas. Dichos procedimientos son la preparación de exudados vaginales para verificar que ha ocurrido el apareo, pasos a seguir el día del nacimiento asumiendo como día 0 la fecha del apareo y una guía para comprobar si las crías están lactando. Pensamos que este trabajo pueda servir de material de soporte para aquellos investigadores que les realizan a sus productos este tipo de estudios.

## Desarrollo

### **1. Procedimiento para la preparación de exudados vaginales para verificar que ha ocurrido el apareo.**

Se realiza para describir el procedimiento para hacer los exudados vaginales y determinar si la hembra ha sido apareada.<sup>1</sup>

#### **Equipamiento requerido.**

- Microscopio con iluminación adecuada, para aproximadamente una magnificación X100.
- Goteros.
- Solución salina fisiológica.
- Portaobjetos.
- Etiquetas adhesivas.
- Papel absorbente.

#### **Procedimiento.**

1. Colocar el microscopio y tener a mano los goteros, la solución salina, los portaobjetos, las etiquetas y el papel absorbente.
2. Abrir el diario del proyecto en el día apropiado.
3. Poner la jaula vacía de la hembra y la correspondiente jaula del macho en el banco. Las cajas deben ser tomadas en el orden en el cual ellas aparecen en el estante. Los pomos de agua tienen que ser retirados o invertidos antes de transferir la jaula.
4. Retirar las tapas de ambas jaulas.<sup>2</sup>
5. Cargar un gotero con unas pocas gotas de solución salina.
6. Coger una hembra de la jaula del macho y chequear su marca de la oreja.
7. Insertar la punta del gotero 1 ó 2 mm dentro de la vagina de la rata y descargar y cargar suavemente la solución salina del gotero.
8. Colocar la hembra de regreso a su propia jaula.
9. Si un tapón vaginal está presente, anotar la hembra como preñada.
10. Si no hay tapón vaginal presente, depositar el contenido celular en un portaobjetos limpio. Examinar el portaobjetos bajo el microscopio para detectar la presencia de espermatozoides.<sup>6</sup>

11. Si hay espermatozoides presentes, anotar la hembra como preñada.
12. Si no hay espermatozoides presentes, considerar la hembra como no apareada.
13. Repetir el procedimiento para cualquier otra hembra de la jaula del macho.
14. Usar una pipeta limpia para cada hembra a fin de prevenir infecciones vaginales o trasladar espermatozoides de una rata inseminada a otra que no se haya inseminado.<sup>7</sup>
15. Cuando las hembras hayan sido examinadas recolocar las tapas en las jaulas del macho y las hembras y retornar las jaulas a sus lugares en el estante.
16. Proceder con la próxima jaula de macho y la correspondiente jaula de hembras.
17. Cuando todas las hembras hayan sido examinadas, firmar y anotar la hora en el diario del proyecto.

**Aclaración:** La inserción de la pipeta en la vagina demasiado profundamente o el chorro excesivo de salina pueden causar pseudopreñez e interrupción del ciclo estral normal.<sup>8</sup>

De no haber ocurrido el apareo según la citología vaginal puede determinar en que fase se encuentra del ciclo estral: <sup>6</sup>

- Proestro: predominio de células epiteliales nucleadas.
- Estro: presencia de células epiteliales anucleadas fundamentalmente.
- Metaestro: existe la misma proporción entre leucocitos, células epiteliales nucleadas y células cornificadas.
- Diestro: predominio de leucocitos.

## **2. Procedimiento a seguir el día del nacimiento asumiendo como día 0 la fecha del apareo.**

Una vez que se determine la fecha probable de parto, los animales tienen que ser chequeados el día antes de la fecha esperada tan cerca del fin del día de trabajo como sea posible. Si algunas ratas paren antes o después de la fecha establecida, tienen que ser contadas como paridas el día que lo hicieron y no el día que era esperado.<sup>9</sup>

### ***Procedimiento al nacer.***<sup>10</sup>

1. El día 21 de la gestación colocar a cada animal una hoja de papel absorbente. Este papel debe ser cambiado cada vez que la jaula se limpie hasta el día 12 post-partum.

2. Cuando un animal comience a parir, colocar una etiqueta adhesiva sobre su ficha estableciendo la fecha de nacimiento.
  3. Cuando sea posible, observar el proceso de parto para notar signos de dificultad, anormalidades, o duración inusual.
  4. Anotar la longitud del parto (donde esto fue observado) y cualquier anomalía observada, tal como excesivo sangramiento o canibalismo.
  5. Mirar el número del animal en la hoja de datos de la camada y anotar el día 0 (la fecha del apareo), si es conocido. Registrar en la ficha de la jaula la fecha de parto y la longitud del período de gestación. Calcular y escribir en las columnas apropiadas, las fechas perspectivas de peso los días 1, 4, 7, 14 y 21 post-parto.
  6. Cuando el animal haya finalizado completamente el parto y limpiado sus crías, poner los números de crías vivas y muertas en la hoja de datos de la camada, debajo de la fecha de parto.<sup>11</sup> Esto puede hacerse el día siguiente del parto si el animal comenzó a parir tarde en la tarde. Poner cuidado en perturbar lo menos posible a la madre y las crías en las siguientes 24 horas del parto.
  7. Cuando las crías hayan sido contadas y registradas, iniciar la hoja de datos de la camada.
  8. Retirar cualquier cría muerta de la jaula.
  9. Tiene que ser hecha una evaluación de cualquier deficiencia en los cuidados maternos.
- Los parámetros examinados deben ser: <sup>10</sup>
- Construcción y limpieza del nido.
  - Limpieza, alimentación y mantenimiento de las crías.
  - Signos de abuso de las crías, presencia de daños.
10. Deben ser registradas las anomalías.<sup>12</sup>
  11. Apuntar cualquier observación sobre la camada, como está especificado por el protocolo del experimento, en el reverso de la hoja de datos para cada camada. Todos los apuntes tienen llevar hora, fecha e iniciales.
  12. Al final de cada día de trabajo preparar una lista de los animales que han parido ese día. Cada número animal y su grupo de dosis tienen que ser listados en orden numérico y la lista tiene que ser firmada y fechada.

13. Dar la lista al asesor del comportamiento al final de cada día de trabajo para permitirle a él proceder con las evaluaciones neonatales.

14. Tiene que ser hecha una comprobación independiente al final de cada día de que los números de los animales de la lista entregada al asesor se corresponde con las fichas de las jaulas y la hoja de datos de la camada.

15. Esta comprobación tiene que ser registrada en el diario del proyecto.

### **3. Procedimiento para comprobar si las crías están lactando.**

**Agalactia:** Ausencia de leche en el estómago, la cual es normalmente comprobada varias horas después del parto.<sup>13, 14</sup>

1. Para los animales que hayan parido en la mañana, la agalactia debe ser comprobada tarde en la tarde. Para los animales que comiencen a parir en la tarde, la agalactia debe ser lo primero que se debe chequear a la mañana siguiente.

2. Cuando las crías hayan sido alimentadas, la leche será visible como una mancha blanca bajo la superficie de la piel abdominal.<sup>15</sup>

3. El número de las crías en la camada que muestran agalactia en la primera observación tiene que ser registrada en la hoja de datos de la camada.

4. Se hará una segunda comprobación para agalactia. El tiempo para hacerla depende del protocolo del experimento particular.

## **Conclusiones**

Damos como conclusión de este trabajo que existen numerosos procedimientos en nuestros días para determinar los efectos tóxicos de drogas en la conducta sexual, fertilidad, conducta materna, natalidad, y producción de leche materna postparto, así como la vivacidad de las crías para alimentarse una vez en el entorno en el cual han de desarrollarse, nutrirse y reproducirse, a su vez podemos apreciar que la toxicología constituye una ciencia multidisciplinaria por lo cual se necesita de profesionales altamente preparados para trabajar en cada uno de estos tópicos. La toxicología utiliza herramientas y conocimientos de la microbiología, bioquímica, química analítica, embriología, fisiología, conducta, veterinaria y muchas más ramas o ciencias. Solo por nombrar algunas hicimos alusión en la oración anterior.

---

## Referencias bibliográficas

1. Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil E & Neil J. (eds.). Physiology of reproduction New York: Raven Press; 1988.p.1893-928.
2. Marcondes FK, Miguel K, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav* 2001;74(4-5):435-440.
3. Rodriguez MLV, Marcondes FK, Spadari-Bratfisch RC. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level and estrous cycle in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:602-607.
4. Collins T.F, Sprando R.L, Shackelford M.E, Hansen D.K. Food and Drug Administration Proposed Testing Guidelines for Developmental Toxicity Studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1999; 30:39-44.
5. 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.
6. Chateau D, Geiger JM, Samama B, Boehm N. Vaginal keratinization during the estrous cycle in rats: a model for evaluating retinoid activity. *Skin Pharmacol* 1996;9:9-16.
7. Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W. Hoar & C. P. Hickman (eds.), *General and comparative physiology*. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1975.p.260-265.
8. Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Marrero G. Longitud del ciclo estral en ratas Sprague Dawley tratadas *in útero* con extracto de *Roystonea regia*. *Rev Cub Farm* 2009; 43(3):1-7.
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. 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.
11. FDA, CBER. Guidance for industry. Considerations for reproductive toxicity studies for preventive vaccines for infectious disease indications; 2000.p.21-22.
12. Rodríguez M.D, Gámez R, González J.E. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long chain fatty acids in rats. *Food Chem Toxicol* 2003; 41:89-93.



13. Dexeus JM, Fernández A. Mastología. Gándula Mamaria. Editorial Elsevier: España; 2000.p. 678-816.
14. Rhea V, Bright R, Swartout M. Clínica de pequeños animales. Cuarta Edición. Ediciones Saunders. Editorial Elsevier: España; 2004.p. 610-646.
15. Amiret R. Hámsters recién nacidos. Cómo identificar si se alimentan o no. Otros Animales. Madrid. Mascotas.org 2008; 4:2-4.

**Recibido: 01/04/10**

**Aceptado: 03/04/10**