

Trabajo de Revisión

Toxicología experimental

Algunas consideraciones sobre el uso de modelos animal en el ensayo de teratogénesis

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2}, Yulieé López Feria^{3*}, Juan Francisco Infante Bourzac^{4*}, Mildrey Fariñas Medina^{1*}, Daiyana Díaz Rivero^{5*}.**

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, ²Licenciado en Microbiología, ³Doctor en Medicina Veterinaria, ⁴Doctor en Medicina Veterinaria. PhD, ⁵Técnico Medio en Veterinaria.

*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.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

Se entiende por Teratología a la disciplina científica que, dentro de la veterinaria y la medicina, estudia a las criaturas deformes, es decir, aquellas creaciones naturales en una especie que no responden al patrón común. 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. 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 x a evaluar. Para lo cual nos trazamos como objetivo de este pequeño trabajo dar una panorámica actual sobre algunas consideraciones a tener en cuenta en los ensayos de teratogénesis en roedores y en una especie no roedora tal es el caso del conejo, como esta establecido según las regulaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD) y de la ICH (Conferencia Internacional sobre la Armonización), lo cual pensamos será útil para aquellos investigadores que trabajan la toxicología experimental, en la rama de toxicología de la reproducción. Tuvimos en cuenta el diseño experimental que debe cumplir al usar ratas o conejos, así como las variables que deben ser medidas y analizadas.

Palabras Clave: Teratogénesis, ratas, conejos, modelo animal, toxicología de la reproducción.

Abstract

Some considerations on the animal models use in the teratogenesis assays.

Teratology is the scientific discipline that, inside the veterinary and the medicine, its studies the unsightly creatures, those natural creations in a species that don't respond to the common pattern. At the present time standardized experimental protocols are used that they are considered acceptable and solid evaluations of the embryo-fetal development. With them it is possible to evaluate the effect of a substance given on practically all the reproductive process phases. However, the great number of chemical substances that should be evaluated with these methods has taken to the development of in vitro systems that could be used to establish priorities in the animals tests, but these systems have not been able to even this way to replace the tests in animals, being even necessary these in vivo assays, which manifest with more truthfulness the teratogenic effect or not of x product to evaluate. For that the objective of this small work is to give a current panoramic about some considerations to keep in mind in the teratogenesis assays in rodents and non rodent species it is the case of the rabbit, as this established one according to the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and International Conference on Harmonization (ICH) regulations, will be useful for experimental toxicology researchers, in the toxicology reproduction branch. We kept in mind the experimental design that should be complete when using rats or rabbits, as well as the variables that should be measured and analyzed.

Key words: Teratogenesis, rats, rabbits, animal models, reproduction toxicology.

Introducción

Se entiende por Teratología a la disciplina científica que, dentro de la veterinaria y la medicina, estudia a las criaturas deformes, es decir, aquellas creaciones naturales en una especie que no responden al patrón común.¹

Estudia, pues, las malformaciones congénitas o mutaciones, ya sean inviábiles (abortos) o viables. Las malformaciones o anomalías congénitas suelen desarrollarse en etapa embrionaria, por lo que es importante un suficiente conocimiento de la disciplina conocida como embriología.² Se excluyen, pues, las malformaciones posteriores al nacimiento o realizadas por fuente externa antes de que ocurra y causadas por traumatismos, para los cuales 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".³

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.

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. 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 x a evaluar.⁴

Para lo cual nos trazamos como objetivo de este pequeño trabajo dar una panorámica actual sobre algunas consideraciones a tener en cuenta en los ensayos de teratogénesis en roedores y en una especie no roedora tal es el caso del conejo, como esta establecido según las regulaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD) y de la ICH (Conferencia Internacional sobre la Armonización), lo cual pensamos sea útil para aquellos investigadores que trabajan la toxicología experimental o toxicología preclínica como suele llamarse, en la rama en particular de toxicología de la reproducción.

Desarrollo

Ensayo de teratogénesis: Batería de pruebas en animales de laboratorio, generalmente rata y conejo, para determinar el potencial inductor de malformaciones de un fármaco. También se denominan ensayos de teratógenia o estudios sobre el segmento II de la reproducción.⁴

Teratogénesis: Proceso por el cual se desarrollan malformaciones en los fetos, a menudo asociadas a medicamentos o productos químicos.⁵

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.⁶

Teratogenicidad: Después de la fertilización del óvulo, comienza la proliferación de las células que dan origen al feto. En los humanos, alrededor del noveno día comienza el proceso de diferenciación celular y los distintos tipos de células específicas que constituyen el organismo comienzan a formarse y migran a su posición apropiada. Esto ocurre hasta el desarrollo completo del feto. Algunas sustancias químicas pueden causar efectos en la descendencia que no son hereditarios y son denominadas sustancias teratogénicas.⁵⁻⁶

El desarrollo embrionario y fetal puede ser alterado 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.⁷

En cuanto a las causas ambientales de malformaciones congénitas, se indicó anteriormente que las mutaciones pueden producirse espontáneamente o bien ser inducidas. En este último caso, los agentes que provocan mutaciones se denominan mutágenos y se clasifican en: ⁸

- a.- Agentes de tipo físico, como las radiaciones alfa, beta, gamma, X, ultravioleta, etc., los cuales producen rupturas o lesiones cromosómicas.
- b.- Agentes de tipo químico, como algunas sustancias del humo del cigarrillo, drogas y componentes vegetales.
- c.- Agentes de tipo biológico, como ciertos virus que afectan al material genético de la célula a la que parasitan.
- d.- Agentes nutricionales y metabólicos.
- e.- Reacciones de autoinmunidad.
- f.- Factores asociados a la edad materna.

Entre los agentes teratogénicos ambientales, las radiaciones ionizantes se clasifican en dos categorías.⁶

- 1. Las ondas electromagnéticas (radiaciones gamma y rayos X)
- 2. Las corpusculares (radiaciones alfa, los neutrones y las radiaciones beta).

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.⁹ 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: ¹⁰

- 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.¹¹

El estudio de los efectos sobre el desarrollo pre y postnatal, 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.⁷

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.¹²

I. Consideraciones a tener en cuenta en el ensayo de teratogénesis con el uso de ratas.

La rata constituye uno de los modelos por excelencia útil para este ensayo, se utilizan ratas Sprague Dawley, a razón de 25 machos y 100 hembras para formar grupos de 20 hembras por número de dosis del producto a evaluar.¹³

Al comienzo del estudio, las ratas hembras por lo general deben tener 8-12 semanas de edad y un peso entre 150-220 g.

En los días establecidos, las hembras se aparean al azar con los machos en la proporción 2:1 o 1:1, en el horario de la tarde. A la mañana siguiente, la presencia de espermatozoides en el exudado vaginal se estima como evidencia de cópula, y se considera que las hembras inseminadas están en el día 0 de la gestación.¹⁴

Las ratas son administradas diariamente desde el día 6^{to} hasta el día 15^{to} de la gestación para simular el consumo humano durante los dos primeros meses de la gestación (organogénesis).¹⁵

Por lo general se forman 5 grupos, un grupo control solvente, tres niveles de dosis del producto y un grupo control positivo (administrado solamente el día 15^{to} de la gestación).

Las hembras gestantes se pesan los días 0, 6-15 y 20 de la gestación. El consumo de alimento se controla durante los días de tratamiento de la sustancia a prueba.^{14, 15}

El día 20 de la gestación, las ratas son sacrificadas por inhalación de éter. Se realizan las cesáreas, se cuentan los cuerpos lúteos y el útero se abre para ser examinado in situ. Se anotan las posiciones en el útero de todos los sitios de implantación y su condición (reabsorciones tempranas o tardías, fetos vivos o muertos). Cada feto se pesa, es sexado y examinado en busca de malformaciones externas.¹⁶

En nuestras investigaciones por lo general aproximadamente el 50% de los fetos los fijamos en alcohol para el examen del esqueleto después de teñirse con rojo de alizarina S según la técnica modificada de Dawson, a fin de visualizar alteraciones esqueléticas.¹⁷ A los restantes fetos se les realiza un examen visceral después de ser fijados en Bouin, para detectar alteraciones viscerales.¹⁸

Los datos de peso del cuerpo de las madres y de los fetos son comparados por un análisis de varianza (ANOVA). Los datos de implantaciones, cuerpos lúteos, reabsorciones tempranas o tardías y fetos muertos o vivos son analizados por la prueba de Kruskal-Wallis. La incidencia de malformaciones se compara con la prueba de Probabilidad Exacta de Fisher. La significación se preestablece para un $\alpha=0,05$.¹⁸

Variables que debe analizar: ¹⁹

1. Peso inicial, peso del día 0-6, peso del día 6-15, peso del día 15-20 y el peso del día 0-20.
2. Consumo de alimento, se evalúa del día 6 al 15.
3. Número de ratas apareadas.
4. Número de ratas preñadas.
5. Abortos.
6. Madres con fetos viables.
7. Madres con reabsorciones totales.

8. Mortalidad materna.

9. Cuerpos lúteos.

10. Implantaciones.

11. Reabsorciones tempranas, tardías y el total.

12. Número de fetos muertos.

13. Fetos vivos.

14. Pérdidas pre-implantación.

15. Pérdidas post-implantación.

16. Proporción de sexos (M/H).

17. Peso de los fetos (g).

18. Fetos malformados.

Observaciones externas: ²⁰

1. Número de fetos examinados.

2. Incidencia de fetos con malformaciones (%).

3. Número de fetos con malformaciones.

4. Agénesis de la cola, agénesis del ano, animales con sindactilia, etc.

5. Cola enroscada y retraso del desarrollo ocular y ótico.

6. Micrognatia y protusión de la lengua.

7. Hernias abdominales.

Observaciones viscerales: ²¹

1. Número de fetos examinados.

2. Incidencia de fetos con malformaciones (%).

Observaciones esqueléticas: ²²

1. Número de fetos examinados.

2. Incidencia de fetos con malformaciones (%).

3. Incidencia de fetos con variaciones (%).

4. Número de fetos con variaciones.

5. Esternebras rudimentarias, asimétricas, dumbbell, pobremente osificadas o sin osificar, etc.

6. Costillas supernumerarias.

II. Consideraciones a tener en cuenta en el ensayo de teratogénesis con el uso del conejo.

En el estudio de teratogénesis también debe incluir una especie no roedora, con frecuencia se utiliza ampliamente en toxicología experimental el conejo para este fin, hembras de la línea F1, con aproximadamente 5 meses de edad, así como machos de la misma línea se utilizan para el apareo.²³

Después de un período de cuarentena de 15 días, los conejos se alojarán en jaulas con fondo de alambre bajo condiciones ambientales controladas de luz, temperatura y la humedad.²⁴

Las hembras con signos genitales de "calor" se aparean con dos machos y la monta exitosa indica el día 0 de la gestación. Se verifica el peso promedio (2,5 kg), así como el rango de peso, entre 2.0 y 3.5 kg.²⁵

Los animales son distribuidos al azar, de acuerdo a su día 0 de la gestación, en los diferentes grupos experimentales hasta completar 25-30 conejas supuestamente preñadas en cada uno. Todos los animales se identificarán mediante etiquetas de metal colocadas en las orejas.²⁶

Se administra una dosis diaria única en el horario de la mañana, desde el día 6^{to} hasta el día 18^{avo} de la gestación. Se forman 5 grupos, un grupo control solvente, tres niveles de dosis del producto y un grupo control positivo (administrado, el día 18^{avo}).²⁰ La apariencia y salud de las conejas son observadas diariamente durante y después del tratamiento. Se registrarán los pesos corporales al inicio de la gestación (Día 0), diariamente durante el período de tratamiento y el día del sacrificio (día 29 de la gestación).²⁷

El día 29 de la gestación, las madres son eutanizadas por dislocación cervical. Se extrae el útero grávido y se registra el número y la posición de las implantaciones, reabsorciones tempranas o tardías y los fetos vivos o muertos. También se registra el número de cuerpos lúteos en los ovarios y el peso de los fetos. El útero de las

aparentemente no preñadas se tiñe con una solución de sulfato de sodio al 10 % para evidenciar sitios de implantación.²⁰

Los fetos vivos se extraen del útero y eutanizados en una atmósfera de éter. Se pesan, se revisa su morfología externa y después bajo un microscopio de disección se realiza el examen en fresco de las vísceras y se determina el sexo de todos los fetos. Posteriormente todas las carcasas fetales son despellejadas, preservados en alcohol, aclarados y teñidos con alizarina para examinar sus esqueletos.¹⁷

Para el análisis estadístico la camada se toma como unidad experimental. La media y desviación estándar del grupo se calcula a partir de las medias de cada camada. Los pesos maternos y de los fetos se comparan por la prueba de Levene. Si se encuentra homogeneidad de varianza entre los grupos, las diferencias en las medias se comparan por un ANOVA. Si se encontraran efectos significativos, las diferencias se evaluarán por la prueba de Tukey. Si no hubo homogeneidad de varianza se utiliza la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los efectos de los tratamientos son equivalentes. Las diferencias significativas son analizadas por la prueba de la U-Mann-Whitney.¹⁸ La prueba de Kruskal-Wallis se utiliza también para comparar los parámetros reproductivos: cuerpos lúteos, pérdidas pre y post-implantación, sitios de implantación, tamaño de la camada, porcentaje de machos y hembras.

El número de ratas preñadas se analiza mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher o la prueba de homogeneidad (χ^2), según corresponde. La significación se preestablece para un $\alpha=0,05$.¹⁸

Variables que debe analizar: ²⁰

1. Peso inicial, peso del día 0-6, peso del día 6-18, peso del día 18-29 y el del día 0-29.
2. Conejas apareadas.
3. Conejas preñadas.
4. Abortos.
5. Madres con fetos viables.
6. Madres con reabsorciones totales.
7. Mortalidad materna.

8. Cuerpos lúteos.

9. Implantaciones.

10. Reabsorciones tempranas, tardías y el total.

11. No. de fetos muertos.

12. Fetos vivos.

13. Pérdidas pre-implantación.

14. Pérdidas post-implantación.

15. Proporción de sexos (M/H).

16. Peso de los fetos (g).

17. Fetos malformados.

Observaciones externas: ²⁰

1. Número de fetos examinados.

2. Incidencia de fetos con malformaciones (%).

3. Número de fetos con malformaciones.

4. Agénesis de la cola, agénesis del ano, animales con sindactilia etc.

5. Cola enroscada, retraso del desarrollo ocular y ótico.

6. Micrognatia y protusión de la lengua.

7. Hernias abdominales.

Observaciones viscerales: ²¹

1. Número de fetos examinados.

2. Incidencia de fetos con malformaciones (%).

Observaciones esqueléticas: ²²

1. Número de fetos examinados.

2. Incidencia de fetos con malformaciones (%).

3. Incidencia de fetos con variaciones (%).

4. Número de fetos con variaciones.

5. Esternebras rudimentarias, asimétricas, dumbbell, pobremente osificadas o sin osificar, etc.

6. Costillas supernumerarias.

Bibliografía

1. Lacroix I, Damase C, Lapeyre M, Montastruc J.L. Prescription of drugs during pregnancy in France. *Lancet* 2000; 356: 1735-1736.
2. Olesen C, Steffensen F.H, Nielsen G.L, Jong-van den Berg L, Olsen J, Sorensen H.T. The EUROMAP group, Drug use in the first pregnancy and lactation: a population-based study among Danish women. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 139-144.
3. Uso de medicamentos durante o embarazo. *Boletín de Farmacoterapéutica da Área de A Coruña* 2000; 1:1-6.
4. Barlow S.M, Greigb J.B, Bridgesc J.W, Carered A. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food and Chemical Tpxicology* 2002; 40:145-191.
5. Collins T.F, Sprando R.L, Shackelford M.E, Hansen D.K. Food and Drug Administrattion Proposed Testing Guidelines for Developmental Toxicity Studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1999; 30:39-44.
6. Chemie B.G. Toxicological Evaluations. Potential Health Hazards of Existing Chemicals.Vol. 12. Springer Edition; 1998.p.16-17.
7. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002; 21:471-495.
8. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 18:478-482.
9. Simister N.E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21:3365-3369.
10. Gruber M.F. Maternal immunization: US FDA regulatory considerations. *Vaccine* 2003; 21:3487-3491.
11. Barrow P.C. Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. *Toxicol* 2003; 185:205-212.
12. Verdier F, Barrow P.C, Burge J. Reproductive toxicity testing of vaccines. *Toxicology* 2003;185:213-219.
13. 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.
<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

14. EMEA. Note for Guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. CPMP/BWP/3088/99; 2001.p.12-14.
15. FDA, CBER. Guidance for industry. Considerations for reproductive toxicity studies for preventive vaccines for infectious disease indications; 2000.p.21-22.
16. Siegrist C.A. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 2001; 19:3331-3346.
17. Dawson A.B. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain. Technol* 1926; 123:540-544.
18. Kalter H. *Teratology* 1974; 9:257-258.
19. 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.
20. Rodriguez 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.
21. 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.
22. Friman M, González S, Fraga J, Domínguez Y, Oquendo D, Pérez C. Evaluación de la toxicidad embrionaria y fetal de la vacuna antileptospirosis vax-spiral. *Anuario Toxicología* 2001; 1(1):30-34.
23. Cavagnaro J.A. *Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals*, John Wiley & Sons Editor, New Jersey; 2008.p.56-58.
24. Salamon C.M, MacKenzie K.M. *Animal Models in toxicology*. Chapter 6, The Rabbit. *Toxicology*. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p.424-448.
25. Cavagnaro J.A. *Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals*, *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:469-475.
26. Richardson V. C. *Rabbits: Health, husbandry, and diseases*. Malden, MA: Blackwell Science Edition. Second Edition, vol I; 2000.p.234-233.
27. Repetto M. *Toxicología Fundamental. Toxicología Experimental. Reglamentaciones sobre la experimentación Toxicológica*. Tercera Edición. Editado por ENPSES-MERCIE

GROUP, España; 2002.p. 308-313.

Recibido: 15/09/09

Aceptado: 18/09/09