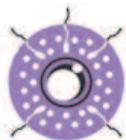


SUPLEMENTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Chorroarín 280 (C1427CWO) Bs. As., Argentina. Tel.(54 11) 4524 8400.
www.fvet.uba.ar



INITRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA BIOTECNO- LÓGICA PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD REPRODUCTIVA *IN VITRO*: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

Gulin, Ernesto ^(1, 2); Maruri, Alejandro ⁽¹⁾; Lombardo, Daniel ^(1, 2)

La toxicología reproductiva y del desarrollo (*Development and reproductive toxicology, DART*) estudia los efectos adversos de una sustancia o mezcla de sustancias sobre cualquier aspecto del ciclo reproductivo, incluida la formación y diferenciación de gametos, la fecundación y los estadios tempranos y tardíos del desarrollo embrionario, así como también los efectos a largo plazo sobre la primera progenie y sobre las generaciones subsiguientes.

La toxicidad de una sustancia sobre la reproducción puede estudiarse mediante un enfoque holístico, generalmente sobre animales de experimentación, en ensayos costosos y extensos con variables de estudio a punto final, tales como el porcentaje de reabsorción temprana, de muerte embrionaria o el número de crías vivas obtenidas.

Debido a la complejidad del ciclo reproductivo y a la variedad de células y tejidos involucrados, no es posible modelar un único sistema *in vitro* que pueda detectar efectos deletéreos sobre la reproducción. Sin embargo, el ciclo reproductivo puede descomponerse en sus componentes biológicos principales para estudiarlos individualmente o en combinación, empleando un enfoque integrado. Esta metodología permite combinar los resultados obtenidos en distintos modelos *in vitro* previamente validados, identificando el tejido o el órgano blanco de una sustancia en particular.

De esta manera, el análisis integrado de los resultados proporciona información completa sobre los potenciales efectos de las sustancias químicas sobre los gametos y el desarrollo embrionario, disminuyendo la cantidad de estudios posteriores en animales y proporcionando un perfil toxicológico más detallado.

Los ensayos de DART son generalmente obligatorios dentro del marco regulatorio para la aprobación de productos químicos, tales como fármacos, productos químicos de uso industrial o agrícola y aditivos alimentarios. Estos requisitos surgieron a partir de la exposición no controlada en productos farmacéuticos, como los episodios de talidomida y dietilstilbestrol.

En el Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA) se inició el desarrollo de una plataforma biotecnológica para la evaluación de la toxicidad reproductiva, empleando como modelos *in vitro*, diversos ensayos basados en biotecnologías reproductivas ampliamente difundidas y estandarizadas en el laboratorio.

Dentro de esta batería de ensayos, la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (bMIV) se emplea como modelo para evaluar el efecto de las sustancias de prueba sobre los ovocitos. Los complejos cumulus-ovocito (COCs) obtenidos de ovarios de vacas de faena son seleccionados por criterios morfológicos y se colocan en medio de MIV junto con concentraciones crecientes de la sustancia de prueba a evaluar. Luego de 22 horas de incubación, se evalúa la viabilidad y el estadio de maduración nuclear, considerando ovocitos maduros aquellos que se encuentran en metafase II (MII), con su primer cuerpo polar; así se obtiene la concentración citotóxica 50%, es decir, la concentración que reduce en un 50% la maduración *in vitro* de ovocitos comparada con el control sin tratar.

Para evaluar el efecto tóxico de un evento ulterior, se emplea como modelo la fecundación *in vitro* de ovo-

1) Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Cátedra de Histología y Embriología, Buenos Aires, Argentina.

2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

citos bovinos (bFIV) y el desarrollo embrionario temprano, co-incubando los gametos con concentraciones crecientes de la sustancia de prueba a evaluar. Luego del período de incubación establecido, los presuntos embriones denuclados son transferidos a una incubadora hasta el día 8 post-incubación y se evalúa el porcentaje de segmentación embrionaria al día 2, el porcentaje de blastocistos al día 7 y el porcentaje de blastocistos eclosionados al día 8, calculando en cada caso la concentración que reduce en un 50%, el desarrollo embrionario *in vitro* comparado con el control sin tratar.

Para evaluar la toxicidad sobre los gametos masculinos se seleccionaron dos modelos. Por un lado, espermatozoides bovinos son expuestos a concentraciones crecientes de la sustancia de prueba y posteriormente se evalúa la viabilidad mediante coloraciones vitales, junto con distintos parámetros de movilidad y velocidad, utilizando el análisis espermático asistido por computadora (*Computer Assisted Sperm Analysis, CASA*).

Como modelo complementario, se emplea la línea celular TM4, derivada de células de Sertoli murinas, que son sembradas en placas e incubadas con concentraciones crecientes de las sustancias de prueba durante 24 horas. Posteriormente el efecto citotóxico es determinado mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium (MTT), calculando el valor de CC_{50} , que establece la concentración de fármaco capaz de reducir en un 50% la viabilidad celular comparada con el control sin tratar.

Finalmente, y si la sustancia de prueba no muestra evidencia de daños severos sobre los modelos precedentes, se evalúa el efecto de los fármacos sobre un modelo que simula el período de pre-implantación en embriones murinos. Brevemente, ratones hembra prepúberes son superestimuladas con 2,5 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) seguido de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) y a las 48 horas son apareadas con machos de fertilidad probada. Los cigotos son recolectados de los oviductos de las hembras que presentaron tapón vaginal 18 horas después de inducida la ovulación y son expuestos a concentraciones crecientes de la sustancia en estudio. Los embriones son incubados y diariamente se evalúa el desarrollo de los estadios embrionarios hasta el día 6.

Esta batería inicial de ensayos *in vitro* ofrecidos desde el INITRA, forma parte del desarrollo de una plataforma biotecnológica para la evaluación de la toxicidad reproductiva de fármacos y otros productos de interés y relevancia en salud humana y/o animal, promoviendo la vinculación tecnológica con la industria y el sistema científico. Esta iniciativa ya cuenta con resultados obtenidos a partir de estudios con las drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, proyecto que ha sido seleccionado por la Fundación Florencio Fiorini y financiado a través del "Subsidio para Investigación en Ciencias Biomédicas" del año 2020.

CARAVANAS ELECTRÓNICAS

- *Información
- *Monitoreo
- *Proyección

del saneamiento y producción con las normas para exportación



Identag

IDENTIFICACIÓN ANIMAL

DATOS → A INFORMES → GESTIÓN

Capacitación y atención permanente Vet. Federico Galigniana  +54 9 11 4165 9900

(011) 4449 0682
info@identag.com.ar
www.identag.com.ar

DISTRIBUIDOR  BALANZAS ELECTRÓNICAS