

## **ESTRÉS: FACTOR MODIFICANTE DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA**

Paulina Cabrera, Ursula Rincón, Luz Carolina Álvarez, Sandro Pani

### **Resumen**

Al ser las ratas los animales que más se utilizan en el laboratorio de manera experimental es importante conocer los factores modificantes de su reproducción. Nuestro proyecto consistió en observar las alteraciones que sufrieron tres ratas de la cepa *Wistar* en su ciclo estral al ser sometidas a condiciones controladas el primer mes y posteriormente a estrés. Las regresamos a su ambiente controlado al cuarto mes. Nuestra investigación duró cuatro meses; el primer mes, cuando las ratas estaban en su ambiente habitual, tuvimos la oportunidad de ver las tres diferentes fases del ciclo. Las ratas estuvieron dos meses bajo estrés. En el primer mes las ratas sólo presentaron 2 fases; estro y diestro. En el siguiente mes, las ratas solo presentaron sólo una fase de su ciclo; el diestro. En el cuarto mes, regresamos a las ratas a su ambiente habitual, tuvimos que esperar aproximadamente dos semanas para que se regularizara su ciclo, pero finalmente las ratas mostraron dos etapas de su ciclo; diestro y proestro.

### **Introducción**

A mediados del siglo XIX, las ratas comenzaron a formar parte importante en la investigación científica al ser animales dóciles y extremadamente inteligentes. Gracias a estas se han podido realizar diversos tipos de investigación en todo tipo de campos como más importante la medicina y en tiempos más recientes también en la investigación genética. Las ratas utilizadas en el laboratorio son ratas que están totalmente bajo control para así minimizar las variables al realizar investigación con ellas.

La reproducción de las ratas es indispensable para los experimentos científicos; por lo tanto, se han realizado diversos estudios acerca de su ciclo estral y frecuencia reproductiva para así mantener a la especie controlada. Desafortunadamente, como en todo, existen variables que ocasionan un severo

impacto en las ratas, provocando la suspensión de su ciclo reproductivo (ciclo estral). El cambio en las condiciones ambientales de las ratas genera el estrés. Nuestra investigación consistió en comprobar que las ratas expuestas a estrés presentan severas transformaciones en su ciclo reproductivo.

### **Antecedentes**

El género *Rattus* abarca 56 especies y se dividen en diferentes cepas: albinas "Sprague, Dawley y *Wistar*". Pintos: "blanco y negro" y Long Evans (Vega, 2000). La rata de cepa *Wistar*, la que se utiliza en el proyecto, es una rata albina con cabeza relativamente ancha y orejas largas, la cola es usualmente mas corta que el cuerpo (Lawson, 1986). Las ratas tienen una duración de vida media de 2 años (Vega, 2000) suministrándole comúnmente alimento y agua *ad libitum* "disponible todo el tiempo" (Lawson, 1986). Su temperatura corporal es de 35.9° C a 37.5° C, su frecuencia cardiaca es de 260 a 600 veces por minuto, tomando en cuenta que, al ser excitadas, su frecuencia cardiaca y respiratoria aumentan. La frecuencia respiratoria normal es de 66 a 144 veces por minuto. El peso promedio de la hembra adulta es de 200 a 400 gr. (Lawson, 1986). El aparato reproductor de las hembras tiene similitudes con el aparato reproductor del ratón. Su útero posee dos cuellos uterinos comunicados entre sí por una sola vagina (Vega, 2000). La membrana vaginal se abre a las 5 semanas de nacimiento y las hembras son sexualmente maduras a las 6 u 8 semanas de vida (Zúñiga *et al*, 2001).

El ciclo reproductor de las ratas, ciclo estral, tiene una duración de 4-6 días. Los factores ambientales pueden producir variaciones en el desarrollo hormonal de los ciclos. Estos factores (como hora luz, temperatura, ruido y transportación) producen modificaciones en el ciclo estral (Burgos y Martínez, 1984).

El ciclo estral esta dividido principalmente en 3 pasos:

**Proestro:** Dura aproximadamente 12 horas. En ésta etapa, el pH vaginal es de 5.4, la vagina se torna seca, los ovarios están en plena producción folicular. El diámetro de la luz uterina es de 5 mm.

**Estro:** Dura de 9-15 horas, la vagina se ve seca, el pH vaginal es de 4.2 y aparece un flujo vaginal abundante y frecuente. Los estrógenos circulantes provocan cambios en el útero y aparece el deseo de apareamiento, aumenta la producción de la hormona folicula estimulante "FSH" y hormona leuteinisante "LH" en los 2 días siguientes. El estro se caracteriza por cambios conductuales en el animal. Se ve que la rata corre más que de costumbre, sacude las orejas (Vega, 2000), presenta un incremento en la curvatura de la columna vertebral,

frotamiento de cabeza y espalda y nerviosismo (Zúñiga *et al*, 2001). La ovulación ocurre 8-11 horas después de la aparición del estro.

**Diestro:** Dura 57 horas. El pH vaginal es de 6.1, el diámetro de la luz uterina es de 2.5 mm, los cuerpos lúteos producen abundante progesterona que desbloquea la producción de FSH y LH. Esto inicia nuevamente el ciclo con el desarrollo de nuevos folículos (Vega, 2000).

El ciclo estral puede ser interrumpido por factores externos causando estrés en las ratas. El estrés es un proceso químico, físico, emocional productor de una tensión que pueden llevar a la enfermedad física de las ratas, produciendo la suspensión del ciclo estral (Encarta, 1998) si disminuye el bienestar en las ratas, las glándulas de Harder, situadas detrás del glóbulo ocular se pueden ver afectadas, produciendo lagrimas rojizas alrededor de los ojos y nariz que, al secarse, parecen sangre (Zúñiga *et al*, 2001).

Los animales en un laboratorio se adaptan a las condiciones ambientales tales como la temperatura, humedad, los cambios de aire, ruidos, las costumbres de los cuidadores, las feromonas de animales y humanos. Esto puede cambiar cuando se les transporta hacia el bioterio o dentro del mismo (CCAP, 1998) y cuando se alteran diversas variables de su entorno, produciendo severos cambios en su fisiología, principalmente en su ciclo estral.

### **Materiales y Métodos**

Trabajamos en el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM ubicado en el campus de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Trabajamos con tres ratas de la cepa *Wistar*. Al principio del experimento nuestras ratas tenían 6 meses de edad y se encontraban en un ambiente controlado en el cual la temperatura varía de 22° C a 24° C. Teniendo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, sin ruido alguno.

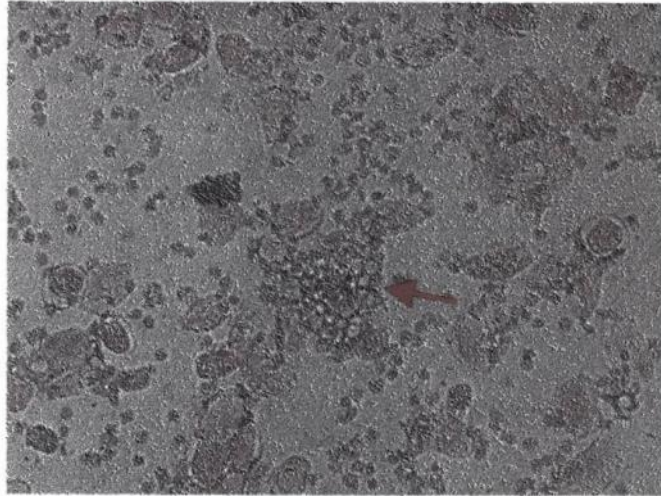
1. El primer mes hicimos frotis vaginal a las tres ratas de laboratorio de ambiente controlado, 5 días seguidos, y observamos las 3 fases de su ciclo estral. Las ratas se encontraban en una caja de metal en donde se les proporcionaba su alimento y bebida (v.g la foto 1 en el anexo.) Para tomar las muestras utilizamos diferentes materiales como la pajilla, la lámpara de alcohol, porta objetos y agua destilada. Primero numeramos a las ratas. En la cola, les pusimos un número para poder diferenciar una de la otra. Al momento de tomar las pruebas, primero desinfectábamos la pajilla poniéndola en el fuego hasta que se pusiera al rojo vivo. Para no quemar o lastimar a las ratas, después de desinfectarla, la poníamos en agua destilada. Tomábamos a las ratas por la cola e insertábamos la pajilla de tal manera que rozara la pared vaginal para así poder extraer

algunas células. Cuando sacábamos la pajilla la diluíamos en un poco de agua para que cuando la pusiéramos en el porta objetos se pudieran desprender las células. Tomamos dos muestras por rata, desinfectando en cada muestra la pajilla. Al terminar de tomar las pruebas esperábamos a que se secaran. Este procedimiento lo seguimos con cada rata. Después de tomar las muestras tuvimos que teñirlas para así poder observarlas al microscopio. Para teñirlas utilizamos diferentes sustancias como la hematoxilina, la eosina, agua y alcohol que nos permitieron diferenciar las células y poder definir la etapa del ciclo estral en la que se encontraba cada rata. Colocamos el portaobjetos siete minutos en la hematoxilina la cual iba a permitir que las diferentes células se tornaran de color rojizo, después las sumergimos en agua para quitarles el exceso de hematoxilina durante cinco minutos, de esta manera únicamente quedaban de color rojo-violeta las muestras tomadas permitiendo así poder identificar con mas precisión las células, después metimos el porta objetos a la eosina por un minuto. La eosina ayudada a fijar las muestras. Por último colocamos el portaobjetos en el alcohol por 30 segundos para quitar el exceso de las sustancias previamente utilizadas en el proceso de teñir. Una vez seca la muestra, observamos en el microscopio cada muestra. Anotábamos resultados y tomábamos fotografías cuando se identificaba muy bien cada fase.

2. Durante el segundo mes, las ratas estuvieron en un clima de estrés. Luz las 24 horas del día, una temperatura ambiente y con un ruido promedio. Decimos que es un ambiente de estrés ya que las ratas no estaban acostumbradas ni al ruido, ni al calor, ni a la luz. Transportamos las ratas del cuarto controlado a un lugar externo en el cual se encontraban en condiciones ambientales. Es decir, las horas variaban según el día, la temperatura era ambiental, y el ruido era equivalente a el que se escucha en una oficina promedio. Este mes tomamos muestras durante 17 días para poder observar cambios.
3. En el tercer mes regresamos las ratas a su ambiente controlado. Esperamos dos semanas para que las ratas volvieran a la normalidad y finalmente en la tercera semana realizamos frotis vaginal para tomar muestras por una semana y para establecer si su ciclo se había restablecido.

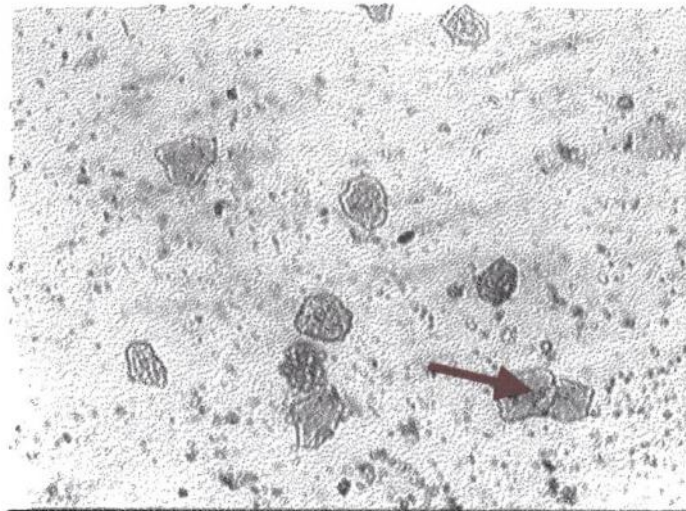
## Resultados y Discusión

Una parte muy importante de nuestro proyecto es la caracterización de las diferentes fases del ciclo estral de la rata. Como ya habíamos mencionado, el ciclo estral de las ratas consta de tres fases; diestro, estro y proestro. Al momento de observar la primera etapa del ciclo estral, el diestro, en el microscopio pudimos ver, que únicamente había leucocitos, células del torrente sanguíneo. Identificamos a los leucocitos ya que son células pequeñas, sin núcleo, no definidas y que por lo general se encuentran en aglomeraciones (v.g. la imagen1).



*Imagen 1. Etapa del Ciclo Estral - Diestro*

Identificamos el estro ya que las células de esta etapa son definidas pero aun carecen de núcleo, se puede diferenciar las células de estro de las de diestro ya que son más grandes (v.g. la imagen2).



*Imagen 2. Etapa del Ciclo Estral - Estro*

Identificamos el proestro ya que sus células presentan núcleo, se muestran muy definidas, con tamaño mayor a las de las demás fases y se encuentran más separadas(v.g. la imagen 3).

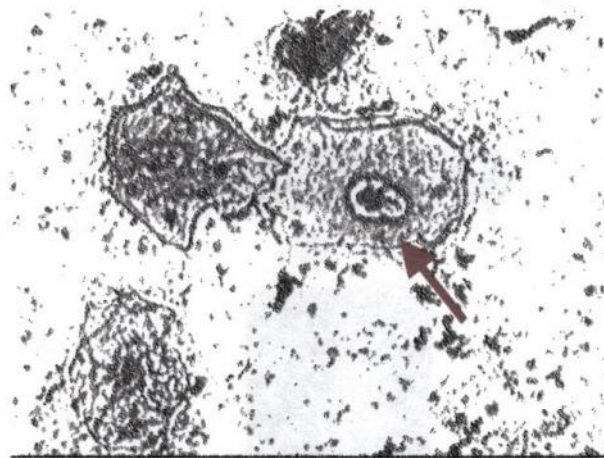


Imagen 3. Etapa del Ciclo Estral – Proestro

En el primer mes, las ratas presentaron un ciclo irregular (v.g tabla 1 en el anexo); sin embargo, lo importante fue que las tres ratas presentaron claramente las diferentes etapas del ciclo estral (v.g fig. 1). Las ratas, al estar en condiciones controladas, no mostraban ninguna anomalía, siempre estaban muy tranquilas.

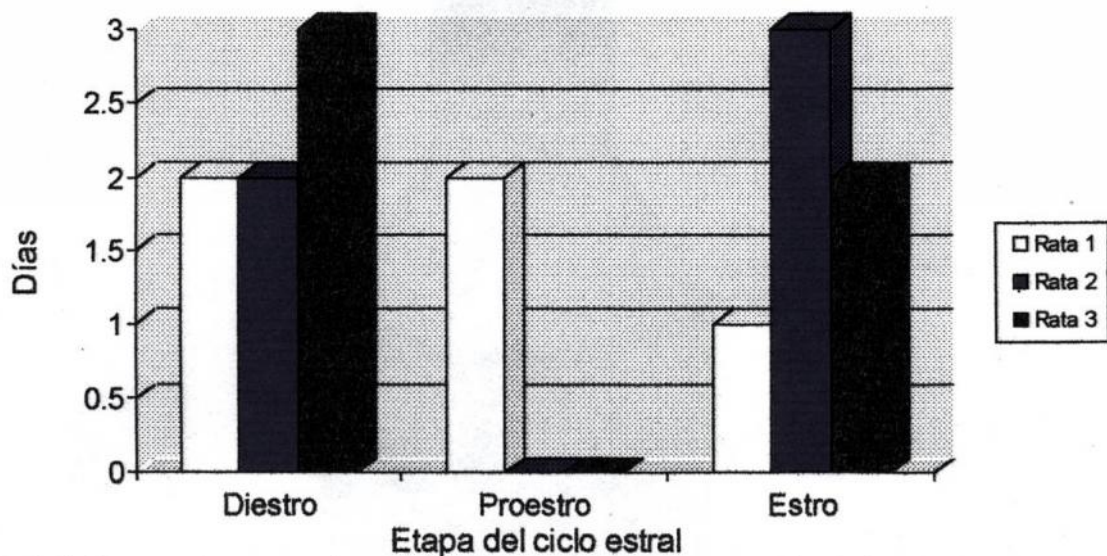
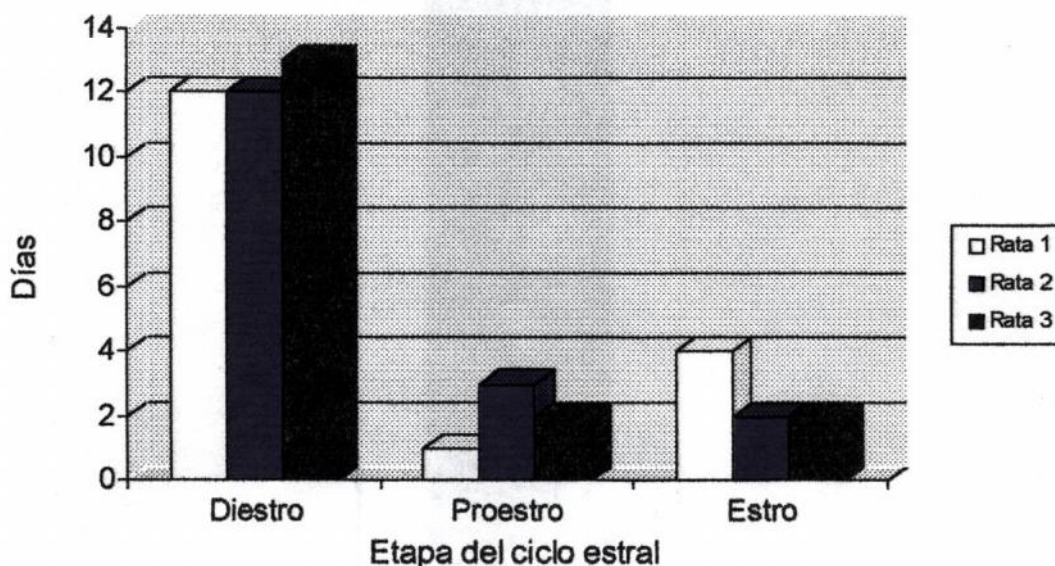


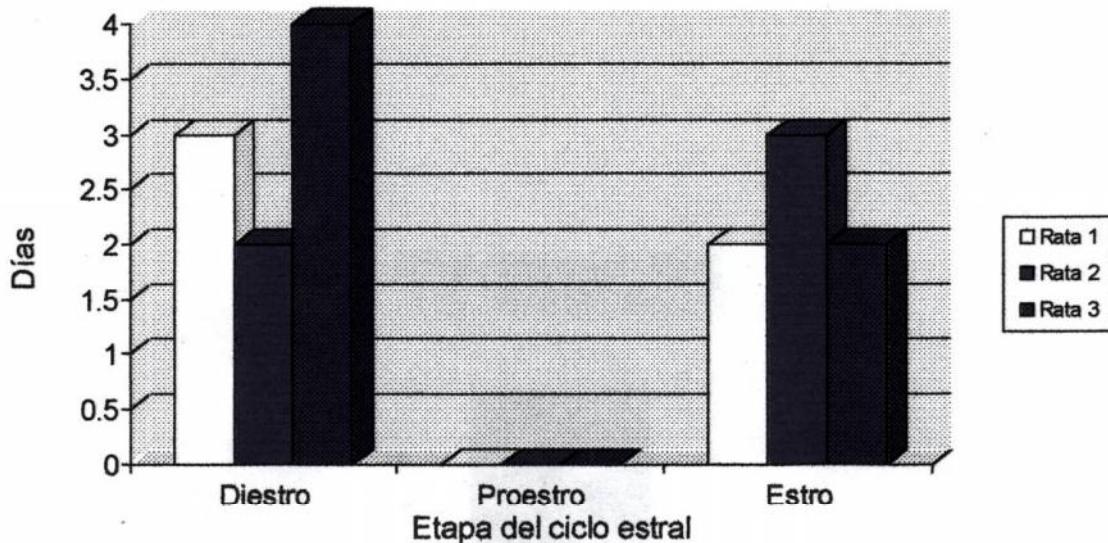
Fig.1 Gráfica en la que podemos observar que las ratas si están ciclando durante el mes de febrero 2004.

En la primera semana del segundo mes (después de haber sido sometidas a estrés) las ratas todavía no presentaban alteraciones en su ciclo estral (v.g tabla 2 en el anexo). Por esta razón decidimos esperar a que las ratas se estresaran más. Durante el tiempo de espera, las ratas ya presentaban algunos cambios, estaban muy nerviosas, siempre estaban en la esquina una sobre otra, o debajo del alimento tratando de que les diera la menos luz posible. Nos esperamos una semana y a la tercera semana volvimos a tomar muestras. Nos costó mucho trabajo tomarlas ya que no se dejaban agarrar. Al obtener estas muestras pudimos observar que las tres estaban en diestro. Sabemos que el diestro es la etapa en la cuál las ratas no son fértiles y permanecieron así el resto del tiempo, esto es, 7 días más. (v.g fig. 2)



*Fig. 2 En esta gráfica se puede observar como durante los meses de marzo y abril en el que hubo estrés el ciclo fue alterado ya que presentaron en su mayoría solo una etapa del ciclo: diestro.*

En el tercer y último mes, las ratas fueron regresadas al ambiente controlado. Dejamos pasar dos semanas antes de tomar las primeras muestras para así darles tiempo para adaptarse. Al momento de tomar las primeras pruebas notamos a las ratas cansadas. Cuando realizamos el frotis nos pudimos dar cuenta que lentamente recuperaban el ciclo estral, ya que presentaban más de una fase. (v.g. fig. 3 y la tabla 3 en el anexo)



*Fig. 3 En esta grafica podemos observar también las diferentes etapas del ciclo y se demuestra que las ratas nuevamente están ciclando.*

## Conclusiones

Quando las ratas se encuentran en un ambiente controlado, su ciclo estral presenta tres etapas; estro, pro estro y diestro; sin embargo, al estar bajo estrés, la rata permanece en una sola etapa de su ciclo, el diestro, esto quiere decir que la rata suspende su ciclo. Por lo cuál concluimos que efectivamente el ciclo estral sufre modificaciones bajo condiciones de estrés.

## Agradecimientos

Agradecemos el apoyo y la asesoría de la doctora Elizabeth Mata del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Al doctor Enrique Galindo por su cooperación y sugerencias. También queremos agradecer a nuestras familias por apoyarnos económicamente.

## Bibliografía

- Test, J. (1998) *Improving the Lives of Laboratory Animals*, Canadian Council of Animal Care, [http://ccac.ca/english/gui\\_pol/guides/spanish/V1\\_93/chap/CHVII.HTM](http://ccac.ca/english/gui_pol/guides/spanish/V1_93/chap/CHVII.HTM) ( 26 Febrero de 2004)
- Burgos, M., Martínez, C. (1984) *La Rata de Laboratorio Manual*, Ed. Departamento de Prensa y Difusión de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM, p.3.
- Encarta (1998) "Estrés" 1993-1997 Microsoft Corporation.
- Lawson, P. (1986) *Alat Manual de Entrenamiento Técnico Auxiliar de Animales del Laboratorio*, Ed. American Association for Laboratory Animal Science, 17:121-123.
- Vega, M.(2000) *Reproducción de Animales en el Laboratorio*, Portal Veterinario, <http://www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle&artid=7> (26 Febrero de 2004)
- Zúñiga, J., Tur, J., Milocco, S., Pineiro, R. (2001) *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*, Ed. McGraw-Hill-Interamericana, pag. 33-34.

## Anexo

Tabla 1: En esta tabla podemos observar las ratas en ambiente controlado en el mes de Febrero 2004

	Feb. 9	Feb. 10	Feb. 11	Feb. 12	Feb. 13
<b>Rata 1</b>	Diestro	Proestro	Diestro	Estro	Proestro
<b>Rata 2</b>	Diestro	Estro	Estro	Diestro	Estro
<b>Rata 3</b>	Diestro	Estro	Estro	Diestro	Diestro

Tabla 2. En estas tablas podemos observar en que etapa se encontraba cada una de las ratas durante los meses de marzo (a) y abril (b) del 2004. Se puede observar que predomina el diestro en la mayoría mostrando el ciclo alterado de las ratas.

a)

	Marzo 22	Marzo 23	Marzo 24	Marzo 25	Marzo 26
<b>Rata 1</b>	Estro	Estro	Proestro	Estro	Estro
<b>Rata 2</b>	Estro	Proestro	Estro	Proestro	Proestro
<b>Rata 3</b>	Estro	Proestro	Diestro	Proestro	Estro

b)

	Abril 8	Abril 12	Abril 13	Abril 14	Abril 15	Abril 16
<b>Rata 1</b>	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
<b>Rata 2</b>	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
<b>Rata 3</b>	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro

	Abril 19	Abril 20	Abril 22	Abril 23	Abril 26	Abril 27
<b>Rata 1</b>	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
<b>Rata 2</b>	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
<b>Rata 3</b>	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro

Tabla 3. En esta tabla se puede observar que las ratas después de volver a su ambiente controlado vuelven a ciclar.

	Mayo 11	Mayo 12	Mayo 13	Mayo 14	Mayo 15
<b>Rata 1</b>	Diestro	Diestro	Estro	Estro	Diestro
<b>Rata 2</b>	Diestro	Estro	Estro	Diestro	Estro
<b>Rata 3</b>	Diestro	Diestro	Diestro	Estro	Diestro

Foto 1: Caja de ratas.

