

Originales

Procedimientos utilizados en el estudio de eventos angiogénicos en membrana corioalantoidea de embriones de pollo sometidos a radiaciones ultravioletas

Diego Camps^{1,*}, María Elena Samar², Rodolfo E. Ávila³.

¹ IP^a Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología - Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba – Argentina.

² Profesora Titular de la Cátedra A de Histología – Facultad de Odontología – Universidad Nacional de Córdoba – Argentina.

³ Profesor Adjunto de la IP^a Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología - Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba – Argentina.

*Correspondencia: Dr. Diego Camps. Dirección: San Nicolas 475 - Córdoba – Argentina. Código Postal: X5000.

Email: diecamps@gmail.com

Archivos de Medicina 2008, 4(4):1 doi: 10.3823/006

Artículo disponible en: <http://www.archivosdemedicina.com>

© 2008 Camps et al; Esta obra está bajo licencia de [Creative Commons](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Introducción: Los eventos angiogénicos se encuentran asociados a numerosos fenómenos biológicos. Las radiaciones han sido utilizadas clínicamente para combatir el desarrollo tumoral. Un modelo in vivo que nos permite observar los efectos de radiaciones es la membrana corioalantoidea (CAM), ampliamente utilizado en estudios de angiogénesis. El objetivo del presente trabajo es describir diferentes procedimientos usados en un proyecto de investigación sobre el estudio de eventos angiogénicos en CAM de embriones de pollo sometidos a radiaciones ultravioletas. **Materiales y Métodos:** Se usaron embriones de pollo de 7 días de incubación, que se dividieron: - Huevos controles, que no recibieron radiación. - Huevos problemas, que fueron irradiados. Se obtuvieron CAM para: controles de rutina, histoquímica, lectinohistoquímica, y análisis morfométrico. **Resultados:** Nos propusimos tres etapas. En el desarrollo de la primera etapa realizamos: 1- Incubación de los huevos. 2- Control de viabilidad. 3- Irradiación. 4- Disección y fijación de embriones y CAM. 5- Fotografía. **Conclusión:** La realización de estos estudios sobre angiogénesis nos permitirán obtener información sobre los mecanismos de control y su extrapolación a los procesos patológicos.

Proceedings in study of angiogenics events in chick embryo chorioallantoic membrane subjected to ultraviolet radiations

Introduction: Angiogenic events are associated with many biological phenomena. The radiation has been used clinically to combat tumor development. An in vivo model that allows us to observe the effects of radiation is chorioallantoic membrane (CAM), which is widely used in studies of angiogenesis. The objective of this paper is to describe different procedures used in a research project on the study of angiogenic events in chick embryos CAM subjected to ultraviolet radiation. **Methods:** Were used 7 days chicken embryos, divided in: - Eggs controls, which did not receive radiation. - Eggs problems, which were irradiated. CAM was obtained for: routine checks, histochemistry, lectinohistochemistry and morphometric analysis. **Results:** We tried three stages. In the development of the first stage made: 1 - Incubation of the eggs. 2 - Control viability. 3 - Irradiation. 4 - Dissection and fixation of embryos and CAM. 5 - Photograph. **Conclusion:** The completion of these studies on angiogenesis will enable us to obtain information about the monitoring mechanisms and their extrapolation to the pathological processes.

Introducción

Los eventos angiogénicos se encuentran asociados a numerosos fenómenos en los primeros estadios del desarrollo embrionario, en la reparación y cicatrización de heridas, alteraciones oculares y en crecimiento y desarrollo tumoral. Es por esto que podemos pensar que controlando la angiogénesis podemos también controlar los eventos patológicos a los que se encuentra asociada (1-3).

Se llama radiación a toda energía que se propaga en forma de onda a través del espacio. En el concepto radiación se incluye a las radiaciones no ionizantes como los rayos Ultravioletas (UV), Infrarrojos (IR) y laser (4, 5).

Las radiaciones han sido utilizadas clínicamente para combatir el desarrollo tumoral, como una herramienta más en la terapéutica de neoplasias. El conocimiento de los efectos de las radiaciones sobre los tumores, específicamente sobre su vascularización, nos lleva a intentar resolver interrogantes y promover nuevas técnicas irradiativas (6).

Diversos estudios proponen la posibilidad que la antiangiogénesis nos permita controlar la evolución natural de tumores, especialmente los malignos, y es por ello que es imperativo estudiar con profundidad la influencia de elementos externos al organismo, en este caso radiaciones, para poder brindar respuestas a interrogantes que envuelven a las neoplasias (6,7).

Un modelo in vivo que nos permite observar los efectos de radiaciones es la membrana corioalantoidea (CAM), ampliamente utilizado en estudios de angiogénesis, y de este modelo Ribatti y col (8, 9) y Richardson y col. (10) resaltan su utilidad para examinar fenómenos angiogénicos y antiangiogénicos por su bajo costo, la facilidad en su preparación y la ausencia de un sistema inmune maduro. Además, Auerbach y col. (11) describe la importancia de realizar estudios en modelos in vivo, como en CAM.

La radiación UV se encuentra formando parte de la luz. Según su longitud de onda se reconocen grupos A (entre 400 – 320 nm), B (320 – 290 nm) y C (290 – 200 nm). Las fuentes de radiación ultravioleta son naturales (el sol) y artificiales (hospitales, industrias, cosmética, etc.). La radiación UV C no alcanza la superficie terrestre, ya que queda retenida por la capa de ozono en la estratósfera. La radiación natural que nos llega es UVA y UVB. Los UV C son los más peligrosos para la salud por su mayor energía (12).

Las radiaciones UV ejercen actividad sobre el núcleo, estructura celular más sensible a las radiaciones. En él se almacena la información genética dentro de la molécula de ADN, y las mutaciones que se producen en el mismo por fallo en la reparación de los elementos dañados por los

rayos UV se denomina fotocarcinogénesis. Fuera del núcleo también hay estructuras celulares sensibles a los efectos radioinducidos (12).

Por otra parte el método científico es el conjunto de procedimientos que se utilizan para obtener conocimientos científicos, el modelo de trabajo o pauta general que orienta la investigación. El análisis de los diversos procedimientos concretos que se emplean en las investigaciones y la discusión acerca de sus características, cualidades y debilidades son importantes para determinar la calidad de los conocimientos obtenidos en los experimentos científicos (13).

El estudio de eventos angiogénicos de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo sometidos a la irradiación ultravioleta, es realizado por estudiantes de grado de la carrera de medicina y responde a la convocatoria por parte de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de nuestra Facultad de incorporar alumnos a los proyectos de investigación de las Cátedras de la Facultad de Ciencias Médicas, Carrera de Medicina, en la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Argentina.

El objetivo del presente trabajo es describir los diferentes procedimientos usados en el estudio de eventos angiogénicos en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo sometidos a radiaciones ultravioletas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron embriones de pollo de 7 días de incubación (según estadios de Hamilton y Hamburger), de raza Cobb's White Rock, provenientes de un criadero local.

- Rayos Ultravioletas fueron procedentes de una Lámpara General Electric 30 w germicida. Osram 300 w, longitud de onda: 253, 652 nm.

Los huevos embrionados se dividieron:

- Huevos controles, que no recibieron radiación, a los que se les abrió una ventana en la cáscara.

- Huevos problemas, los que fueron sometidos a irradiación, durante 5 minutos, a través de una ventana abierta en la cáscara.

Luego, los huevos embrionados fueron mantenidos durante 24 hs. en incubadora para su posterior estudio histológico.

Se obtuvieron Membranas Corioalantoidea para:

- Controles de rutina con técnica de Hematoxilina y Eosina.

- Histoquímica con PAS, para demostración de glicoproteínas en membranas basales y glicocáliz de endotelios vasculares.

- Determinación de oligosacáridos fucosados por medio de la lectina biotilada UEA-1 como marcador de endotelio vascular.

- Análisis morfométrico: se efectuará el registro de diámetro de la luz vascular y espesor de la pared en vasos

precapilares, capilares y postcapilares; cuantificación de vasos pre y post capilares en controles e irradiados.

El Analizador de imágenes pertenece al Área de Biología Oral (Facultad de Odontología, UNC), con el programa Image ProPlus, conectado a un fotomicroscopio Olympus Bx50 y a una cámara de video Sony.

RESULTADOS

Nos propusimos para el estudio de eventos angiogénicos de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo sometidos a radiaciones ultravioletas, tres etapas:

- Primer etapa: Puesta a punto del diseño experimental. Primeras aplicaciones de radiaciones UV e IR.

- Segunda etapa: Recolección del material irradiado y comparación con los controles.

-Tercera etapa: Nuevas aplicaciones de radiaciones UV e IR en el modelo con parámetros establecidos en la primer etapa.

-Cuarta etapa: Recopilación de datos microscópicos, estadísticos e informáticos.

En el desarrollo de la primera etapa realizamos los siguientes procedimientos:

1- Se obtuvieron 12 huevos fértiles de un criadero local, raza Cobb's White Rock y se colocaron en una incubadora a fin de lograr su desarrollo embrionario hasta los 7 días de incubación.

2- Usamos un Ovoscopio para determinar la viabilidad y controlar la edad para según estadios de Hamilton y Hamburger (Figura 1).

El Ovoscopio, es un instrumento que nos permite ver a través de la luz si el huevo esta fertilizado o no descartando los infértiles porque se ven claros, en cambio en los fértiles los vasos sanguíneos le dan el color rojo propio de la vascularización (lo que indica que en el huevo empieza a formarse un embrión de pollo).

3- Nosotros al quinto día de incubación de los huevos realizamos la primera observación en el ovoscopio, En nuestro experimento resultaron el 100 % fértiles.

4- Luego de controlar la vitalidad de los huevos embrionados, realizamos a los siete días una ventana en la cáscara del huevo dividiéndolos en dos grupos: (Figura 1)

a- Huevos controles, que no recibieron radiación, pero poseían la ventana en la cáscara.

b- Huevos problemas, los que fueron sometidos a irradiación, durante 5 minutos, a través de la ventana abierta en la cáscara. Los rayos ultravioletas procedieron de una Lámpara General Electric 30 w germicida. Osram 300 w, longitud de onda: 253, 652 nm., ubicada por arriba de la ventana a 15 centímetros de altura. (Figura 1 y 2)

Sobre las aberturas de las cáscaras de los huevos controles y problemas se colocaron apósitos estériles (BAND-AID, Jhonson & Jhonson).



5- Luego, los huevos embrionados, controles y problemas, fueron mantenidos durante 24 hs. en incubadora para su posterior estudio histológico.

Para diseccionar los embriones se utilizaron instrumental quirúrgico aséptico. Utilizamos diferentes placas de Petri que poseían solución fisiológica de cloruro de sodio (Os molaridad: 290 mOs/m/l). En las mismas se colocaron los embriones con o sin membrana corioalantoidea.

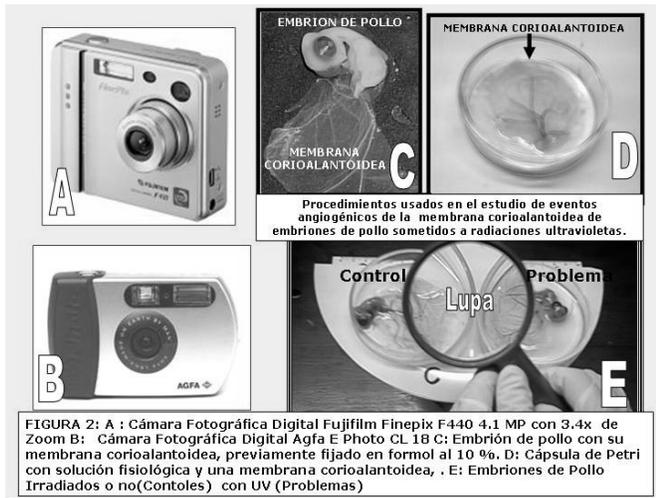
6- Posteriormente se fijaron en Solución de Bouin y en formol al 10 % V/V tamponado, ambos de laboratorios BIOPUR.

7- Se fotografiaron los diferentes pasos de disección de los huevos embrionados. De esa manera capturamos imágenes digitales de las membranas corioalantoideas y de los embriones (tanto de los controles como de los problemas).

Se usaron las siguientes Cámaras Fotográficas Digitales: a- Fujifilm Finepix F440 4.1 MP con 3.4x de Zoom b- Cámara Fotográfica Digital Agfa E Photo CL 18 (Figura 2).

El ordenador fue un COMPAQ DESKPRO con Procesador Intel Pentium III (586), 128 MB. El software utilizado fue Windows 98, E Photo CL 18 TWWIN diver, Corel Draw 9.

También realizamos capturas de imágenes con cámaras fotográficas convencionales que poseían sistemas electrónicos. Usamos la cámara Asahi Pentax ME SUPER con lente MACRO 2.5. La película negativa color usada fue Fuji 100 asas.



DISCUSIÓN

En trabajos previos, establecimos la secuencia de cambios morfológicos, bioquímicos e histoquímicos que ocurren durante la diferenciación y crecimiento de la lengua, el estómago, el mesonefros y los ovarios tanto in ovo como in vitro. Estos trabajos nos llevaron a obtener resultados preliminares referentes a la acción de las radiaciones no ionizantes sobre los diferentes tejidos del embrión de pollo (2-5, 14).

Por otra parte, cabe destacar que el tiempo de exposición y la cantidad de dosis de radiaciones no ionizantes utilizadas en los animales de experimentación y en la práctica médica aún no están del todo constatados. Nosotros, en nuestro modelo experimental hemos controlado los aspectos cuantitativos de las radiaciones y nos permitieron concluir que los rayos UV aceleran los procesos de regresión normal o fisiológica del mesonefros, alterando la producción de los glicoconjugados presentes en la etapa funcional de este órgano. Además, los daños se producirían inmediatamente a la irradiación dado que aparecen en los dos modelos experimentales utilizados (1-5).

En el presente trabajo los alumnos participaron activamente en los diferentes procedimientos realizados en una primera etapa del proyecto de investigación relacionados con el estudio de eventos angiogénicos de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo sometidos a radiaciones ultravioletas. El introducir al joven en la investigación tiene como ventaja permitirle adquirir una mentalidad científica que lo capacite para la discusión diagnóstica y terapéutica sobre una base objetiva, en lugar de limitarse a la observación empírica,

supeditada muchas veces a elementos subjetivos que, por su misma naturaleza, son inseguros. En trabajos previos se han documentado la experiencia que adquieren los alumnos y la utilidad que tiene para ellos realizar este tipo de actividades (15-18).

Todas las actividades de los diferentes procedimientos fueron capturadas mediante cámaras fotográficas clásicas y digitales. La imagen digital es un producto del desarrollo de la informática que tiene como antecedente a la fotografía (19). Es así que se seleccionaron cada una de las imágenes a guardar en una base de datos para su estudio informático. La calidad fotográfica lograda con la película o film negativo de color fueron de mejor resolución que las brindadas por la cámaras digitales. Por ello se escanearon las fotos de papel o diapositivas.

Si aceptamos que la investigación es un proceso de construcción del conocimiento científico, éste representa su resultado, que se logra mediante la utilización de métodos, técnicas y procedimientos científicos.

De esta manera podemos expresar que el fin de la educación es la formación integral del ser humano y las aptitudes que el estudiante adquiere en cada experimento científico resultarán indispensables para alcanzar esa noble meta.

Además, la realización de estos estudios sobre angiogénesis nos permitirán obtener información sobre los mecanismos de control y su extrapolación a los procesos patológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Camps D, Recuero Y, Samar ME, Avila RE. Modificaciones de glicoconjugados en vasos sanguíneos de membrana corioalantoidea de embriones de pollo sometidos a radiaciones no ionizantes. Serie Monográfica y Didáctica (Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, UNT, Tucumán) 2004; 44: 42.
- 2- Avila RE, Samar ME, De Fabro SP, Leguina M, Juri HO. Histologic changes produced by non ionizing radiation in the chick embryo. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba 1994; 52(1):27-30.
- 3- Samar ME, Avila RE, Juri H. Histological changes produced by He-Ne laser on different tissues from chick embryo. J Clin Laser Med Surg 1993; 11:87-89.
- 4- Avila RE, Samar ME, Parisi de Fabro S. Structural, ultrastructural and cytochemical study of the mesonephros in the chick embryo. Arch Esp Urol 1985; 38(1):1-8.
- 5- Avila RE, Samar ME, Juri HO, de Fabro SP. Effects of He-Ne laser irradiation on chick embryo mesonephros. J Clin Laser Med Surg 1992; 10(4):287-90.
- 6- Wild-Bode C, Weller M, Rimmer A, Dichgans J, Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. Cancer Res 2001; 61(6):2744-50.
- 7- Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. Pharmacol Rev 2000; 52(2): 237 - 268.
- 8- Ribatti D, Vacca A, Rainieri G, Sorino S, Roncali L. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo

- wound healing model. *Pathol Res Pract* 1996; 192(10): 1068-76.
- 9- Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 1996; 40(6):1189-97.
 - 10- Richardson M, Singh G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003; 3(2):155-85.
 - 11- Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Dubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 2003; 49(1):32-40.
 - 12- Jackson SP. Detection, signaling and repairing DNA double strand breaks. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(6):655-61.
 - 13- Samar ME, Avila RE, Peñaloza Segura MF, Cañete MG. 2003. 'Guía para la elaboración y publicación de artículos científicos y la recuperación de la información en Ciencias de la Salud'. Córdoba. Publicaciones UNC (Secretaría de Extensión Universitaria).
 - 14- Avila RE, Plivelic T, Samar ME, Benavidez E. Diseño de un sistema de detectores térmicos aplicado en huevos embrionados de pollo, irradiados con rayos infrarrojos. *Rev Fac Cienc Med Univ Nac Córdoba* 1996; 54: 13-18.
 - 15- Avila RE, Camps D, Recuero Y, Samar ME. Pasantía de Estudiantes de Grado de la Carrera de Medicina en Laboratorios de Investigación Biomédica: Nuestra experiencia 2000-2003. Serie Monográfica y Didáctica (Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, UNT, Tucumán) 2004; 44: 12.
 - 16- Recuero Y, Camps D, Avila RE, Samar ME. Evaluación del curso 'Pasantía en laboratorios de investigación biomédica'. V Jornadas de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas. 2 y 3 de Diciembre de 2004, Córdoba, Argentina.
 - 17- Morales Lopez S, Petra Micu I, Ibarra T. EL laboratorio de investigación en la formación del estudiante del primer año de medicina. *Rev Fac Med UNAM* 2002; 45 (1): 7-11.
 - 18- Samar ME, Avila RE. Proposal: education of human resources in basic biomedical sciences. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba* 1994; 52(2):31-2.
 - 19- Snider DM, Andrews MJ. An inexpensive method for quantitative data collection from photographic prints. *Meas Sci Technol* 1995; 6: 502-506.