

# Método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo: una alternativa en la experimentación toxicológica y farmacológica

## Hen's egg test on chorioallantoic membrane: an alternative in the toxicological and pharmacological experimentation

Yanaysis Stable- García<sup>a\*1</sup>, Zullyt Zamora- Rodríguez<sup>b2</sup>, Asela Fernández- García<sup>3a</sup>.

<sup>a</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Unidad de Productos Ozonizados, Departamento de Estudios Biológicos, La Habana, Cuba. yanaysis.stable@cnic.cu.

<sup>b</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Unidad de Productos Naturales, Departamento de Farmacología experimental, La Habana, Cuba.

**Recibido:** 10 de agosto de 2020;

**Aceptado:** 25 de noviembre de 2020;

### RESUMEN

El método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo constituye un método alternativo para los ensayos toxicológicos y farmacológicos. La introducción de este ensayo supone una estrategia experimental para el desuso animal, dado que en Cuba se exige el cumplimiento de las regulaciones internacionales sobre la ética y la seguridad de los animales de laboratorio en los estudios farmacológicos y toxicológicos mediante los principios de Reemplazar, Reducir, Refinar. El objetivo de este trabajo de revisión es caracterizar el método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, así como describir el método y las ventajas que aporta el ensayo como alternativa al uso de animales de experimentación. Para ello se recopiló toda la información publicada que se encontró disponible en la base de datos de PubMed. Se realizó una breve descripción enfocada en la estructura y en el método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, así como de los ensayos toxicológicos y farmacológicos que utilizan dicha estructura. Además, se realizó un análisis en cuanto al alcance de los resultados del ensayo y acerca de las bases que propician la introducción del ensayo en los modelos experimentales. Este documento resume de forma organizada todos los resultados que aseguran y sustentan el beneficio de la introducción del método en los ensayos toxicológicos y farmacológicos. Se concluye que el método de la membrana corioalantoidea constituye una alternativa segura para los ensayos toxicológicos y farmacológicos y favorece la implementación de las “tres erres”.

**Palabras claves:** membrana corioalantoidea del embrión de pollo, toxicología, farmacología.

### ABSTRACT

Hen's egg test on chorioallantoic membrane is an alternative method for toxicological and pharmacological tests. The introduction of this test supposes an experimental strategy for animal disuse, since Cuba requires compliance with international regulations on ethics and safety of laboratory animals in pharmacological and toxic studies through the principles of Replace, Reduce, Refine. The objective of this review work is to characterize the hen's egg test on chorioallantoic membrane, as well as to describe method and the advantages that assay provides as an alternative to use of experimental animals. For this, all the published information that was available in the PubMed database was collected. A brief description was made focused on the structure and hen's egg test on chorioallantoic membrane, as well as the toxicological and pharmacological tests that use said structure. In addition, an analysis was carried out regarding the scope of the test results and about the bases that favor the introduction of the test in the experimental models. This document summarizes in an organized way all the results that ensure and support the benefit of the introduction of the method in toxicological and pharmacological tests. It is concluded that the chorioallantoic membrane method constitutes a safe alternative for toxicological and pharmacological tests and favors the implementation of the “three R's”.

**Keywords:** chorioallantoic membrane of chick embryo; toxicology; pharmacology.

<sup>1</sup> <https://0000-0002-5441-6795>

<sup>2</sup> <https://0000-0002-9387-3761>

<sup>3</sup> <https://0000-0002-1043-5505>

## INTRODUCCION

El método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM, siglas en inglés)) constituye uno de los ensayos *in vitro* ideal para el análisis toxicológico y farmacológico de productos tópicos (Kishore, Surekha, Sekhar, Srinivas & Murthy, 2008; Lokman, Elder, Ricciardelli & Oehler, 2012). Este método se basa en la evaluación macroscópica de los cambios que ocurren en la membrana después de la aplicación de la sustancia de ensayo (Thompson & Reid, 2000). Específicamente el HET-CAM puede ser empleado como alternativa al método clásico toxicológico de Draize en conejos, ya que permite identificar los efectos tóxicos e inmediatos de una sustancia de ensayo, a través de la aplicación del producto sobre la HET-CAM (Liebsch & Spielmann, 2002; Ribatti, Vacca, Roncali & Dammacco, 2000; Ribatti, 2012).

La membrana corioalantoidea del embrión de pollo es una membrana vascularizada que rodea al embrión. Sus características estructurales lo hacen similar a los tejidos altamente vascularizados como la conjuntiva, rasgo que lo hace capaz de responder frente a productos irritantes (Ribatti *et al*, 2000; Ribatti, Nico, Vacca, Roncali, Burri & Djonov, 2001).

El HET- CAM ha sido utilizado de manera efectiva por varias disciplinas, incluida la biología, la medicina y la bioingeniería, para determinar las respuestas vasculares y evaluar cuestiones relacionadas con la morfogénesis y la fisiología de los vasos sanguíneos y linfáticos. Dado el grado de vascularización que presenta esta membrana, la hace accesible para determinar incluso la distribución de moléculas a través de los vasos sanguíneos (Nowak, Segura & Arispe, 2014).

En este sentido, el elemento principal que justifica el empleo de esta prueba se basa en las consideraciones éticas alrededor del uso de animales de experimentación, además de la simplicidad, sensibilidad, fácil ejecución y el relativo bajo costo de este método (Thompson & Reid, 2000). Por lo que, el objetivo general de este trabajo es realizar un análisis teórico sobre el alcance de la prueba del HET-CAM como método alternativo toxicológico y farmacológico.

### Fundamento del método “*in vitro*” basado en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo

Durante muchos años, numerosos laboratorios en el mundo han incorporado el método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (HET- CAM) para la evaluación de la irritación ocular; por su rapidez, simplicidad, sensibilidad, fácil ejecución y su relativo bajo costo (Kue, Ta, Lam & Lee, 2015).

El ensayo de la membrana corioalantoidea (CAM) es una prueba propuesta por Luepke (1985), (Luepke, 1985), modificada por Spielmann (1992), (Spielmann, 1992), que permite estimar *in vitro* y *ex vivo* el potencial de irritación ocular de sustancias y productos terminados, y según el interés del investigador esta prueba puede tener un alcance toxicológico o farmacológico.

El ensayo de la CAM se basa en la aplicación de un producto sobre la CAM. Básicamente, se observan los efectos inmediatos que ocasiona la sustancia en ensayo sobre los vasos sanguíneos de la CAM de huevos de gallina Leghorn de 10 días de incubación. El hecho de solo utilizar huevos de no más de 10 días de fecundados, está dado por el desarrollo del sistema nervioso del embrión, ya que, a partir de ese tiempo, el sistema nervioso está lo suficientemente desarrollado como para sufrir dolor. Los efectos observados en las estructuras vasculares de la CAM poseen una alta correlación con los efectos irritantes observables en la estructura ocular del conejo (Nowak *et al*, 2014).

### Estructura de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo

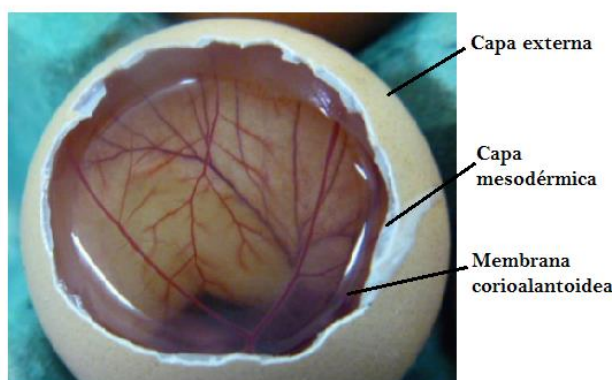
La CAM se desarrolla de manera similar a la alantoides en los mamíferos, ya que las capas mesodérmicas del alantoides y el corion se fusionan para formar dicha membrana. Inicialmente, es un tejido que carece de estructuras vasculares en su interior, aunque rápidamente se forma de manera jerárquica un complejo plexo vascular de dos arterias alantoides y una vena alantoidea. Esta estructura logra expandirse rápidamente y ello genera una red vascular rica que proporciona una interfaz para el intercambio de gas y desechos (Nowak *et al*, 2014).

El crecimiento de la CAM ocurre a partir del tercer día del desarrollo embrionario completándose hasta el décimo día, sin embargo, solo se diferencia por completo en el día 13. Este crecimiento requiere tasas impresionantes de división celular con ciclos celulares cortos (Nowak *et al*, 2014).

Específicamente, la vesícula alantoidea se agranda rápidamente a partir del cuarto día y hasta el décimo de incubación, y es durante este proceso donde ocurre la fusión entre la capa mesodérmica del alantoides y la capa mesodérmica adyacente del corion. La CAM se encuentra adherida a la superficie interior de la cáscara del huevo (Figura 1) y dentro de sus funciones se encuentra la eliminación del calcio y la obtención de oxígeno de la atmósfera a través de la cáscara porosa. Por lo que, la CAM funciona como el órgano respiratorio en los embriones de aves. Aunque se presta la mayor atención al sistema vascular, es importante enfatizar que la CAM tiene un sistema linfático completamente desarrollado que posee notables similitudes funcionales y moleculares con los linfáticos de mamíferos (Papoutsi *et al*, 2001).

Histológicamente, CAM consta de dos láminas epiteliales que limitan una capa delgada de estroma. El epitelio superior es de origen ectodérmico, mientras que el estroma y el epitelio inferior son de origen mesodérmico y endodérmico, respectivamente. Es dentro del estroma donde residen los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. De esta manera, resulta crucial reconocer el epitelio y llegar a los vasos en el estroma (Nowak *et al*, 2014).

Además, es de vital importancia no confundir la CAM con la membrana de la yema, que también está muy vascularizada. Esta segunda membrana está asociada con la yema y tiene propiedades distintas, aunque ambas membranas son fácilmente distinguibles en los embriones jóvenes y menos perceptibles que en un embrión más viejo (Nowak *et al*, 2014).



*Fig. 1. Estructura del embrión de pollo.*

### **Alcance de los resultados de ensayos en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo**

Debido al rápido crecimiento vascular que caracteriza a la CAM, esta estructura ha sido el modelo de elección para evaluar el efecto de una gran cantidad de compuestos sobre los vasos en crecimiento. La eficacia de tales compuestos se ha evaluado utilizando métodos cualitativos y cuantitativos basados en la evaluación de la morfología y densidad vascular. Inicialmente, esto se ha hecho puntuando el grado de vascularización en una escala graduada de 0-4 (Form & Auerbach, 1983). Estos compuestos han incluido factores de crecimiento (Ribatti *et al*, 2000; Ribatti *et al*, 2001), hormonas (Reuwer *et al*, 2012; Chen, Wen & Bai, 2013) moléculas naturales, agentes anticancerígenos (Adar *et al*, 2012). Además este método, ha sido empleado en los estudios de desarrollo, crecimiento y metástasis tumoral (Weiss *et al*, 2014), gases (Pipili *et al*, 2000), compuestos organometálicos (Clavel *et al*, 2014; Nazarov *et al*, 2013; Nowak *et al*, 2012), antibióticos (Hu, 1998), anticuerpos y pequeñas moléculas sintéticas (Nowak *et al*, 2012; Ribatti *et al*, 2001), el transporte de iones (Valdes, Kreutzer & Moussy, 2002; Valdes, Klueh, Kreutzer & Moussy, 2003), las terapias selectivas de oclusión vascular, la biocompatibilidad de materiales de ingeniería, la distribución de fármacos y la toxicología. A su vez, se ha demostrado el desarrollo del HET-CAM en las enfermedades respiratorias (Nowak *et al*, 2014) y la cicatrización de heridas.

Específicamente, la prueba de la HET- CAM ha mostrado un uso exitoso en la biología del cáncer y la angiogénesis tumoral. Diversos estudios han comprobado que muchas células tumorales colocadas en la CAM se injertan y siguen todos los pasos de la progresión tumoral: crecimiento, angiogénesis, invasión, extravasación y metástasis. A través de la red altamente vascularizada que ofrece la CAM se logra la viabilidad del tumor en pocos días después del injerto celular, lo que facilita posteriormente la obtención de los medios para el estudio *in vivo* acerca de la invasión de células tumorales a la luz de los vasos sanguíneos (Deryugina & Quigley, 2008).

### **Descripción de los ensayos de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo para la evaluación toxicológica y farmacológica**

El ensayo CAM se ha utilizado como una plataforma para la experimentación durante más de 50 años y en esta etapa se han desarrollado varios protocolos: *ex vivo* e *in vitro*. Debemos destacar que la elección del tipo de protocolo a utilizar, se realiza según el objetivo del estudio.

**a) Ensayo *ex vivo*:** En muchos casos, los investigadores rompen el huevo al tercer día de su fertilización y lo transfieren a una placa de Petri de 10 cm de diámetro, a este proceder se le llama cultivo *ex vivo* del embrión o cultivo de embriones sin caparazón. Este protocolo ofrece un amplio espacio de observación y manipulación, permitiendo analizar varias muestras en una sola CAM. Para este enfoque, los huevos se mantienen primero a 38 °C en una incubadora humidificada (días 0-3). Posteriormente, se hace un pequeño orificio en la cámara de aire para equilibrar la presión y el huevo se transfiere hacia una placa de Petri, manteniendo condiciones de esterilidad, puesto que la propia manipulación se asocia a baja tasa de sobrevivencia del embrión (Ribatti *et al*, 2000). Para mejorar las tasas de sobrevivencia embrionaria se deben cumplir una serie de requisitos: reducir el impacto durante el agrietamiento de la cáscara del huevo mediante el uso de una sierra circular, colocar el embrión en un espacio curvo confinado como la placa de Petri para el cultivo de este embrión, mantener la humedad en la incubadora al 98% o más, con la esterilidad recomendada. Usando estos enfoques, la viabilidad es de alrededor del 50% en el día 14 (Dohle *et al*, 2009).

**b) Ensayo *in vitro*:** El cultivo *in vitro* constituye una alternativa que mejora significativamente la supervivencia de los embriones. Los huevos fertilizados se transfieren a la incubadora equipada con un rotador automático durante tres días. El giro evita que el embrión se adhiera a las membranas de la concha, como lo haría si se deja en una posición durante demasiado tiempo. Se pueden obtener buenos resultados girando los huevos a primera hora de la mañana, durante el mediodía y a última hora de la noche. Alternativamente, el uso de un equipo automático permite un movimiento lento, pero constante de los huevos.

El proceso de cultivo *in vivo* se inicia también al tercer día de la fertilización. En este momento, debe crearse un orificio de aproximadamente 3 mm de diámetro en la cáscara del huevo con unas pinzas estériles y cubrirse con una película de laboratorio para evitar la deshidratación y posibles infecciones. Luego, los huevos se devuelven a la incubadora con una humedad relativa del aire del 65% y una temperatura de 37 °C en una posición estática hasta su uso. Esta pequeña incisión inicial cambia la presión dentro del huevo y evita la unión de la CAM con la membrana de la cáscara. En el día 7 o más tarde, el orificio se extiende a un diámetro de aproximadamente 3 cm para proporcionar acceso a la CAM. Este enfoque todavía permite la experimentación a través de una ventana y ofrece un entorno fisiológico casi sin cambios para el embrión en desarrollo (Nowak *et al*, 2014).

Dependiendo del país y las regulaciones se permite que los embriones de aves se desarrollen hasta la etapa de eclosión, generalmente en el día 21 después de la fertilización (Nowak *et al*, 2014).

### **c) Evaluación toxicológica:**

#### **c.1) Ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (HET-CAM).**

En el sistema del HET-CAM, se evalúan tres cambios en el sistema vascular: hemorragia, lisis y coagulación en la CAM al noveno día del período embrionario cuando el tejido nervioso y la percepción del dolor aún no se han desarrollado (Itagaki, Hagino & Kato, 1995).

Los huevos de gallina se incuban durante 10 días, después de ese tiempo los huevos defectuosos se descartan. Los huevos seleccionados, se colocan de forma vertical con la parte más ancha hacia arriba (zona donde se encuentra la cámara del aire). La cáscara alrededor de la celda de aire, se recorta de forma circular, utilizando unas tijeras. Esta porción de la cáscara y las membranas internas se extraen cuidadosamente para revelar la CAM. De esta manera se observa una primera membrana blanquecina, que se humedece con 2 ml de solución salina (0,9%) durante 5 min, y luego se retira la capa con una pinza metálica. Se realiza por triplicado (o sea, se emplean tres huevos por cada sustancia). Después, las sustancias de ensayo se añaden a la membrana y se dejan en contacto durante 5 min. La membrana se examina y se registra el tiempo de aparición de los cambios vasculares (coagulación, lisis y hemorragia), indicativos de lesión. El grado de irritación se obtiene de acuerdo con la gravedad y la velocidad a la que se produce el daño (Taype, 2015).

En el diseño experimental, para los grupos controles, solo se emplean dos huevos y se utiliza la solución de NaOH 0,1N o laurilsulfato de sodio (SDS) 2% como control positivo y como control negativo la solución de NaCl 0,9%; (p/v) en solución salina fisiológica, de ambas sustancias controles, también se aplican sobre la CAM 0,3 ml. Transcurrido ese tiempo (5 min) se retira el exceso de producto lavando con agua destilada y se observa la membrana para valorar la posible aparición de los fenómenos descritos anteriormente. Se anota el tiempo de aparición en segundos durante un tiempo máximo de observación de 5min (Itagaki *et al*, 1995).

El tiempo (segundos) de la aparición de hemorragia, lisis y coagulación se anota dentro de los 5 minutos y se ingresan los datos a la siguiente ecuación:

$$I.I. = ((301-TH)/300) \times 5 + ((301-TL)/300) \times 7 + ((301-TC) \times 9 / 300)$$

*Dónde:*

II = Índice de irritación\*

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

Esta fórmula brinda el promedio de los índices de irritabilidad del producto utilizado, y según la clasificación de la tabla 1, se le asigna un rango de irritabilidad.

En este ensayo, generalmente se utiliza la determinación del tiempo de reacción hasta la aparición de cada uno de los tres puntos finales. Otro método es la determinación del umbral de irritación, que evalúa la concentración del material de ensayo en el que se observan los efectos sobre estos parámetros. Considerando que estos enfoques se utilizan principalmente para sustancias transparentes, un tercer enfoque para materiales insolubles y sólidos no transparentes puede ser utilizado mediante la exposición de la CAM para analizar muestras durante un tiempo fijo (30 segundos o 5 minutos) y el análisis de los puntos finales después de enjuagar para eliminar la muestra. Se ha encontrado que el período de exposición de 5 minutos a la sustancia de ensayo es suficiente para revelar efectos tóxicos/irritantes (la exposición más amplia no parece producir cualquier información adicional) (Itagaki *et al*, 1995).

**Tabla 1.** Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método HET-CAM.

Rango de HET-CAM	Categorías de irritación
0-0,9	No irritante
1,0 – 4,9	Irritante leve
5,0 – 8,9	Irritante moderado
9,0 – 21,0	Irritante severo

*Fuente: García, Gleiby, Montes de Oca & Hidalgo, 2004; Luepke, 1985.*

### **c.2) Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular del embrión de pollo (CAMVA).**

El ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular del embrión de pollo (CAMVA, siglas en inglés) evalúa los posibles efectos perjudiciales que las sustancias irritantes oculares potenciales producen en los vasos sanguíneos de la CAM del embrión. En la preparación de este ensayo se corta una pequeña abertura en la cáscara del huevo cuatro días después de la fertilización y una pequeña cantidad de albúmina se elimina para permitir el crecimiento óptimo de la CAM. La abertura se vuelve a cerrar herméticamente y los huevos se incuban durante 6 días. El tiempo máximo de utilización de la CAM, en este ensayo se ha limitado a 10 días con el fin de cumplir con la legislación en los países de la Unión Europea que prohíbe los experimentos en embriones de pollo, mayores de 10 días (Taype, 2015).

En el décimo día, la sustancia de ensayo se aplica directamente sobre una pequeña área de la CAM. Después de la exposición durante 30 minutos se examinan los cambios vasculares en la CAM, por ejemplo, hemorragia, lisis, la aparición de vasos desprovistos de flujo de sangre (vasos fantasmas). La concentración de las sustancias en el ensayo que suscitan tales efectos

perjudiciales en el 50% de los huevos, se calcula como parámetro toxicológico. Las sustancias activas actuarán sobre las células musculares lisas para dilatar o contraer los vasos capilares. El método CAMVA se utiliza en la industria cosmética principalmente en los EE.UU. para la evaluación de la seguridad de los cosméticos. El diseño de tejidos humanos *in vitro* ha suplantado a los ensayos basados en la CAM, para las empresas (Taype, 2015).

### **c.3) Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS).**

La valoración de la posible capacidad de un producto de causar irritación ocular utilizando el método HET-CAM presenta el inconveniente de la subjetividad del experimentador a la hora de detectar la aparición de los efectos adversos. Para evitar eso, se desarrolló una nueva estrategia, el CAM-TBS que valora la capacidad del colorante azul de tripán de penetrar a través de las membranas lesionadas. En este ensayo se determina la cantidad de colorante absorbido por la CAM después de haber entrado en contacto con el producto, siendo así un método cuantitativo (Martínez, 2007).

El procedimiento experimental se basa en el protocolo INVITTOX N°108. Una vez expuesta la membrana al producto se depositan 0,5 mL de solución de azul de tripán 0,1 % en solución buffer fosfato (PBS) y se deja actuar durante 1 min. Después de este tiempo, se lava la membrana, se corta y se coloca en una placa Petri con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. A partir de aquí, el protocolo incorporó una modificación respecto al protocolo INVITTOX dado que, para determinar la cantidad de colorante adsorbido en la membrana lavada, esta se pesa y se introduce en un tubo con 5mL de formamida para extraer el colorante fijado al tejido. Cuando la formamida extrae todo el colorante, se descarta la membrana y se realiza la lectura de absorbancia de las muestras (Martínez, 2007) (Itagaki *et al*, 1995).

La absorbancia de la formamida se mide con el colorante azul de tripán y se compara frente a una recta patrón con concentraciones conocidas de este, a una longitud de onda de 595 nm. La detección del colorante absorbido por el espectrofotómetro indica la pérdida de la integridad de la CAM que es determinada mediante la ecuación siguiente:

$$CA = b \times 5/1000 \times 10^9 \text{ nmoles}$$

Dónde:

CA= Cantidad de colorante absorbido\*

b = Concentración de colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón) /mg de membrana.

\*La cantidad de colorante absorbido es el resultado del método HET-CAM TBS (cuantitativo), ya que indica el daño ocasionado en la membrana corioalantoidea que es cuantificado por el espectrofotómetro.

Para aplicar la fórmula anteriormente mencionada, primero se tiene que hallar la concentración de colorante por ploteo con la curva de azul de tripán:

$$b = ((\text{Abs} - 0,0507) / 41197) / \text{mg de tejido}$$

Luego se procede a aplicar la fórmula  $CA = b \times 5/1000 \times 10^9 \text{ nmoles}$  para determinar la cantidad de colorante absorbido.

Esta fórmula brinda el promedio de los índices de irritabilidad del producto utilizado, y según la clasificación de la tabla 2, se le asigna un rango de irritabilidad.

**Tabla 2.** Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método CAM-TBS.

Rango de HET-CAM	Categorías de irritación
0-0,9	No irritante
1,0 – 4,9	Irritante leve
5,0 – 8,9	Irritante moderado
9,0 – 21,0	Irritante severo

Fuente: *García et al, 2004.*

#### **d) Evaluación farmacológica:**

##### **d.1) Ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo en un modelo de cicatrización.**

El estudio comienza con la fertilización del embrión de pollo y de acuerdo con Hamburger & Hamilton, 1951; se incuban para el comienzo de su embriogénesis en una incubadora con una humedad relativa por debajo del 60% y 37°C.

En una etapa posterior se realiza un agujero pequeño en la cáscara de huevo de manera suave, para la apertura de esa capa y posteriormente se extrae 2-3 ml de clara de huevo para despegar la CAM de esa porción del huevo (Ribatti, Vacca, Ranieri & Roncali, 1996).

El agrietamiento realizado en la cáscara del huevo se cubre y se coloca en un recipiente de vidrio o cristal para luego ser trasladado hacia la incubadora. Posteriormente, se realiza una pequeña y profunda escisión de grosor de (1mm<sup>2</sup>) en el área de la CAM a través de la cámara de vacío directamente sobre los vasos sanguíneos más extensos con ayuda de un micrótopo bajo un microscopio Zeiss SR (Zeiss, Oberkochen, Germany). Luego, las muestras obtenidas se almacenan en una incubadora bajo condiciones estériles (Ribatti *et al*, 1996).

En este ensayo se emplea un microscopio para evaluar la respuesta proliferativa en la cámara. Pasadas las 96-120 horas después de la ejecución los embriones y sus membranas se fijan en solución Bouin. Después de fijadas las CAMs se extraen para seleccionar una porción de cada muestra seriada, y luego cada tira de 7µm se incrusta en parafina. Posteriormente se tiñen las muestras en azul de tolueno para las diferentes determinaciones (Ribatti *et al*, 1996). En este modelo se evalúa la respuesta angiogénica, teniendo en cuenta el área de escisión y las distintas áreas de la CAM, las cuales se identifican como controles sin daños. Además, se realiza el conteo de fibroblastos y se evaluó el número de vesículas pequeñas mediante el método de recuento de puntos (Ribatti *et al*, 1995).

##### **Bases que propician la introducción del método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo.**

En primer lugar, se debe destacar, que los ensayos de toxicología, siguen protocolos bien definidos (European Union, 2013). Los protocolos que se realizan *in vivo*, de acuerdo con los criterios de la Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica (OECD, siglas en inglés) tienen implícito el cumplimiento de las tres “erres” (Reemplazo, Refinamiento y Reducción) (OECD, 1987). Sin embargo, no se puede dejar de mencionar que estos métodos ocasionan graves lesiones y estrés en los animales, incluyendo las limitaciones que estos poseen, con respecto al resultado final, tal es el caso de los ensayos de irritación ocular en conejo (test de Draize) (Draize, Woodard & Calvery, 1944). Vale resaltar que estos modelos experimentales han sido desarrollados durante décadas como ensayos toxicológicos, aunque el desarrollo de estos ensayos ha sido muy criticado por la comunidad científica. La ciencia hoy en día está abocada en la implementación de otros métodos, seguros, eficaces y sencillos, que pueda reemplazar este tipo de ensayo. Dentro de las limitaciones en cuanto a los



resultados, podemos mencionar que, el ojo del conejo, aunque similar en tamaño al ojo humano, difiere de éste en numerosos aspectos, como en su estructura, el pH del humor acuoso y el grosor de la córnea. Estas diferencias en la fisiología, unida a la subjetividad que tiene el ensayo para valorar las lesiones y a la variabilidad de los resultados encontrados al ensayar un mismo producto entre distintos laboratorios, hacen lógicas las objeciones a este ensayo (Cornier, Hunter, Billimer & Farage, 1995).

Por otra parte, el Reglamento 1223/2009 elaborado por la Comisión Europea estableció la prohibición de comercializar productos cosméticos cuya formulación final, ingredientes o combinaciones de ingredientes hayan sido experimentados en animales. Consciente del trabajo y las prioridades en este campo, la Comisión Europea y las autoridades competentes, están haciendo un esfuerzo para validar científicamente métodos alternativos “*in vitro*” con el fin de llevar a cabo evaluaciones de la seguridad de los productos (Adler *et al*, 2011).

Por tanto, el modelo de la CAM posee como ventajas, que no requiere la aprobación de los protocolos para el uso de animales de laboratorio, que pueden estar mediados por las exigencias de cada país. El método garantiza el mínimo de dolor y estrés que pudiera ser provocado al embrión por la aplicación de algún producto tóxico, ya que esta técnica se debe realizar en huevos con no más de 10 días de fecundación para evitar sufrimiento (Nowak *et al*, 2014). Además, este modelo experimental minimiza el uso de animales de laboratorio, y a su vez garantiza el cumplimiento de las "3R" (Reemplazo, Refinamiento y Reducción), la CAM proporciona un excelente paso intermedio antes de la evaluación preclínica (Taype, 2015).

Además, resalta como ventaja prominente la accesibilidad y facilidad del método dado por la visualización en tiempo real del ensayo, lo cual ofrece información beneficiosa y eficiente. A su vez, permite evaluar una amplia variedad de formulaciones, ya que se pueden utilizar tanto productos líquidos, como polvos e incluso formas terminadas de los productos (Nowak *et al*, 2014).

## CONCLUSIONES

El método de la membrana corioalantoidea constituye una alternativa segura para realizar evaluaciones tanto toxicológicas como farmacológicas, pues favorece la implantación de las tres “erres”.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adar, Y., Stark, M., Bram, E.E., Nowak, S.P., Van den, B.H., Szewczyk, G., Sarna, T. *et al*. (2012). Imidazo acridinone-dependent lysosomal photodestruction: a pharmacological Trojan horse approach to eradicate multidrug-resistant cancers. *Cell Death & Disease*, 3, e293.
- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Van, B.J., Zuang, V., Ejner, A.E. *et al*. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology*, 85 (5), 367-485.
- Chen, Z., Wen, Z., & Bai, X. (2013). In vivo chick chorioallantoic membrane (CAM) angiogenesis assay. *Bio-protocol*, 3 (18), e913.
- Clavel, C.M., Paunescu, E., Nowak, S.P., Griffio, A.W., Scopelliti, R. & Dyson, P.J. (2014). Discovery of a Highly Tumor-Selective Organometallic Ruthenium (II)-Arene Complex. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(8), 3546–3558.
- Cornier, E.M., Hunter, J.E., Billimer, J. & Farage, M.A. (1995) The use of clinical and consumer eye irritation data to evaluate the low volume eye test. *Journal Toxicology*, 14(3),197-205.
- Deryugina, E.I. & Quigley, J.P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6), 1119–1130.

- Draize, J.H., Woodard, G. & Calvery, H.O. (1944). Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 82,377-390.
- Dohle, D.S., Pasa, S.D., Gustmann, S., Laub, M., Wissler, J.H., Jennissen, H.P. *et al.* (2009). Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. *Journal of Visualized Experiments*, 30(33), 1620.
- European Union. (2013). Regulation (EU) no. 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with regulation (EC) no. 1107/2009 of the European Parliament and of the council concerning the placing of plant protection products on the market. *Off. Journal European Union*, L93, 1–84.
- Form, D.M. & Auerbach, R. (1983). PGE2 and angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 172(2), 214–218.
- García, L., Gleiby, M., Montes de Oca, N. & Hidalgo, L. (2004). Estudio de irritación ocular y dérmica de *Pochonia Chlamydosporia Var. Catenulata*. *Revista de Toxicología*, 21 (2-3), 103-107.
- Hamburger, V. & Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in development of the chick embryo. *Journal Morphology*, 88, 49-92
- Hu, G.F. (1998). Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9791–9795.
- Itagaki, H., Hagino, S. & Kato, S. (1995). The Ergatt/Frame, data bank of *in vitro* techniques in toxicology. CAM-TBS test. (*Invitox Protocol 108*),1-6
- Kishore, A.S., Surekha, P.A., Sekhar, P.V., Srinivas, A. & Murthy, P.B. (2008). Hen egg chorioallantoic membrane bio-assay: an *in vitro* alternative to draize eye irritation test for pesticide screening. *International Journal of Toxicology*, 27, 449–453.
- Kue, C.S., Ta, K.Y., Lam, M.L., & Lee, H.B. (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Experimental Animals*, 64(2), 129–138.
- Liebsch, M. & Spielmann, H. (2002). Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. *Toxicology Letter*, 28 (1-3), 27-34.
- Luepke, N. (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*, 23 (2), 287-291.
- Lokman, N.A., Elder, A.S., Ricciardelli, C., & Oehler, M.K. (2012). Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 9959–9970.
- Martínez, O. (2007). Marcadores de irritación en modelos celulares y organotópicos alternativa a los ensayos *in vivo*, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácidos. [Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico]. Barcelona. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia, Departamento de Fisiología. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/1833#page=1>.
- Nazarov, A.A., Baquie, M., Nowak, S.P., Zava, O., Van Beijnum, J.R., Groess, M. *et al.* (2013). Synthesis and characterization of a new class of anti-angiogenic agents based on ruthenium clusters. *Scientific Reports*, 3,1485.
- Nowak, S.P., Storto, M., Cataudella, T., Ballini, J.P., Gatz, R., Giorgio, M. *et al.* (2012). Angiogenesis inhibition by the maleimide-based small molecule GNX-686. *Microvascular Research*, 83, 105–110.
- Nowak, S.P., Segura, M.T. & Arispe, L.I. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 7 (4), 779–804.
- OECD. (1987). Guideline for Testing of Chemicals: Guideline No. 405: acute eye irritation/corrosion. OECD Publication Office, Paris, 1987.
- Papoutsis, M., Tomarev, S.I., Eichmann, A., Prols, F., Christ, B. & Wilting, J. (2001). Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane. *Developmental Dynamics*, 222(2), 238–251.

- Pipili, S.E., Kritikou, S., Papadimitriou, E., Athanassiadou, A., Flordellis, C., & Maragoudakis, M.E. (2000). Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *British Journal of Pharmacology*, 129(1), 207–213.
- Reuwer, A.Q., Nowak, S.P., Mans, L.A., Van der, C.M., Von der, J.H., Twickler, M.T. *et al.* (2012). Functional consequences of prolactin signaling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(9), 2035–2048.
- Ribatti, D. (2012). Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Methods In Molecular Medicine*, 843, 47–57.
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P.H. & Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anatomical Record*, 264 (4), 317–324.
- Ribatti, D., Urbinati, C., Nico, B., Rusnati, M., Roncali, L. & Presta, M. (1995). Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Developmental Biology*, 170, 39-49.
- Ribatti, D., Vacca, A., Ranieri, S. & Roncali, L. (1996). The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as an *in vivo* Wound Healing Model. *Pathology*, 192, 1068-1076.
- Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L. & Dammacco, F. (2000). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 1(1), 73–82.
- Spielmann, H. (1992). Protocolo INVITOX No. 47: HET-CAM Test. ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission JRC. Sitio web: <http://ecvam-sis.jrc.it>
- Taype, E. E. (2015). Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4474/Taype\\_ee.pdf?sequence=1](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4474/Taype_ee.pdf?sequence=1)
- Thompson, W.D & Reid, A. (2000). Quantitative assays for the chick chorioallantoic membrane. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 476, 226-236.
- Valdes, T.I., Klueh, U., Kreutzer, D. & Moussy, F. (2003). Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for testing biosensors. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67(1), 215–223.
- Valdes, T.I., Kreutzer, D. & Moussy, F. (2002). The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 62(2), 273–282.
- Weiss, A., Van, B.J., Bonvin, D., Jichlinski, P., Dyson, P.J., Griffio, A.W *et al.* (2014). Low-dose angiostatic tyrosine kinase inhibitors improve photodynamic therapy for cancer: lack of vascular normalization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(3), 480–491.