

## **Embrión de Pollo: Un modelo con cardiograma para el estudio de la toxicidad experimental inducida por *Thevetia peruviana*.**

---

**Diana Sequera, José Miguel Ercolino, Marco Álvarez\*.**

Sección de Microscopía Electrónica, Instituto Anatómico "José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

\*Autor de correspondencia: Dr. Marco Álvarez. Telf: 00582-6053439. Email: [marco.alvarez@ucv.ve](mailto:marco.alvarez@ucv.ve)

## Resumen

Los estudios sobre la cardiotoxicidad inducida por agentes químicos se han visto fortalecidos con la aplicación de métodos de registro de señales cardiogenicas. En el presente trabajo se utilizó un método definido en nuestro laboratorio como Cardiovideograma (CVG), reforzado con el análisis de imágenes, para ilustrar con el modelo cardiaco de embrión de pollo "in vivo", la cardiotoxicidad inducida por el extracto acuoso de la semilla de *Thevetia peruviana*, una planta ornamental de severa acción toxica. Los resultados mostraron que el extracto acuoso de *Thevetia peruviana* induce la reducción en un 70,49% de Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP), calculada en pulsaciones por minuto (P/min), a través de la medición de las variaciones de luminosidad en los intervalos entre los puntos máximos de ésta variación. Estos cambios se encontraron vinculados con un mayor nivel sistólico en la porción ventricular (V) y del Tronco Arterioso (TA) y con un menor nivel sistólico en la porción auricular (A) en comparación a la condición control. Se demostró que la cardiotoxicidad inducida por el extracto acuoso de *Thevetia peruviana* puede ser claramente analizada en el modelo cardiaco de embrión de pollo, fortalecido con un método de registro como el Cardiovideograma (CVG), lo cual resulta una alternativa para el estudio de la cardiotoxicidad de muchos otros agentes tóxicos de similar potencialidad cardiotoxica.

**Palabras claves:** Embrión de pollo, cardiotoxicidad, contractilidad miocárdica, Cardiovideograma (CVG), *Thevetia peruviana*.

---

**Abstract**

**CHICKEN EMBRYO: A CARDIOVIDEOGRAM MODEL TO STUDY THE EXPERIMENTAL TOXICITY INDUCED BY *Thevetia Peruvians*.**

Studies on the cardiotoxicity induced by chemical agents have been strengthened through the use of cardiogenic signals registration methods. In this study we used a method, defined in our laboratory as Cardiovideogram (CVG), reinforced with image analysis, to illustrate "in vivo" chick embryo heart the cardiotoxicity induced by aqueous extract of *Thevetia Peruvians* seeds, an ornamental plant with severe toxic action. The results showed that the aqueous extract of *Thevetia Peruvians* seeds induces Average Heart Rate (AHR) reduction in 70.49% measured in beats per minute (P/ min) through variations of brightness measurement in intervals between the peaks of this variation. These changes were associated with a higher Ventricular (V) and Truncus Arteriosus (TA) systolic level and a lower Atrial (A) systole level, compared to the control condition. It was shown that the cardiotoxicity induced by the aqueous extract of *Thevetia Peruvians* seed can be clearly analyzed in chick embryo cardiac model, strengthened with Cardiovideogram (CVG) which is an alternative recording method for study of many other toxic agents with cardiotoxic potentially.

**Key words:** chick embryo, cardiotoxicity, myocardial contractility, cardiovideogram (CVG), *Thevetia Peruvians*

## Introducción

El embrión de pollo ha sido, por años, un eficiente modelo biológico para los estudios en el campo de la biología del desarrollo<sup>1</sup>. A demás, ha contribuido al conocimiento en áreas como la inmunología, genética, virología, toxicología, entre otras<sup>2</sup>. Particularmente, los estudios de la biología del desarrollo cardíaco han sido enriquecidos con los estudios descriptivos plasmados en la serie normal de estadios del desarrollo del embrión de pollo<sup>3</sup>. Dentro de los estudios toxicológicos, cabe destacar la cardiotoxicidad, un fenómeno altamente conocido; sin embargo, poco entendido debido a que, sólo recientemente se ha recopilado información concerniente a eventos celulares, rutas de señalización celular y mecanismos moleculares de la respuesta toxicológica del miocardio ante la exposición a tóxicos y contaminantes ambientales<sup>4</sup>. La cardiotoxicidad inducida por agentes químicos de alto grado de contaminación, para animales y humanos, ha sido investigada en embriones de pollo<sup>5,6</sup>. Estas investigaciones a nivel cardiovascular y particularmente referidas a la actividad contráctil del corazón embrionario, han sido fortalecidas con métodos de medición de las señales cardiogénicas entre los cuales se encuentran: el Electrocardiograma<sup>7</sup> (ECG), el Balistocardiograma<sup>8</sup> (BCG) y el Acustiocardiograma<sup>9</sup> (ACG). El presente trabajo hace uso del Cardiovideograma (CVG), en el modelo cardíaco "in vivo" de embrión de pollo para ejemplificar la cardiotoxicidad que resulta de la acción de un tóxico con características de agente cardenólido, como es el extracto acuoso de la semilla de la planta *Thevetia peruviana*<sup>10</sup>. Una semilla consumida sin ninguna indicación terapéutica y aceptada en el tratamiento como antiparasitaria, reductora de peso, abortiva y en el tratamiento de enfermedades de la piel. Entre sus principios activos se encuentran los glucósidos cardíacos que producen un cuadro similar de intoxicación, al que induce una sobredosis de digitalicos.

## Materiales y Métodos

### **Extracto acuoso de *Thevetia peruviana*.**

El extracto acuoso utilizado en el presente ensayo fue obtenido a partir de 5 g de semilla, previamente identificada, macerada en 10 mL de solución salina isotónica. La caracterización química del extracto se realizó a través de la cromatografía de gas-masa, espectrofotometría <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

ultravioleta y fotocolorimetría de acuerdo a los protocolos utilizados en el laboratorio central de la Guardia Nacional Bolivariana. El extracto así preparado fue dejado en reposo durante 30 minutos y seguidamente diluido de manera adecuada para obtener las dosis de administración previamente definidas. El tratamiento utilizado consistió en la colocación directa sobre el corazón embrionario, de 0,5 µL de una concentración subletal del extracto acuoso de *Thevetia peruviana*, (0,01g/mL), obtenida en ensayos realizados previamente a la presente experimentación (datos no mostrados).

### **Embrión de pollo "in vivo".**

En la investigación se hizo uso de embriones de 4½-5 días de desarrollo, St 25. Los embriones fueron obtenidos a partir de la incubación, 37°C y 85% humedad relativa, de huevos fértiles de Gallinas Rhode Island, seleccionados de la granja avícola M. Alfonso, ubicada en la región de San Antonio, estado Miranda. El estadio 25 (St 25) de desarrollo en cuestión permite, fácilmente, visualizar tres áreas cardíacas contráctiles: la Ventricular (V), el Tronco Arterioso (TA) y el Atrio (A), que se hacen accesibles para evaluar el patrón de contracción cardíaca del miocardio embrionario durante la sístole y diástole del ciclo cardíaco. No se presenta aún influencia vagal sobre la actividad cardíaca en esta etapa del desarrollo<sup>11</sup>.

### **Cardiovideograma y Cardiotoxicidad.**

La cardiotoxicidad inducida por el extracto acuoso de la semilla de *Thevetia peruviana*, fue evaluada a través de la determinación de cambios en los valores de la frecuencia cardíaca y sobre el patrón de contracción cardíaca. Se hizo uso del método semi-invasivo, denominado por nosotros, Cardiovideograma (CVG) y basado en un sistema de grabación de video descrito por otros autores<sup>12</sup>. Para ello, los embriones, una vez ubicados dentro de huevo, haciendo uso de un ovoscopio, fueron expuestos a través de las técnicas convencionales de manipulación embrionaria<sup>13</sup> y colocados bajo una estación de trabajo constituida por una incubadora de precisión, con registro de temperatura, un microscopio estereoscópico (Nikon-SMZ800), una cámara de video (Nikon, 200 cuadros/seg), módulo de adquisición de datos y un computador (Fig.1).

### **Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP).**

Una vez expuestos los embriones y ubicado el corazón, fueron realizadas grabaciones de video durante una hora (1h), en intervalos de 15 min, antes y después de realizado el tratamiento. El procesamiento de los respectivos videogramas fué realizado en el computador mediante un programa desarrollado bajo el ambiente MATLAB<sup>®14</sup>. Este programa permitió calcular los valores de la Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP), mediante las variaciones de luminosidad de las áreas cardíacas seleccionadas, midiendo los intervalos entre los puntos máximos de ésta variación y calculando el número de pulsaciones promedio por minuto (P/min).

### **Contractilidad miocárdica.**

El análisis de imágenes realizado sobre los fotogramas obtenidos de los respectivos videos, permitió estimar la contractilidad cardíaca a través de la cuantificación del patrón de contractilidad del miocardio. Para élllo, se realizaron mediciones de la anchura máxima de las regiones contráctiles durante el ciclo cardíaco embrionario. La ubicación de cada una de las porciones cardíacas (V, TA, A), sobre los respectivos fotogramas, permitió medir la extensión máxima de los contornos de cada región, en cada sístole y diástole<sup>15</sup>, antes y después del tratamiento. Se estimó el punto de máxima sístole para cada una de las porciones contráctiles. La actividad contráctil fue registrada en intervalos de 15 min, durante una hora (1h), a una temperatura constante de 37°C.

## **Resultados**

### **Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP).**

El valor del período promedio de los intervalos entre los puntos máximos de luminosidad en función del tiempo, permitió estimar la Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP) antes y después del tratamiento (Fig.2). El registro grafico de CVG antes del tratamiento (Fig.2A), muestra una secuencia regular y homogénea de intervalos de puntos máximos de luminosidad (a) en función del tiempo. Se estimaron valores de FCP alrededor de  $203 \pm 4,784$  P/min (b). En contraste, la variación de luminosidad luego del tratamiento (Fig.2B), registró una secuencia de puntos máximos homogénea pero irregular, con señales de puntos de arritmia (flechas). En este caso los espacios entre los puntos máximos fueron mayores (a). Se registró un valor

menor de FCP, particularmente alrededor de  $143,1 \pm 2,534$  P/min (b). Los valores de FCP que se estimaron, presentaron una reducción significativa, del 70,49% en P/min, con respecto al control.

### **Contractilidad miocárdica.**

El análisis del ciclo cardíaco, sobre los respectivos fotogramas, permitió determinar las variaciones en la contractilidad del miocardio embrionario en función de los cambios en el valor de anchura máxima y estimación del vaciado o máxima sístole de las distintas porciones cardíacas antes (Pre) y después de tratamiento (Post) (Fig.3). La anchura máxima ventricular (V), antes del tratamiento (Pre), fue mayor que la anchura máxima ventricular (V), posterior al tratamiento (Post). Esta situación se encontró vinculada con un mayor vaciado o mayor sístole ventricular (1) posterior al tratamiento. Por otra parte, la anchura máxima de la región del Tronco Arterioso (TA), antes del tratamiento (Pre), fue mayor que la anchura máxima del TA, posterior al tratamiento (Post). Esta situación se encontró vinculada con un mayor vaciado o mayor sístole de la porción TA (2) posterior al tratamiento. Por ultimo, la anchura máxima de la porción auricular (A), antes del tratamiento (Pre), fue menor que la anchura máxima de la porción Auricular (A), posterior al tratamiento (Post). Esta situación estuvo vinculada con un menor vaciado o menor sístole auricular posterior al tratamiento (3).

## **Discusión**

El presente trabajo ofreció un ejemplo de cardiotoxicidad experimental, inducida por un severo agente toxico como es el extracto de semilla de *Thevetia peruviana*, haciendo uso del corazón de embrión de pollo, en etapas tempranas del desarrollo, evaluado a través de una herramienta semi-invasiva hasta el momento poco explotada como es el Cardiovideograma (CVG) El modelo permitió la evaluación de señales de toxicidad, tales como alteraciones en la frecuencia cardíaca y la actividad contráctil. Este procedimiento fue reforzado con el análisis de imágenes sobre los fotogramas, lo cual favoreció la estimación de la contracción pseudo-peristáltica, iniciada en el atrio o porción auricular (A) y transmitida a través del Tronco Arterioso (TA), hacia la porción ventricular (V). Dicha contracción se encuentra relacionada con bandas pseudo-circulares de miofibrillas que rodean el tubo cardíaco en etapas tempranas del

<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

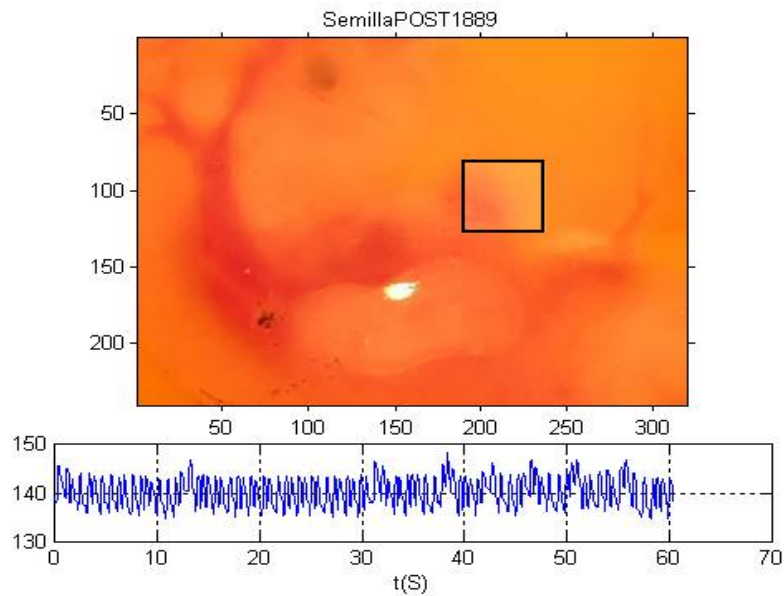
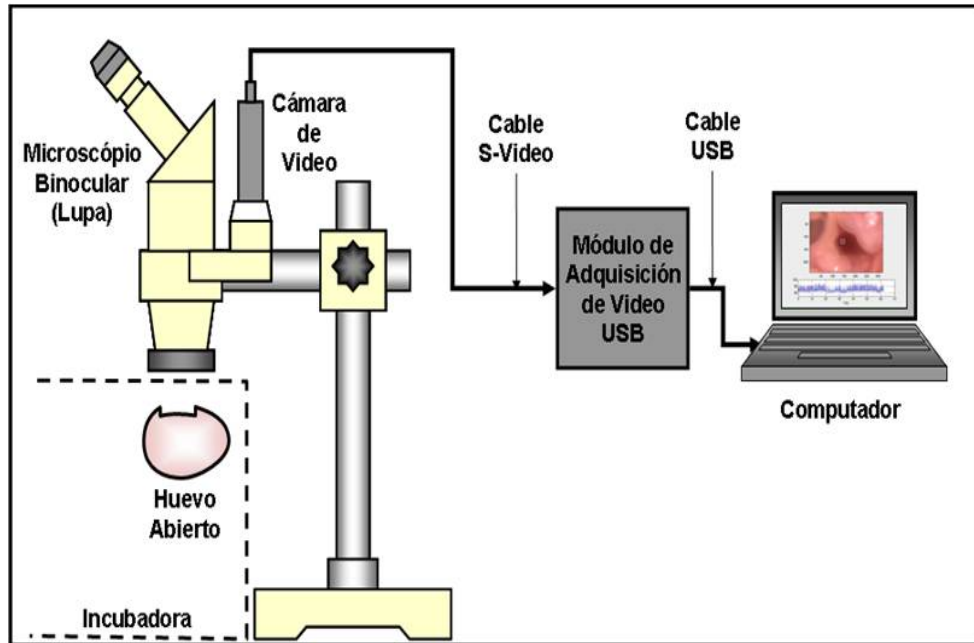
desarrollo<sup>16</sup>. El modelo de cardiotoxicidad reproduce señales de acción tóxica inducida por digitalicos, caracterizada por otros investigadores<sup>17</sup>, quienes han vinculado la acción tóxica de estos compuestos con un vaciado completo de la cavidad ventricular durante la sístole, muy probablemente debido a que el fármaco aumenta la capacidad de la fibra muscular para desarrollar tensión y acortarse. Esta condición hace que el ventrículo sea capaz de desarrollar una presión suficiente, durante la sístole, para incrementar la capacidad sistólica. Además se perdió la resistencia aórtica lo cual fue reflejado en un aumento del llenado aórtico, como ha sido demostrado con nuestro modelo experimental. Con esta interpretación, cabe destacar que la cardiotoxicidad inducida por el extracto acuoso de *Thevetia peruviana* puede ser claramente analizada en el modelo biológico de embrión de pollo, especialmente a través del registro de los cambios en la frecuencia cardíaca (FCP), acompañados de irregularidades en la actividad contráctil como ha sido observado en humanos. Por lo tanto, el uso del embrión de pollo en etapas tempranas del desarrollo, como modelo cardíaco "in vivo", con la aplicación con el método por nosotros llamado Cardiovideograma (CVG), resulta una alternativa para el estudio de la cardiotoxicidad de la semilla de *Thevetia peruviana* y para muchos otros agentes tóxicos de similar potencialidad cardiotoxica.

## **Agradecimiento**

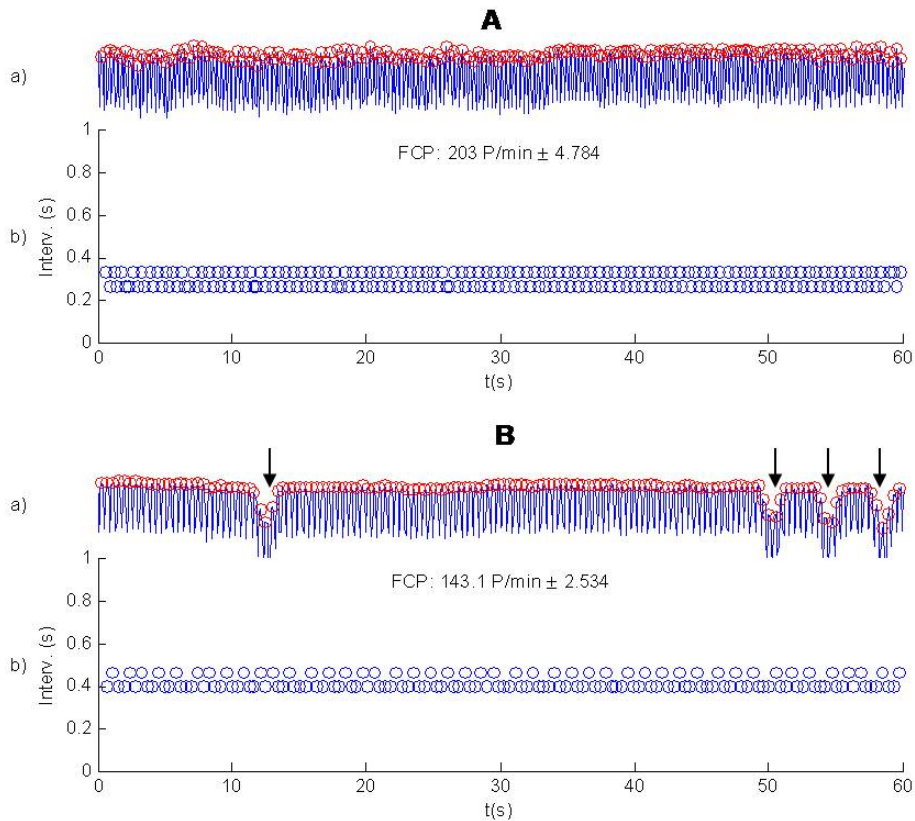
Los autores expresan su gratitud al FONACIT. Proyecto Grupal 2005000400 ya que a través del mismo ha sido posible el desarrollo de la estación de trabajo del Cardiovideograma para la obtención de la señales cardiogenicas en el embrión de pollo.



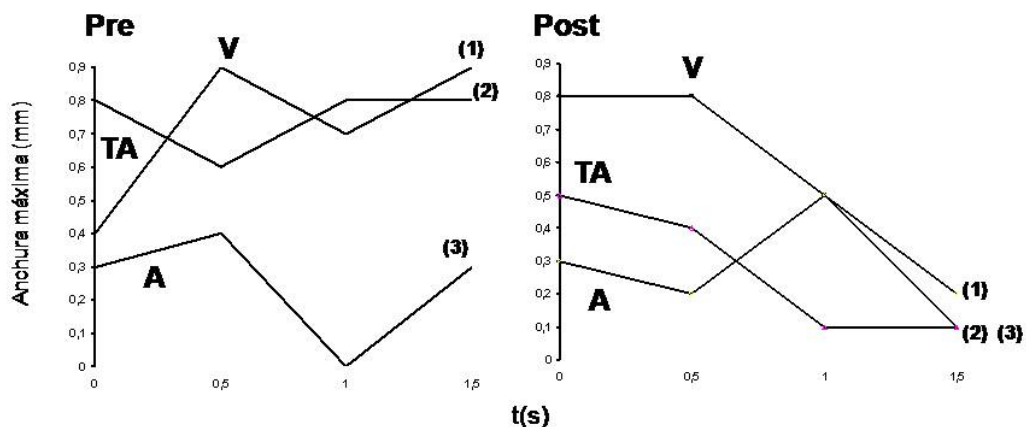
Fig. 1. A) Estación de trabajo para la medición de la Frecuencia Cardíaca mediante Cardiovideograma (CVG). B) Fotograma con recuadro y delimitación del área cardíaca y patrón del registro de luminosidad en función del tiempo  $t(s)$ .



**Fig.2. Representación gráfica de la variación de luminosidad expresada como una secuencia regular y homogénea de intervalos de puntos máximos de luminosidad (a) en función del tiempo. Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP).**



**Fig.3. Representación gráfica del patrón de actividad de las porciones contráctiles del corazón Pre y Post tratamiento: Ventrículo (V), Tronco Arterioso (TA) y Aurícula (A). (1), (2), (3): puntos de estimación del nivel de sístole de la cada una de las porciones contráctiles.**



---

## Referencias

- 1) Wolper L (2004). Much more from the chicken's egg than breakfast – a wonderful model system. *Mechanisms of Development*. 121; 1015-1017.
- 2) Stern C (2005). The chick: A great model system. Becomes even grater. *Develop. Cell*. 8:9-17.
- 3) Hamburger V y Hamilton H (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Develp. Dynamic*. 195: 231-272.
- 4) Kang JY (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. *Envir. Healt. Perspes*. 109(1): 27-34.
- 5) Yoshiyama Y, Sugiyama T, Kanke M (2003). Cardiotoxicity of trastuzumab (Herceptin) in chick embryos. *Biol.Pharm.Bull*. 26(6): 893-895.
- 6) Walker MK, Catron FT (2000). Characterization of cardiotoxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related chemicals during early chick embryo development. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 167; 210-221.
- 7) Sugiyama T, Miyazaki H, Saito K, Shimada H, Miyamoto K (1996). Chick embryos as a alternative experimental animal for cardiovascular investigation: stable recording of electrocardiogram of chick embryos in ovo on the 16<sup>th</sup> day of incubation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 138; 262-267.
- 8) Tazawa H (1995) Two-dimensional cardiogenic ballistic movements of avian eggs. *Med. Biol. Eng. Comp*. 33;611-614.
- 9) Rahn H, Poturalski A, Paganelli V (1990). The acustiocardiogram: a noninvasive method for measuring heart rate of avian embryos in ovo. *Amer. Physiol.Soc* 1546-1548.
- 10) Torres N (2009). Actualización sobre intoxicación con Thevetia Peruviana. *Revista de Toxicología en Línea (RETEL)*. Vol 19; 2-19
- 11) LeGrande MC, Pfaff GH, Shideman FE (1996). Initiation of vagal control of Herat rate in the embryonic chick. *Ant. Rec*. 15, 163-166.
- 12) Nishibatake M, Nakasawa M, Tomita H, Ikeda K, Takao A (1990). Imagen analysis of cardiac contraction in the early stages of the chick embryo. En *Developmental Cardiology*:

- Morphogenesis and Function. Mount Kisco, NY, Futura Publishing Co., Inc<sup>®</sup>. Cap. 22:305-314.
- 13)** Hodach RJ, Gilber EF, Fallon JF (1974). Aortic arch anomalies associated with the administration of epinephrine in chick embryos. *Teratology*. 9: 203-209.
- 14)** Azevedo de Carvalho JL, Ferreira da Rocha A, Asis de Oliveira F, Souza JN, Junqueira LF (2002). En: [http://biron.usc.edu/~jcarvalh/pdf/icsp2002\\_ecglab.pdf](http://biron.usc.edu/~jcarvalh/pdf/icsp2002_ecglab.pdf)
- 15)** Wagner HN, Rhodes BA (1972). Radioactive tracers in diagnosis of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diseases*. Vol; XV(1): 1-24.
- 16)** Nakamura A, Kulikowski R, Lactis J (1980). Heart looping: A regulated response to deforming forces. In *etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*, van Praagh R, Takao, A (eds). Futura Publishing Company, Mt. Kisco, NY, pp: 81-98.
- 17)** Ramirez OM, Lagunas MV, Zajgla JM, Olvera ZG, Casados AMC, Munguia SJ, Hernández PG (2002). Mecanismos de toxicidad celular inducida por digitalicos. Estudio con ouabaína. *Archivos de Cardiología de México*. Vol 72 (1): S171-s176.

**Recibido: 12/04/10**

**Aceptado: 19/04/10**