

EFECTO CARDÍACO DEL EXTRACTO DE EPITELIO PIGMENTADO DE LA RETINA (MELANINA), DEL GLOBO OCULAR DE EMBRIÓN DE POLLO “IN VIVO” E “IN VITRO”

Marco A Álvarez¹, José M Ercolino²

RESUMEN: La melanina y su participación en la génesis de ciertas patologías cardíacas, ha sido revisada recientemente. Sin embargo, la expresión funcional y celular del efecto sobre el corazón no ha sido claramente establecida. En el presente trabajo se hizo uso del extracto de epitelio pigmentado de la retina del globo ocular de embrión de pollo, contenido de melanina, para estudiar “in vivo” el patrón de contracción del corazón y la frecuencia cardíaca por videocardiograma, un método semi-invasivo en embriones de pollo de 3 -4 días de incubación, e “in vitro”, su efecto sobre el patrón mitocondrial de mioblastos cardíacos en cultivo primario de Gota pendiente, incubados con el fluorocromo catiónico, 3,3'-dimetiloxicarbonocianida (DiOC₁ [3]). El tratamiento promovió una disfunción de la contracción peristáltica del corazón embrionario, con un incremento en el llenado auricular y una reducción de llenado ventricular durante las diástoles. Se determinó una reducción significativa de frecuencia cardíaca del 18,73 %, luego de una hora de tratamiento. A diferencia de los controles, con un patrón homogéneo de fluorescencia verde emitido por las mitocondrias de forma alargada, la población de mioblastos tratados mostró un patrón de fluorescencia difusa, mitocondrias redondeadas y se observó la presencia de blebs a nivel de la superficie celular. Los resultados sugieren que el extracto de epitelio pigmentado de retina, contenido de melanina, altera la contracción peristáltica e induce una reducción de la frecuencia cardíaca en modelo experimental de embrión de pollo, acompañada con un daño en las mitocondrias, probablemente vinculado a la activación de un proceso de muerte celular mediado por factores apoptóticos mitocondriales que podrían estar asociados a tales efectos.

Palabras clave: Epitelio pigmentado de retina, Melanina, Cardiotoxicidad, Videocardiograma, Mioblastos cardíacos, DiOC₁ (3).

ABSTRACT: Melanin and its involvement in the genesis of certain cardiac diseases, has recently been revised. However, the expression of functional and cellular effects on the heart has not been clearly established. In this paper we made use of the extract of the retinal pigmented epithelium of the eyeball of the chick embryo, containing melanin, to study “in vivo” the pattern of contraction of the heart and the heart rate by Videocardiograma semi-invasive method in embryos of 3 -4 days of incubation, and in vitro, their effect on the pattern of mitochondrial using Hanging drop method, to primary culture of cardiac myoblasts, incubated with the cationic fluorochrome, 3,3-dimetiloxicarbonocianida (DiOC₁ [3]). The treatment promoted a malfunction of the peristaltic contraction of the embryonic heart, with an increase in atrial filling and reduced ventricular filling during diastole. We determined a significant reduction in heart rate of 18.73 %, after an hour of treatment. The population of myoblasts showed a diffuse pattern of fluorescence, mitochondria were rounded and the cytoplasm showed the presence of blebs at the surface unlike controls with a uniform pattern of green fluorescence emitted by the elongated shape of mitochondria. The results suggested that the extract of retinal pigmented epithelium, melanin containing, alters the peristaltic contraction and decrease the heart rate in experimental model of chick embryo, together with mitochondrial damage, probably linked to the activation of a process of cell death mediated by factors apoptotic mitochondria, which could be associated with such effects.

Key word: Retinal pigmented epithelium, Melanin, Cardiotoxicity, Videocardiogram, Cardiac myoblasts, DiOC₁ (3).

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones respecto a la melanina y su posible vinculación con la génesis de algunas patologías

¹ Sección de Microscopía Electrónica, Instituto Anatómico “José Izquierdo”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

² Laboratorio de Morfologías Anormales, Instituto Anatómico “José Izquierdo”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

cardíacas, han ido incrementando en los últimos años ^(1,2). Las mismas han sido conducidas sobre numerosos casos clínicos relacionados con metástasis cardíacas en pacientes con melanoma³. La invasión intracardíaca masiva por melanomas y la metástasis extracavitaria cardíaca han sido reportadas ^(4,5). Además de los numerosos casos clínicos e investigaciones en modelos de enfermedades en humanos, su efecto sobre la proliferación y diferenciación celular de queratinocitos y fibroblastos “*in vitro*”, ha sido reportado⁽⁶⁾. Experimentalmente, la melanina inyectada en la cavidad intraperitoneal, de ratones, induce la formación de granulomas en el hígado, en el bazo y en los pulmones. La melanina es un pigmento de color oscuro, negro o café, de alto peso molecular, estable, amorfo y cargado negativamente. Se encuentra en la piel y particularmente en el citoplasma de las células cúbicas que conforman el epitelio pigmentado de la retina. Su efecto patogénico ha sido atribuido a muchas de sus propiedades, incluyendo su unión íntima con la pared celular, el secuestro de proteínas de defensa, el efecto tampón redox, la captura de singletes de electrones, la dismutación del ión superóxido ⁽⁷⁾, entre otros. A pesar de las numerosas evidencias clínicas y experimentales relacionadas con la posible acción tóxica de la melanina, hasta donde conocemos, la expresión funcional y celular del efecto cardíaco producido por el pigmento no se encuentra claramente establecida. En el presente trabajo se hizo uso del extracto de epitelio pigmentado de la retina del globo ocular de embrión de pollo, contentivo de melanina, para estudiar “*in vivo*” el patrón de contracción del corazón y la frecuencia cardíaca por el método sumi-invasivo de Videocardiograma en embriones de 3 -4 días de incubación, e “*in vitro*”, su efecto sobre el patrón mitocondrial de mioblastos cardíacos en cultivo primario de Gota pendiente, incubados con el fluorocromo catiónico, 3,3'-dimetiloxicarbonocianida (DiOC₁ [3]). Se discute su posible vinculación con la inducción de muerte celular por factores apoptóticos mitocondriales.

MÉTODOS

Fueron utilizados embriones de pollo de 3, 4, 5, 8 y 11 días de desarrollo ⁽⁸⁾, obtenidos luego de incubar huevos fértiles de Gallinas Rhode Island, provenientes de la granja avícola, M. Alfonso, de la región de San Antonio de los Altos, Estado Miranda. Los mismos fueron incubados a 38° C y 85 % de humedad, en

incubadora Heraeus con ventilación. El extracto de epitelio pigmentado de la retina, contentivo de melanina, utilizado, fue obtenido a partir de los globos oculares de embriones de pollo de 8-11 días de incubación, previa remoción de las estructuras oculares, liberación de las membranas meníngeas, conjuntivas y extirpación del cristalino. Una vez obtenido el epitelio oscuro, este fue colocado en un homogenizador PYREX 7727 y macerado en solución Tyrode. El homogenato de color negro oscuro fue trasvasado a un tubo de almacenamiento y puesto a sedimentar durante 15 minutos. El sobrenadante fue seleccionado y congelado hasta ser utilizado en los respectivos ensayos.

Ensayo “*in vivo*”

Una visión lateral derecha del área cardíaca de embriones de 3 -4 días de incubación fue expuesta a través de una ventana ⁽⁹⁾, y enfocada a través de un microscopio estereoscopio Nikon-SMZ800 con una cámara de video Nikon adaptada al mismo. Video grabaciones microscópicas de alta velocidad, (200 cuadro/seg), fueron realizadas en un tiempo de 15' de duración previo y posteriormente al tratamiento. Los fotogramas permitieron hacer medición de las anchuras diametrales del límite endocardial en las zonas como el atrio (A), el cono arterial (CA) y el tronco arterioso (TA), visibles en posición lateral derecha del corazón⁽¹⁰⁾. La frecuencia cardíaca (fc), fue registrada durante 15 minutos antes de la inoculación de los embriones con 0,1 mL de extracto de epitelio pigmentado, a temperatura constante de 37° C, y durante 15 min, luego de una hora (1h) de tratamiento. La frecuencia cardíaca se traduce en el videocardiograma (VCG), como variaciones de luminosidad, que se estima en pulsaciones por minutos (P/min), a través del promedio de los intervalos entre los puntos máximos de variación de luminosidad, en un PC con ambiente Matlab (Compañía Mathworks).

Ensayos “*in vitro*”

Explantos de tejido cardíaco proveniente de corazones de embrión de pollo de 5 días de desarrollo permitieron obtener los mioblastos cardíacos en cultivo primario en Gota pendiente⁽¹¹⁾. Los mismos fueron cultivados en un medio nutritivo de extracto embrionario y plasma de pollo en una proporción de 1:1. Las monocapas de 24 horas de crecimiento, con una población homogéneamente distribuida alrededor del explante, fueron seleccionadas para ser tratadas durante una hora (1h) con 0,1 mL del extracto de epitelio

pigmentado de retina. Las monocapas, antes y después de una hora (1h) del tratamiento, fueron incubadas durante 1 minuto con DiOC₁ [3], lavadas con solución Tyrode x3 y observadas en campo claro y microscopia de fluorescencia con excitación azul (λ_{exc} AZUL). El DiOC₁ [3], es un fluorocromo catiónico utilizado como sonda marcadora selectiva de orgánulos celulares como las mitocondrias ^(12,13).

RESULTADOS

Ensayo “*in vivo*”

Las mediciones permitieron expresar una relación entre las anchuras máximas de las distintas porciones contráctiles del corazón durante el ciclo cardíaco previo (Pre.) y posteriormente (Post.) al tratamiento (Figura 1). Durante un ciclo cardíaco se observó la máxima anchura de la porción cono arterial (CA), en concordancia con el máximo llenado ventricular durante la sístole, previo al tratamiento (Anchura máxima Pre.), mientras que la máxima anchura en el atrio (A) fue baja en concordancia con el mayor volumen atrial (A). Posteriormente al tratamiento se observó que durante un ciclo de contracción el máximo volumen de llenado ventricular disminuye en concordancia con la mayor

anchura máxima alcanzada. Esta se reduce luego del tratamiento (Anchura máxima Post.), a diferencia de la anchura máxima atrial la cual se incrementa. Los fotogramas previos (Pre.) y posteriormente al tratamiento (Post.), muestran las distintas porciones contráctiles evaluadas. La representación gráfica del VCG, mostró las variaciones de luminosidad, previo (Pre.) y posteriormente al tratamiento (Post.). Se resaltó una secuencia regular y homogénea de intervalos de puntos máximos de luminosidad (Lum), en función del tiempo t(S). El período promedio de los intervalos entre los puntos máximos de luminosidad, en función del tiempo, estimó la frecuencia cardíaca promedio en la población embrionaria. Particularmente, en un 66 % de la población embrionaria sobreviviente fueron registrados valores de frecuencia cardíaca (fc), alrededor $145,7 \pm 2,14$ P/min. En contraste, la variación de luminosidad, luego del tratamiento 1h registró una regular y homogénea secuencia de puntos máximos. Sin embargo, con valores de frecuencia cardíaca menores a la condición antes del tratamiento. Particularmente, se registraron valores promedios de $118,4 \pm 2,1$ P/min. El patrón de contracción cardíaca se expresó en una relación de anchura máxima (AM) de las distintas

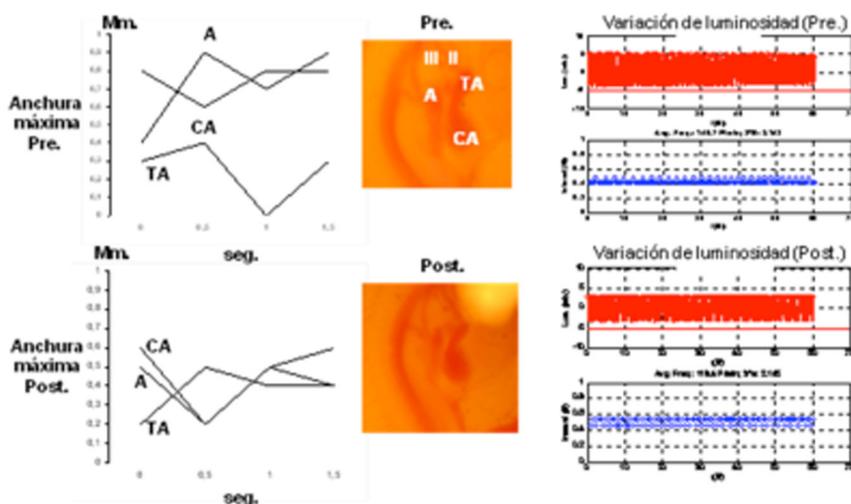


Figura 1. Ciclo de contracción cardíaca previo (Pre) y posterior al tratamiento (Post). Anchura máxima (Mn), en función del tiempo (seg). En los fotogramas se muestran las distintas regiones contráctiles en visión lateral derecha del corazón embrionario de 3 1/2, 4 1/2 días de incubación: Atrio (A), Cono arterial (CA), Tronco arterioso (TA), segunda y tercera arteria del arco aórtico (II, III). En el videocardiograma (VCD) previo y posterior a 1h de incubación con 0,1 mL de extracto de epitelio pigmentado de retina del globo ocular de embrión de pollo de 8-11 días de desarrollo se muestra la evolución de la variación de luminosidad (Lum) en función de la actividad contráctil del corazón embrionario en el tiempo (S) y los registros de intervalos (interval) de picos máximos de variación de luminosidad que permiten la estimación del average de frecuencia (Avg freq), en pulsaciones por minutos (P/min). Se expresan los valores medios ± 3 N=15.

áreas cardíacas medidas antes y después del tratamiento: previo al tratamiento: $AM(CA) > AM(A) > AM(TA)$, posterior al tratamiento $AM(CA) \geq AM(A) > AM(TA)$.

Ensayos “*in vitro*”

La población de mioblastos cardíacos controles incubados con DiOC₁ (3) (Figura 2A) mostraron un intenso brillo de fluorescencia emitida en verde, resaltando la estructura convencional de las

mitocondrias con forma de bastones alargados por todo el citoplasma y alrededor del área peri-nuclear. En contraste, los mioblastos tratados con el extracto de epitelio pigmentado de retina (Fig.2B), presentaron una estructura celular colapsada, con intensa fluorescencia difusa, estructuras mitocondriales redondeadas, área perinuclear sin definición alguna además de la formación de burbujas o blebs en la superficie citoplasmática (flecha).

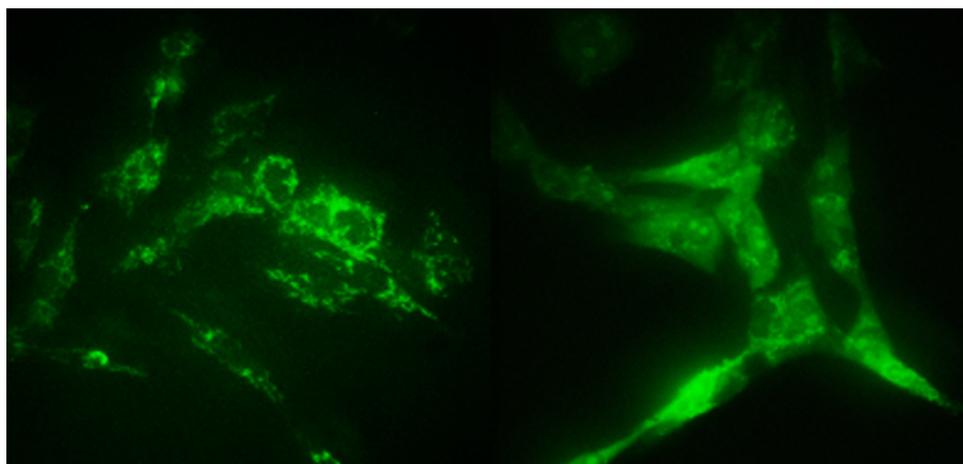


Figura 2. Microfotografía de mioblastos cardíacos, vivos, en cultivo primario de Gota pendiente previo (A) y posterior a 1h (B) de tratamiento con 0,1 mL de extracto de epitelio pigmentado de retina de globo ocular de embrión de pollo de 8-11 días de desarrollo e incubación con DiOC (3), 1 mm x3 lavados con Tyrode. Se observan claramente las mitocondrias alargadas antes y redondeadas después (cabeza de flecha). Fluorescencia difusa y formación de blebs (flecha) (hexc Azul). Barra 20 μ m.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que el extracto de epitelio pigmentado de la retina del globo ocular de embrión de pollo, promueve “*in vivo*” una disfunción de la contracción del miocardio acompañada por una disminución de la frecuencia cardíaca. Por otra parte, el extracto de epitelio pigmentado de retina, compromete “*in vitro*” la actividad de las mitocondrias de los mioblastos cardíacos. Estos efectos describen un posible papel citotóxico, directa o indirectamente ejercido sobre el tejido y la célula cardíaca sometida a la acción del contenido del extracto de epitelio pigmentado utilizado en el presente trabajo. Ante tales efectos cardíacos, cabe destacar que el pigmento de melanina, de color negro o café, derivado de Levodopa (L-DOPA) y llamado eumelanina, presenta algunas

características bien definida, tales como: la alteración del potencial Z de membrana, la disminución de la concentración de calcio y la reducción del consumo de oxígeno⁽¹⁴⁾. Características estas vinculadas con su alta afinidad por las paredes celulares⁽¹⁵⁾ y que regulan así numerosos procesos celulares. Tanto la disfunción de la contracción del miocardio como la reducción de la frecuencia cardíaca, cabría colocarlos como un efecto de la acción directa de componentes del extracto del epitelio pigmentado sobre el músculo cardíaco ya que el control autonómico de la variabilidad en la frecuencia cardíaca en modelo experimental de embrión de pollo se encuentra en controversia. Según algunos autores, dicha regulación se establece en la última etapa del desarrollo, entre los 19 y 20 días de incubación⁽¹⁶⁾. Esta aseveración, ha

presentado contradicción con otros autores ⁽¹⁷⁾, quienes han planteado que la ruta vagal que rige la funcionalidad del corazón se encuentra ya establecida entre los 5 y 6 días de incubación. En base a tales contradicciones, cabría pensar que el efecto cardíaco encontrado pudiera ser un efecto directo sobre el tejido muscular cardíaco y no una respuesta cardíaca mediada a través de la actividad simpática y parasimpático del sistema nervioso autónomo. Una actividad no establecida aun en el estadio embrionario de 3 -4 días de desarrollo utilizado en la presente investigación. Con respecto al efecto sobre las mitocondrias, cabe destacar que estas organelas han sido reconocidas como fuentes sustanciales en la homeostasis de especies reactivas de oxígeno en tejidos, células y en el organismo en general ⁽¹⁸⁾. Una alteración en la permeabilidad de las membranas mitocondriales, intervendría directamente con la homeostasis de las principales especies reactivas de oxígeno; tales como el H₂O₂ y el óxido nítrico (ON*), que intervienen en el stress oxidativo. Cualquier agente que modifique las membranas celulares comprometería por tanto la homeostasis iónica y conduciría de esta manera, un proceso como la apoptosis, entre otras condiciones patológicas, como ha sido postulado por algunos autores ⁽¹⁹⁾. Las señales de apoptosis, tales como la formación de blebs demostradas en la presente investigación, así como el patrón difuso de fluorescencia registrado, podrían sugerir un posible efecto cardíaco conducido por la ruta mitocondrial. La salida de citocromo c es un evento típico de la muerte celular por apoptosis mediada por la ruta de mitocondrias ⁽²⁰⁾. La demostración de una salida de citocromo c de la mitocondrial ha sido descrita, en otros tipos celulares, a través de la microscopia de fluorescencia. Particularmente, en células tratadas con inductores de apoptosis el patrón de fluorescencia verde se expresa difuso por toda la célula ⁽²¹⁾, de manera similar a la demostrada en los resultados obtenidos. Se puede concluir que efectivamente el extracto pigmentado de la retina de globo ocular de embrión de pollo, contenido de melanina, promueve, a nivel funcional, efectos cardíacos expresados en alteración de la contractilidad con reducción de la frecuencia cardíaca y a nivel celular una alteración de la actividad de las mitocondrias, con cambios en su estructura y probablemente en su funcionalidad. La posible activación de un proceso de muerte celular mediado por factores apoptóticos mitocondriales, como una respuesta temprana al stress químico inducido por el pigmento, pudiera ser un evento a investigar a mayor profundidad. Esto permitiría un

mejor conocimiento respecto al papel de la melanina sobre aquellas patologías, cada día más comunes, vinculadas con la presencia de melanomas cardíacos.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo estuvo apoyado a través de recursos del proyecto Grupal G-2005000400-FONACIT y PG: 09-00-6879-2007-CDCH.

REFERENCIAS

1. Urán ME, Cano LE. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2008;2:(2):357-377.
2. Pitta RS, Kondur A, Alfonso L. Metastatic extracavitary cardiac melanoma. The role of contemporary imaging techniques in diagnosis and surgical planning. *Circulation*. 2007;115:e415-e417.
3. Wood A, Markovic SN, Best PJ, Erickson LA. Metastatic malignant melanoma manifesting as an intracardiac mass. *Cardiovasc Pathol*. 2009; Feb 10. [Epub ahead of print].
4. Dubrey S, Grocott-Mason R, Mittal T, Burke M. Massive cardiac invasion by melanoma with obstructive clinical features. *Postgraduated Medical Journal*. 2008;84:163-166.
5. Houmsee M, Raman SV, Lejer CV, Orsinelli DA. Metastatic melanoma of the left ventricle: Cardiac imaging in the diagnosis and surgical approach. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2004;20(6):523-528.
6. Blinova MI, Yudintseva NM, Kalmykova NV, Kuzminykh EV, Yurlova NA, Ovchinnikova OA. Effect of melanins from black yeast fungi on proliferation and differentiation of cultivated human keratinocytes and fibroblasts. *Cell Biol Int*. 2003;27:135-146.
7. Korytowski W, Hintz P, Kalyanaraman B. Mechanism of dismutation of superoxide produced during autoxidation of melanin pigments. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;131:659-665.
8. Hamburger B, Hamilton L. A series of normal stages in the development of chick embryos. *Develop. Dynam*. 1992;195:231-272.
9. Hodach RJ, Gilbert EF, Fallon JF. Aortic arch anomalies associated with the administration of epinephrine in chick embryos. *Teratology*. 1974;9:203-209.
10. Nishibatake M, Nakasawa M, Tomita H, Ikeda K, Takao A. Image analysis of cardiac contraction in the early stages of the chick embryo. En: Edward B, editor. *Developmental Cardiology. Morphogenesis and Function*. Clark y Atsuyoshi Takao. 1990;22:305-323.
11. Álvarez M, Stojanovic A, García J, Anselmi G. El Glucantime induce cambios en la morfología y organización de la actina de los mioblastos cardíacos cultivados en gota pendiente. ¿L-carnitina previene estos cambios? *Inf Med*. 2001;3:179-198.
12. Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol*. 1981;88:526-535.
13. Stockert JC. Cytochemistry of mast cells: New fluorescence methods selective for sulfated glycosaminoglycans. *Acta*

- Histochem. 2000;102: 259-272.
14. Sarangarajan R, Apte SP. Melanization and phagocytosis: Implications for age related macular degeneration. *Mol Vis.* 2005;11:482-490.
 15. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanin. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:708-717.
 16. Aubert AE, Beckers F, Ramaekers D, Verheyden B, Leribaux Ch, Aerts JM, Berckmans D. Heart rate and heart rate variability in chicken embryos at the end of incubation. *Exp Physiol.* 2004;82(2):199-208.
 17. LeGrande MC, Pfaff GH, Shideman FE. Initiation of vagal control of heart rate in the embryonic chick. *Anat Rec.* 1966;15:163-166.
 18. Jezek P, Hlavatá L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *IJBCB.* 2005;37:2478-2503.
 19. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome *c* loss. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273:11401-11404.
 20. Madan V, Sánchez-Martínez S, Vedovato N, Rispoli G, Carrasco L, Nieva JL. Plasma membrana-porating domain in poliovirus 2B protein. A short peptide mimics viroporin activity. *J Mol Biol* 2007; 374 (4): 951-964.
 21. www.uam.es/otros/cuturuam/PDF/muerte_por_viroporinas.pdf.
- CORRESPONDENCIA:** Marco A. Álvarez. ¹Sección de Microscopía Electrónica, Instituto Anatómico “José Izquierdo” <http://www.med.ucv.ve/IA/SecMicElec.htm> marco.alvarez@ucv.ve Telf. 0212-605-3439 Fax: 0212-6053449.
Proyectos Grupales: G-2005000400-FONACIT y PG: 09-00-6879-2007-CDCH.