

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Modelos y ensayos para el estudio de la angiogénesis

Models and trials for angiogenesis study

Ing. Miriam Marañón Cardonne,^I Lic. Lena Pérez Font,^I Lic. Oneida Font Santos^{II} e Ing. Amanda Moya Gómez^{II}

^I Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Santiago de Cuba, Cuba.

^{II} Facultad de Ingeniería Eléctrica, Sede "Julio Antonio Mella". Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

La angiogénesis, que conduce a la formación de redes capilares, tiene un rol importante en un elevado número de eventos fisiológicos y patológicos, entre los cuales figuran el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la artritis, el crecimiento tumoral, la metástasis y los procesos isquémicos, como uno de los mecanismos de la protección endógena y exógena. A tales efectos se analizan los métodos más utilizados actualmente tanto *in vivo* como *in vitro* para los estudios de angiogénesis; también se destacan las ventajas y desventajas de cada uno y se enfatiza en la combinación de ambos.

Palabras clave: angiogénesis, ensayo *in vivo*, ensayo *in vitro*.

ABSTRACT

The angiogenesis that leads to the formation of capillary nets, has an important role in a high number of physiological and pathological events, among which we can mention the embryonic development, wounds healing, arthritis, tumoral growth, metastasis and in the ischemic processes as one of the mechanisms of the endogenous and exogenous protection. To such effects the most used methods at the moment are analyzed either *in vivo* or *in vitro* for the angiogenesis studies; advantages and disadvantages of each one are highlighted too and the combination of both is emphasized.

Key words: angiogenesis, *in vivo* trial, *in vitro* trial.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos debido a la proliferación de células endoteliales, que conducen a la formación de redes capilares. Tiene un rol importante en un elevado número de eventos fisiológicos y patológicos a saber: desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, artritis, crecimiento tumoral, metástasis y procesos isquémicos como uno de los mecanismos de la protección endógena y exógena.¹

En la isquemia, por ejemplo, la falta de oxígeno favorece la activación y transcripción del factor HIF-1, que funciona como un regulador de la homeostasis del oxígeno y lleva a la transcripción de varios genes, incluyendo los codificadores de eNOS (*del inglés endotelial nitric oxide synthase*) y VEGF (*del inglés vascular endotelial growth factor*). Como consecuencia, uno de los primeros fenómenos reconocidos durante esta es la

vasodilatación debido a los niveles de óxido nítrico (NO) presente, entre otras causas; también se observa el aumento de la permeabilidad vascular, por lo cual el edema es un poderoso predictor de la respuesta angiogénica, y como resultado de este proceso aparecen nuevas redes capilares.²⁻⁴

Dos procesos están estrechamente vinculados a la angiogénesis: la arteriogénesis y la vasculogénesis. La primera se refiere al crecimiento de arterias colaterales preexistentes en arterias colaterales funcionales; la segunda a la formación de una red primitiva de vasos sanguíneos durante la embriogénesis. Los angioblastos diferenciados en células endoteliales forman una red vascular.⁴

Para los estudios de estos procesos, tanto aquellos que se producen de forma fisiológica como la intervención de agentes terapéuticos como inhibidores o estimuladores de angiogénesis, se utilizan diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas *in vitro* son valiosas, pueden ser realizadas de manera expedita y entregan resultados cuantitativos, pero que deben ser interpretados cuidadosamente y estar sujetos a confirmación por ensayos *in vivo*, que aunque consumen más tiempo, el número de test que se puede realizar al mismo tiempo es limitado y la cuantificación, por lo general, es más difícil; son imprescindibles debido a la naturaleza compleja de la respuesta vascular a los agentes terapéuticos estimuladores o inhibidores de la angiogénesis.^{5,6}

Tomar ventaja de la angiogénesis, pero ya como concepto terapéutico, resulta importante en la conformación de terapias para diferentes enfermedades. En el futuro, como resultado de estas investigaciones, la modulación de la angiogénesis formará parte de terapias para pacientes con enfermedad cerebrovascular isquémica y cáncer,⁷ entre otras afecciones.

ENSAYOS PARA EL ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS

Ensayos *in vitro*

Algunos autores,^{1,8} en sus análisis de los ensayos de angiogénesis, coinciden en señalar las técnicas para el estudio de células endoteliales *in vitro*.

Las líneas más utilizadas son las células siguientes: endoteliales aórticas bovinas (BAECs), endoteliales de pollo (CECs), endoteliales microvasculares (HMVECs) y endoteliales de las venas umbilicales humanas (HUVECs).⁹ Las ventajas de estos sistemas *in vitro* radican en las posibilidades de controlar diferentes parámetros, como la concentración espacial y temporal de sustancias mediadoras de angiogénesis, y de estudiar etapas individuales del proceso. Son de menor costo y requieren menos esfuerzo que los estudios *in vivo*, pero tienen como principal desventaja que los efectos del compuesto *in vitro* pueden no ser los mismos *in vivo*, debido a que los cambios metabólicos que ocurren en el organismo pueden desactivarlo.

Estos métodos son:

- Proliferación de células endoteliales

Dentro del proceso de la angiogénesis, los ensayos de proliferación son altamente reproducibles, fáciles de realizar y de generar datos precisos y cuantificables; sin embargo, aunque las células endoteliales en cultivo son capaces de la división celular,

con el tiempo se vuelven senescentes y así los estudios de proliferación deben llevarse a cabo poco después del aislamiento, comúnmente entre 3 a 6 horas en el laboratorio.

Una densidad celular apropiada es importante para los estudios de proliferación. La actividad proliferativa puede detenerse como resultado del exceso de células en el cultivo, lo cual trae como consecuencia la disminución del suministro de nutrientes y la acumulación de productos de desecho. Por ello, la confluencia de células endoteliales debe ser inferior a 70 % para la evaluación de la proliferación celular. Antes del comienzo de los experimentos, con el fin de poder evaluar la sustancia proangiogénica, debe inducirse el estado de reposo para mimetizar la condición de las células *in vivo*, lo que se consigue con el llamado "suero de hambre", para luego volver a introducir el suero completo y la sustancia a testar para el curso del experimento. Este proceso debe ser cuidadosamente controlado para evitar la apoptosis por inanición.

La proliferación celular puede ser descrita como el número de células divididas y la forma más fácil de determinarla es a través del número neto de células, que se obtiene mediante equipos para el conteo celular, tales como: hematocitómetro (con el uso de un microscopio), contador Coulter (contador electrónico de partículas) o un contador de células automático Vi-cell, que mide tanto la viabilidad como el número de células.

También se utilizan métodos indirectos tales como la cuantificación, por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), de los productos resultantes del método de MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) muy usado en la actualidad,¹⁰ pero que tiene la desventaja de que algunos de los agentes químicos resultantes provocan reacciones que pueden llevar a diferentes niveles de absorbancia, aun cuando existen grados similares de confluencia de células.

Igualmente, el estudio de síntesis de ADN es una medición alternativa de la proliferación celular que se ensaya al medir la incorporación de (3H) timidina en el ADN de la célula mediante recuento de centelleo. La cantidad de radioactividad observada por este método es proporcional a la neosíntesis de ADN. Más recientemente, el uso de bromodesoxiuridina (BrdU), que compite con la timidina para su incorporación en el ADN durante la fase S del ciclo celular, ha reemplazado el uso de timidina radioactiva y puede ser detectado por técnicas de inmunocitoquímica al nivel de células individuales o por ELISA para la población de células.

- Migración de células endoteliales

Durante el proceso de la angiogénesis, las células endoteliales son estimuladas para degradar la membrana basal y migrar en el estroma perivascular en respuesta a un gradiente de factores angiogénicos, incluyendo la inducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El ensayo más utilizado para evaluar cuantitativamente la migración de células endoteliales es el de Boyden modificado. En este método las células endoteliales se colocan sobre un filtro cubierto con fibroconectina, proteínas de colágeno o matrigel. La sustancia a estudiar se coloca en la cámara inferior y se observa la migración de las células endoteliales en dirección a este sustrato. Este ensayo tiene varias ventajas, que incluyen su alta sensibilidad a pequeñas diferencias de concentración de gradientes, alta reproducibilidad y corta duración. Las dificultades técnicas para poner a punto el ensayo, la preservación de los gradientes por prolongados períodos de tiempo y la imposibilidad de observar la migración celular durante el experimento, se reconocen como sus principales desventajas.

Una adaptación de la cámara de Boyden, sustituye el filtro transparente con un material de blindaje de la luz, que con las células marcadas por fluorescencia permite observar solo aquellas que migran a una posición por encima del filtro y pueden ser contadas de esa manera.¹¹

- Formación de tubos (diferenciación de las células endoteliales)

El método consiste en la medición de la habilidad de las células endoteliales para formar estructuras tridimensionales (formación de tubos) por medio de la estrecha unión de estas. Dichas formaciones son estudiadas por microscopía electrónica. La tasa de diferenciación depende del tipo de matriz utilizada. La más eficaz para tal objetivo es la de matrigel, derivada del sarcoma murino *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS). Otra forma del ensayo es usar cultivos de células endoteliales con células estromales (fibroblastos, células musculares lisas y explantes de vasos sanguíneos), con matriz extracelular o sin ellos. Los fibroblastos, por ejemplo, al ser cultivados con las células endoteliales secretan compuestos que potencian la formación de túbulos cilíndricos con lumen, pero este método ha sido menos caracterizado.

Otra alternativa es usar el anticuerpo anti-CD31 acoplado a fosfatasa ligada a un sustrato cromogénico soluble y a continuación utilizar el método ELISA.¹²

Ensayos *ex vivo* (cultivo de órganos)

El hecho de que la angiogénesis *in vivo* incluye tanto a las células endoteliales como a su entorno, lleva a la utilización del estudio del proceso por cultivo de órganos, ensayos que mimetizan la situación *in vivo*, ya que incluyen las células endoteliales, las del entorno y la matriz de soporte.¹³

Por otra parte, en el ensayo con el anillo aórtico de rata, esta arteria es extraída, separada cuidadosamente del tejido fibroadiposo y cortada en anillos de 1 mm de longitud que se colocan en una placa de 24 pocillos. Dichos anillos son inmersos en matrigel y por un período de 10 a 14 días se monitorea la formación de microvasos.

En este ensayo aparecen problemas, por ejemplo: con los explantes extraídos de diferentes animales se obtienen resultados diferentes debido a la especificidad de las especies. A ello se suma que todos los ensayos de cultivo de órganos se describen para tejidos no humanos, lo cual hace dudosa su aplicabilidad.

El ensayo con aorta de pollo, que es una variante del anterior, es ventajoso, pues el resultado se puede obtener entre 1 y 3 días.

Para ambas técnicas es posible cuantificar el crecimiento de células endoteliales con el empleo de técnicas de fluorescencia (BSL-I y BSL-B4) o por tinción de los cultivos con anticuerpo CD31 marcado con fluorescencia.¹⁴

Ensayos *in vivo*

Varios ensayos *in vivo* se utilizan para el estudio de la angiogénesis¹ y actualmente se reconoce la necesidad de acceder a ellos para confirmar los ensayos obtenidos *in vitro*.^{5, 8} Tal necesidad se ve reflejada en la práctica de la investigación.^{10, 15}

Ensayo de plug de matrigel

Es considerado como un test de escaneo rápido para estimuladores e inhibidores de angiogénesis. Esta sustancia es un extracto de sarcoma murino EHS consistente en una matriz de componentes extracelulares y factores de crecimiento. Se almacena a -20 °C y se licúa a 4 °C, de manera que se convierte en un gel sólido (plug de matrigel) a la temperatura corporal del ratón (37 °C). Las sustancias a estudiar se añaden al matrigel y este se inyecta por vía subcutánea en la región ventral de los animales. La respuesta angiogénica en el plug depende de las características del animal (edad, especie, entre otros) y de la localización de la inyección. De 7 a 10 días después de la implantación, el plug de matrigel es retirado y puede observarse la formación de nuevos vasos en la matriz inicialmente no vascularizada. La formación de vasos puede ser cuantificada por medición de hemoglobina y confirmada mediante tinción histológica.¹⁶⁻¹⁸ La dificultad de este método está en que el matrigel se dispersa fácilmente en el tejido subcutáneo y si ello ocurre, no se logra formar el plug al alcanzarse la temperatura corporal.⁶

Método de implantación de esponjas del gel absorbente

Se utiliza para la evaluación de agentes proangiogénicos y antiangiogénicos a partir de la estimulación de los procesos inflamatorios por la sustancia extraña que conduce a la angiogénesis. La esponja se prepara con espuma de gel absorbente estéril, se corta y fortalece con agarosa estéril, que se baña con la sustancia a estudiar. A continuación se inserta por vía subcutánea en una incisión realizada sobre la línea media del animal. Luego de 14 días este es sacrificado, se extrae la esponja y se realiza la cuantificación de la actividad angiogénica. La mayor desventaja del método es que la implantación del material está asociada con respuestas inmunes no específicas que pueden provocar una significativa respuesta angiogénica, incluso sin la presencia de factores de crecimiento exógenos.⁶

Ensayo en discos de alcohol polivinilo

Este modelo, utilizado para la evaluación de la angiogénesis inflamatoria, es una variación del método de esponjas de gel absorbente. Los discos son preparados a partir de una esponja estéril de alcohol polivinilo cubierta por papel de filtro,¹⁹ después el disco es insertado por vía subcutánea a 2 cm de distancia de la incisión y esta es suturada. Luego de 9-10 días el animal es sacrificado y los discos son extraídos para realizar el estudio de la actividad angiogénica.⁶

Ensayo de angiogénesis en la córnea

El método fue utilizado inicialmente en conejos, pero ha sido adaptado a ratas y ratones.¹³ La córnea de las ratas tiene un espesor entre 225 y 250 µm. El estroma abarca cerca de 80 % de este espesor y contiene fibras paralelas de colágeno inmersas en la matriz extracelular.²⁰ El método consiste en insertar en una bolsa creada en la córnea la sustancia promotora o inhibidora de la formación de nuevos vasos. Como la córnea está desprovista de vasos sanguíneos se puede observar fácilmente la formación de estos por microscopía, por ello este método es considerado el *gold standard* para el estudio de sustancias promotoras de neovascularización.⁶

La detección de la densidad de microvasos puede ser determinada mediante técnicas de inmunohistoquímica, mediante el empleo de marcadores endoteliales; la respuesta vascular cuantificada, mediante el procesamiento de imágenes por computadora. La

desventaja del método radica en que el espacio disponible es muy reducido y la inserción de las sustancias puede provocar reacciones inflamatorias.¹ Por otra parte, técnicamente resulta más demandante y cara que los ensayos en la membrana crioalantoidea (CAM, por sus siglas en inglés), que se analiza más adelante.⁶

Modelo de isquemia en miembros inferiores

Es el modelo animal de la enfermedad arterial periférica y ha sido usado ampliamente para estudiar la remodelación vascular. Para su obtención, el extremo proximal de la arteria femoral y la porción distal de la arteria safena se atan y las ramas laterales se cortan, lo cual provoca la isquemia. El mecanismo involucrado radica en que los cambios hemodinámicos llevan a la proliferación vascular, lo que mantiene los vasos colaterales y proveen de sangre al tejido isquémico. La neovascularización se determina por el incremento de la proliferación de células endoteliales y la densidad capilar, para ello se cuenta el número de capilares por fibra muscular o por milímetro cuadrado.^{1, 6, 21}

Ensayo de angiogénesis en la CAM

El modelo de la CAM es utilizado como método piloto en los estudios de evaluación de la angiogénesis. Las sustancias a estudiar, que pueden ser tanto estimuladoras como inhibitoras de la angiogénesis, se colocan en la membrana extraembrionaria a través de una ventana abierta en la cáscara del embrión entre los días 7 y 9 del desarrollo embrionario, de manera que dicha membrana es sellada y luego de un tiempo de incubación (que puede variar) se hace el estudio de la angiogénesis. Más adelante se realizan consideraciones a tener en cuenta para una buena interpretación de los resultados.

Una variante del método es la incubación exhuevo, en la que la CAM es extraída a una placa Petri en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Esta CAM se desarrolla como una membrana plana, de ahí que las sustancias injertadas pueden ser colocadas y dado que toda la CAM está expuesta -- no solo una pequeña ventana de esta--, es posible hacer múltiples implantes y tomar fotografías periódicamente para documentar los cambios vasculares que se producen en el tiempo.¹ Los cambios resultantes en la distribución y densidad de los vasos se evalúan por medio del procesamiento por computadora de imágenes adquiridas, a través de un estereomicroscopio. El procesamiento y presentación de los resultados de este análisis varía de un autor a otro, ya sea al asignar una puntuación derivada de la evaluación cualitativa de los cambios en el número y distribución de vasos o resultados cuantitativos derivados del análisis morfométrico, es decir número de vasos y diámetro o luz vascular.^{1,6} Actualmente, los análisis bioquímicos adquieren particular relevancia en estos estudios, por ejemplo: los ensayos de proliferación de células endoteliales o integrinas. Se recomienda el cuidado necesario en la interpretación de los resultados, ya que la arquitectura vascular de la CAM depende de la edad.^{2,8,22,23}

La CAM, de por sí, está bien vascularizada, de modo que resulta difícil distinguir nuevos capilares de los ya existentes. A ello se une el hecho de que el desarrollo completo de la angiogénesis en la CAM ocurre alrededor de los 11 días, y si los resultados se obtienen de embriones más jóvenes, tiene la complicación adicional de que existan interacciones inespecíficas con factores endógenos que pueden afectar la angiogénesis, por lo que es preferible esperar hasta ese día, y ocasionar irritación química o física en la membrana, incluyendo aquellas originadas en el momento de romper la cáscara. Estas pueden incitar una respuesta inflamatoria que por sí misma

produce angiogénesis (por eso debe esperarse por 3 días después de abierta la ventana para implantar las sustancias que serán objeto de estudio o añadir un agente antiinflamatorio al disco). Finalmente, la membrana es susceptible a los cambios en la presión de oxígeno, lo cual obliga a que el sellado de la ventana sea vital para el éxito del experimento.⁸

Muchas variaciones del método básico han sido propuestas con el fin de mejorar los resultados y adaptar la técnica a experimentos específicos.²⁴ Si se trata del estudio de agentes físicos como el campo magnético, una de las principales ventajas radica en que no es necesario abrir la ventana en la cáscara para aplicarlo, pues este la atraviesa y la CAM queda expuesta a su acción, de modo que en este caso el momento para la lectura debe ser escogido adecuadamente. Esta variación del método reduce la mortalidad respecto al modelo clásico y evita las desventajas relacionadas con la implantación de sustancias irritantes, suministro de antiinflamatorios y cambios en la presión de oxígeno; sin embargo, algunos autores utilizan la ventana en la cáscara para observar la evolución de la vascularización en la CAM.²⁵

CONCLUSIONES

Actualmente, en el estudio de la angiogénesis, persisten discordancias entre los resultados obtenidos en ensayos preclínicos con los de la clínica. El descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento de pacientes con enfermedades como el cáncer, en la que detener este proceso es vital, y la isquemia, en la que la meta inicial de la neuroprotección es restablecer el flujo sanguíneo, puede cambiar el panorama actual de tratamiento. Por tales razones, un aspecto primordial al estudiar un nuevo agente terapéutico para tales fines, es el conocimiento de los modelos, métodos de ensayo y requerimientos de cada uno. Esta revisión esclarece algunos de estos elementos y de su análisis se deriva que un ensayo único no es concluyente para dilucidar la eficacia de un agente proangiogénico o antiangiogénico, asimismo, se puede afirmar que el estudio *in vivo* es imprescindible para una mejor interpretación de los resultados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado con el soporte de la Cooperación para el Desarrollo de Bélgica a través del Programa VLIR-USO (Consejo Flamenco Interuniversitario-Programa Universitario de Cooperación para el Desarrollo) en el contexto del Programa de Cooperación Institucional con la Universidad de Oriente, por lo cual se agradece este valioso aporte.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tahergorabi Z, Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci.* 2012; 15(6): 1110-26.
2. Brooks P, Montgomery A, Cheresch D. Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. *Integrin Protocols.* 1999; 129: 257-69.
3. Beck H, Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* 2009; 117(5): 481-96.
4. Van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefler I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis: a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res.* 2001; 49(3): 543-53.

5. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*. 2003;49(1):32-40.
6. Prabhu Veeramani V, Veni G. An essential review on current techniques used in angiogenesis assays. *Inter J PharmTech Research*. 2010;2(4):2379-87.
7. Rosell A, Montaner J, Álvarez-Sabín J. Implicación de la angiogénesis en la isquemia cerebral humana. *Rev Neurol*. 2004;38(11):1076-82.
8. Staton C, Reed M, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(3):195-221.
9. Delle Monache S. Inhibition of angiogenesis mediated by extremely low-frequency magnetic fields (ELF-MFs). *PLoS ONE*. 2013 [citado 15 May 2015];8(11). Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079309>
10. Hilkens P, Fanton Y, Martens W, Gervois P, Struys T, Politis C. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Res*. 2014;12(3):778-90.
11. Goukassian D, Diez JA, Asahara T, Schratzberger P, Silver M, et al. Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. *FASEB J*. 2001;15(11):1877-85.
12. Friis T, Kjaer B, Engel AM, Rygaard J, Houen G. A quantitative ELISA-based co-culture angiogenesis and cell proliferation assay. *APMIS*. 2003;111(6):658-68.
13. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol*. 2004;85(5):233-48.
14. Oh SH, Woo JK, Jin Q, Kang HJ, Jeong JW. Identification of novel antiangiogenic anticancer activities of deguelin targeting hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Int J Cancer*. 2008;122(1):5-14.
15. Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLOS ONE*. 2013;8(8):71104.
16. Malinda K. In vivo matrigel migration and angiogenesis assay. *Methods Mol Biol*. 2009;467:287-94.
17. Lee KH, Choi HR, Kim CH. Anti-angiogenic effect of the seed extract of *benincasa hispida* cogniaux. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(3):509-13.
18. Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach D. The sponge/matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis*. 2002;5(1-2):75-80.
19. Fajardo LF, Kowalski J, Kwan HH, Prionas SD, Allison AC. The disc angiogenesis system. *Lab Invest*. 1988;58(6):718-24.
20. Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2006;10(3):588-612.

21. Pan Y, Dong Y, Hou W, Ji Z, Zhi K. Effects of PEMF on microcirculation and angiogenesis in a model of acute hindlimb ischemia in diabetic rats. *Bioelectromagnetics*. 2013;34(3):180-8.
22. Auerbach RL, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chemistry*. 2003;49(1):32-40.
23. Schlatter PK, Karlsson LM, Burri PH. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvascular Research*. 1997;54(1):65-73.
24. Borges J, Tegtmeier FT, Padron NT, Mueller MC, Lang EM. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue Eng*. 2003;9(3):441-50.
25. Ruggiero M. Magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Bioelectromagnetics*. 2004;25:390-6.

Recibido: 10 de febrero de 2015.

Aprobado: 12 de noviembre de 2015.

Miriam Marañón Cardonne. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, avenida de las Américas s/n, Santiago de Cuba, Cuba. Correo electrónico: mmaranon@uo.edu.cu