



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚGICAS

PEDRO HENRIQUE FREITAS MAIA

**ESTABELECIMENTO DE MODELO PARA PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS
ANTIANGIOGÊNICOS NA MEMBRANA DO SACO VITELINO DE EMBRIÃO DE
GALINHA**

FORTALEZA

2019

PEDRO HENRIQUE FREITAS MAIA

**ESTABELECIMENTO DE MODELO PARA PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS
ANTIANGIOGÊNICOS NA MEMBRANA DO SACO VITELINO DE EMBRIÃO DE
GALINHA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Comportamento biocelular em neoplasias

Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho
Coorientador: Francisco Vagnaldo Fechine

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M187e Maia, Pedro Henrique Freitas.
Estabelecimento de modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos na membrana do saco vitelino de embrião de galinha / Pedro Henrique Freitas Maia. – 2020.
116 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine.
1. Angiogênese. 2. Neovascularização. 3. Saco vitelino. 4. Embrião de galinha. I. Título.

CDD 617

PEDRO HENRIQUE FREITAS MAIA

**ESTABELECIMENTO DE MODELO PARA PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS
ANTIANGIOGÊNICOS NA MEMBRANA DO SACO VITELINO DE EMBRIÃO DE
GALINHA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Comportamento biocelular em neoplasias

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Crispim Moraes Lima Ribeiro
Centro Universitário Christus

Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamaru
Universidade Federal do Ceará

À Deus.

À minha esposa, família e
amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por traçar e iluminar meus caminhos, por me permitir oportunidades engrandecedoras e conhecer pessoas extraordinárias, pela minha saúde e capacidade de agregar e repassar conhecimento.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina pela oportunidade da realização do trabalho e pelo suporte docente, físico e administrativo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no custeio da bolsa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, pelo meu acolhimento como orientanda, por todos os conhecimentos compartilhados e confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e pelo incessante estímulo ao conhecimento científico.

Aos Professores integrantes das bancas de qualificação (Profs. Drs. Mirizana Alves de Almeida, João Crispim Moraes Lima Ribeiro e o Msc. Danilo Galvão Rocha) e defesa (Profs. Drs. João Crispim Moraes Lima Ribeiro e Conceição Aparecida Dornelas), pelas ideias e sugestões no aprimoramento do trabalho.

Ao meu colega de pós-graduação e parceiro nesse trabalho Danilo Galvão Rocha, pela intensa colaboração na realização desse estudo.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório de farmacologia pré-clínica do NPDM (Jorge e Nara).

Aos amigos pós-graduandos que compõem outros laboratórios de pesquisa do NPDM

À Adelânia Roque por estar sempre disponível e de portas abertas para ajudar.

À toda a minha família, meu pai (José Erisvaldo), à minha mãe (Cristiany), ao meu irmão (José Erisvaldo Júnior) e a minha cunhada (Glaucia) por estarem sempre ao meu lado incentivando e torcendo pelas minhas conquistas.

À minha linda sobrinha (Elisa) que enche meu coração de alegria sempre que à vejo.

À minha sogra (Maria Kátia) pelo apoio e suporte incondicional.

À minha esposa, amada, Thais Mulatori, por toda ajuda, companheirismo e suporte, no trabalho e na vida.

À minhas maiores inspirações de vida, minha madrinha Dra. Adalveniza Simão da Costa e minha eterna “voinha” Dra. Maria Auxiliadora de Souza.

Aos meus amigos pela positividade e torcida. Aos meus sobrinhos e sobrinhas que aquecem meu coração e me estimulam a ver um mundo melhor no futuro.

Aos animais experimentais, verdadeiros heróis da ciência, que entregaram suas vidas para a realização deste trabalho e progresso do conhecimento científico.

RESUMO

A angiogênese está diretamente ligada a processos moleculares que incluem o crescimento endotelial para o desenvolvimento de novos vasos através da produção de fatores fisiológicos e patológicos, porém o mecanismo envolvido na estimulação e inibição de tal processo ainda não é totalmente elucidado. Portanto, o objetivo deste trabalho é estabelecer um modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos em membrana do saco vitelino de embrião de galinha. O estudo foi dividido em duas fases, primeira foram utilizados ovos galinha férteis acondicionados em uma chocadeira elétrica por 72 horas, no tempo 60h foi realizada uma punção de 5 mL de albume, em seguida os ovos foram devolvidos a chocadeira. No tempo 72 horas da primeira fase foi realizada cuidadosamente a abertura ampla da casca de cada ovo, para isso durante a abertura foram puncionados mais 15 mL de albume. Após a abertura eram realizadas as inoculações das substâncias testadas (solução fisiológica e bevacizumabe) de duas maneiras diferentes, retidas (focal) e não retidas (não focal) a um determinado campo. Após isso, se iniciava a segunda fase, onde os ovos eram mantidos em uma incubadora de CO₂ com temperatura controlada de 37° C por mais 48h. Nesse intervalo de tempo era realizado um acompanhamento temporal com intervalos de 12h, com registros no aumento de 4X no método não focal e 10X no método focal. Para análise das imagens foram utilizados os métodos manual e automático. Os resultados do estudo foram obtidos com dois métodos de avaliação (manual e automática) em duas abordagens (focal e não focal). Foi observado que o perfil de desenvolvimento vascular apresentou em todas as medidas significativamente maior no grupo controle (inoculado com solução fisiológica) comparado ao grupo Bevacizumabe nos dois modelos, evidenciando a ação antiangiogênica do fármaco. Quando realizado o coeficiente de correlação linear de Pearson entre os parâmetros manuais si e no cruzamento entre os parâmetros manuais e automáticos, as correlações se apresentaram extremamente positivas. Foi possível concluir que o modelo de angiogênese na membrana do saco vitelino, tanto na abordagem focal como na não focal, proporciona o monitoramento temporal do processo angiogênico e possibilita a demonstração do efeito antiangiogênico de fármacos.

Palavras-chave: angiogênese, neovascularização, saco vitelino, embrião de galinha.

ABSTRACT

Angiogenesis is directly linked to molecular processes including endothelial growth to develop new vessels through production of physiological and pathological factors, but the mechanism involved in stimulation and inhibition of such process is not yet fully elucidated. Therefore, the objective of this work is to establish a model for prospection of antiangiogenic drugs in chicken embryo yolk sac membrane. The study was divided into two phases, first were used fertile chicken eggs packed in an electric brooder for 72 hours, at 60h time a 5 mL albumen withdrawal was performed, then the eggs were returned to the brooder. Within 72 hours of the first phase, an wide opening of the shell of each egg was carefully performed, and during this opening an additional 15 mL of albumen was withdrawn. After opening, the test substances (saline and bevacizumab) were inoculated in two different ways, retained (focal) and non-retained (non-focal) to a given field. After this, the second phase was started, where the eggs were kept in a CO₂ incubator with a controlled temperature of 37 ° C for a further 48h. During this time period a 12-hour time interval follow-up with 4X increase picture was recorded for non-focal method and 10X for focal method. For image analysis, manual and automatic methods were used. The study results were obtained with two evaluation methods (manual and automatic) in two approaches (focal and non focal). It was observed that the vascular development profile presented in all measures significantly higher in the control group (inoculated with saline solution) compared to the Bevacizumab group in both models, showing the antiangiogenic action of the drug. When Pearson's linear correlation coefficient was performed between the manual parameters si and the crossing between the manual and automatic parameters, the correlations were extremely positive. It was possible to conclude that angiogenesis model in the yolk sac membrane, in both focal and non-focal approach, provides temporal monitoring of angiogenic process and enables the demonstration of drugs antiangiogenic effect.

Key-word: angiogenesis, neovascularization, yolk sac, chicken embryo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Mecanismos de angiogênese.....	19
Figura 2	- Chocadeira IP35D	30
Figura 3	- Seringa posicionada a 90° com a casca do ovo	31
Figura 4	- Seringa posicionada a 90° com a bancada	31
Figura 5	- Tiras adesivas sendo coladas na superfície da casca	32
Figura 6	- Início do corte da casca do ovo	33
Figura 7	- Coleta de albume 15 mL	33
Figura 8	- Acomodação do ovo na horizontal	34
Figura 9	- Posicionamento da moldura de EVA	35
Figura 10	- Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 10X com área demarcada	36
Figura 11	- Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 10X com medida de comprimento avançada demarcada	37
Figura 12	- Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 10X demonstrando base maior de ambos trapézios (A), base menor do trapézio 1 (B), base menor do trapézio 2 (C), altura do trapézio 1 (D) e altura do trapézio 2 (E)	38
Figura 13	- Seleção da área de interesse no SAMV em um embrião avaliado de forma focal	39
Figura 14	- Processo de segmentação no SAMV em um embrião avaliado de forma focal	40
Figura 15	- Processo para obtenção da área vascular e do perímetro vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma focal	40
Figura 16	- Processo de afinamento e obtenção do comprimento vascular total e da espessura vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma focal	41
Figura 17	- Inoculação da substância sobre o embrião	42
Figura 18	- Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 4X com área demarcada.	43
Figura 19	- Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 4X demonstrando diâmetro vertical (1) e diâmetro horizontal (2)	44
Figura 20	- Seleção da área de interesse no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal	45

Figura 21	- Processo de segmentação no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal	45
Figura 22	- Processo para obtenção da área vascular e do perímetro vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal	46
Figura 23	- Processo de afinamento e obtenção do comprimento vascular total e da espessura vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal	47
Figura 24	- Registro temporal de embrião do grupo Controle do modelo com abordagem focal	51
Figura 25	- Registro temporal de um embrião do grupo Controle do modelo com abordagem não focal	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	52
Gráfico 2	- Progressão temporal da área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	54
Gráfico 3	- Progressão temporal do comprimento avançado nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	56
Gráfico 4	- Progressão temporal da área bitrapezoidal nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	58
Gráfico 5	- Avaliação global do crescimento vascular através da ASC da progressão temporal da área bitrapezoidal no modelo com abordagem focal	60
Gráfico 6	- Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área bitrapezoidal dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal	62
Gráfico 7	- Progressão temporal da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	63
Gráfico 8	- Avaliação global do crescimento vascular a partir da área sob a curva da progressão temporal da área vascular no modelo com abordagem focal	65
Gráfico 9	- Progressão temporal do perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	66
Gráfico 10	- Progressão temporal do comprimento vascular total nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	68
Gráfico 11	- Progressão temporal da espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	70
Gráfico 12	- Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área vascular dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal	73
Gráfico 13	- Gráfico de dispersão entre as medidas manuais área bitrapezoidal e área demarcada	74

Gráfico 14	- Gráfico de dispersão entre a medida automática área vascular e as medidas manuais área demarcada (A) e área bitrapezoidal (B)	75
Gráfico 15	- Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	77
Gráfico 16	- Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle pelo método focal e não focal	79
Gráfico 17	- Progressão temporal da área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	80
Gráfico 18	- Progressão temporal da área da elipse nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	82
Gráfico 19	- Avaliação global do crescimento vascular através da ASC da progressão temporal da área da elipse no modelo com abordagem não focal	84
Gráfico 20	- Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área da elipse dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem não focal	86
Gráfico 21	- Progressão temporal da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	87
Gráfico 22	- Avaliação global do crescimento vascular através da ASC da progressão temporal da área vascular no modelo com abordagem não focal	89
Gráfico 23	- Progressão temporal do perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	90
Gráfico 24	- Progressão temporal do comprimento vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	92
Gráfico 25	- Progressão temporal da espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	94
Gráfico 26	- Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área da vascular dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem não focal	97
Gráfico 27	- Gráfico de dispersão entre as medidas manuais área da elipse e área demarcada	98

Gráfico 28 - Gráfico de dispersão entre a medida automática área vascular e as medidas manuais área demarcada (A) e área da elipse (B) 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal	53
Tabela 2	- Área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal	55
Tabela 3	- Comprimento avançado nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal	57
Tabela 4	- Área bitrapezoidal nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal	59
Tabela 5	- Taxas de crescimento da área bitrapezoidal nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal	61
Tabela 6	- Área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal	64
Tabela 7	- Perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal	67
Tabela 8	- Comprimento vascular total nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal	69
Tabela 9	- Espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal	71
Tabela 10	- Taxas de crescimento da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal	72
Tabela 11	- Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem não focal	78
Tabela 12	- Área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal	81
Tabela 13	- Área da elipse nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal	83
Tabela 14	- Taxas de crescimento da área da elipse nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	85
Tabela 15	- Área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal	88

Tabela 16	- Perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal	91
Tabela 17	- Comprimento vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal	93
Tabela 18	- Espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal	95
Tabela 19	- Taxas de crescimento da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área Sob a Curva
CMC	Carboximetilcelulose
EVA	Espuma Vinílica de Acetato
HIF-1	Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia
IACUC	Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais
LFPC	Laboratório de Farmacologia Pré-clínica
MCA	Membrana Corioalantóide
MSV	Membrana do Saco Vitelino
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
PGF	Fator de Crescimento Placentário
PVC	Policloreto de Vinila
SAMV	Sistema de Análise Morfométrica Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Angiogênese	19
1.2	Ensaio de angiogênese <i>in vitro</i>	21
1.3	Ensaio de angiogênese <i>in vivo</i>	22
1.4	Ensaio de angiogênese em embrião de aves.....	23
1.4.1	<i>Ensaio de angiogênese em membrana do saco vitelino (MSV) de embrião de galinha</i>	<i>24</i>
1.4.2	<i>Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóide (MCA) de embrião de galinha</i>	<i>24</i>
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	26
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Caracterização do estudo	29
4.2	Aspectos éticos	29
4.3	Animais.....	29
4.4	Local de realização do estudo.....	29
4.5	Cultura de embrião de galinha <i>in ovo</i>	30
4.6	Avaliação focal.....	36
4.6.1	<i>Preparo do embrião.....</i>	<i>36</i>
4.6.2	<i>Aquisição das imagens</i>	<i>37</i>
4.6.3	<i>Método de quantificação manual da resposta angiogênica.....</i>	<i>37</i>
4.6.4	<i>Método de quantificação automática da resposta angiogênica.....</i>	<i>38</i>
4.6.5	<i>Aplicação do método na avaliação do efeito antiangiogênico do bevacizumabe</i>	<i>42</i>
4.7	Avaliação não focal	43
4.7.1	<i>Preparo do embrião.....</i>	<i>43</i>
4.7.2	<i>Aquisição das imagens</i>	<i>44</i>
4.7.3	<i>Método de quantificação manual da resposta angiogênica.....</i>	<i>44</i>
4.7.4	<i>Método de quantificação automática da resposta angiogênica.....</i>	<i>45</i>
4.7.5	<i>Aplicação do método na avaliação do efeito antiangiogênico do bevacizumabe</i>	<i>48</i>

4.8	Análise estatística	49
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos em membrana de saco vitelino de embrião de galinha com abordagem focal.....	51
5.1.1	<i>Mortalidade.....</i>	52
5.1.2	<i>Medidas manuais de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas.....</i>	54
5.1.3	<i>Medidas automáticas de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas</i>	64
5.1.4	<i>Correlação entre medidas manuais e automáticas de quantificação do crescimento vascular.....</i>	75
5.2	Modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos em membrana de saco vitelino de embrião de galinha com abordagem não focal.....	76
5.2.1	<i>Mortalidade.....</i>	77
5.2.2	<i>Medidas manuais de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas.....</i>	80
5.2.3	<i>Medidas automáticas de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas</i>	88
5.2.4	<i>Correlação entre medidas manuais e automáticas de quantificação do crescimento vascular.....</i>	99
6	DISCUSSÃO	101
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
8	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese

Há uma divergência entre autores sobre qual trabalho descreveu pela primeira vez a angiogênese. Carmeliet em 2005 cita que em 1787 o Dr. John Hunter descreveu o crescimento de capilares sanguíneos em chifres de renas e usou pela primeira vez o termo angiogênese. Já Cooke em 2001, indica que foi Rudolf Steine em 1900 pesquisando formação de vasos em suprarrenais. Ausprunk e Folkman (1977), citam que o primeiro uso dessa expressão aconteceu em 1935 em uma pesquisa de Herting sobre placenta.

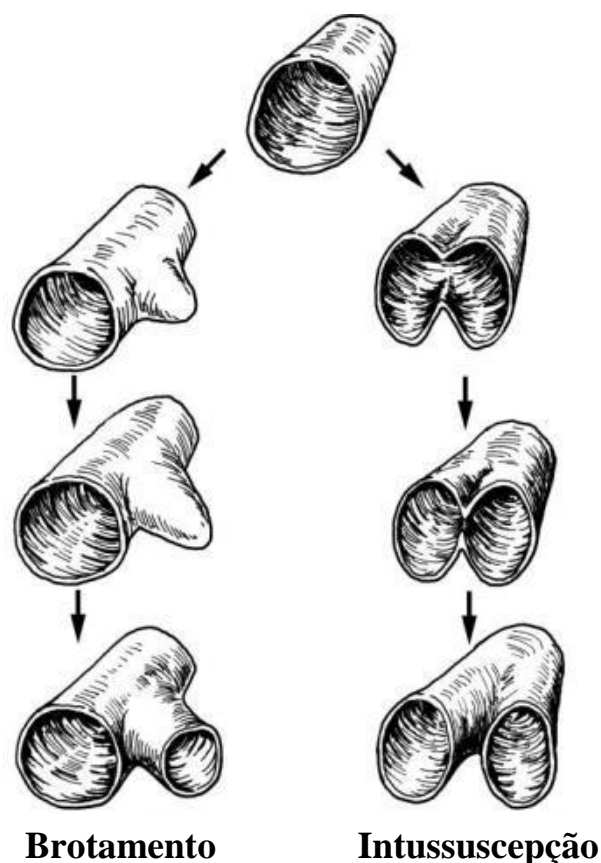
Define-se angiogênese como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir das células endoteliais diferenciadas dos previamente existentes e, pode ser distinguida da vasculogênese porque nessa última os vasos são formados a partir dos angioblastos em um local onde não há nenhum vaso sanguíneo prévio. Da arteriogênese se diferencia, pois, essa consiste na organização de artérias maduras a través de vasos arteriais prévios e devido a um processo obstrutivo (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; YOSHIDA, 2005).

São identificados dois mecanismos distintos no processo de angiogênese: brotamento e intussuscepção. O primeiro ocorre em tecidos pobremente oxigenados onde as células parenquimatosas, em resposta ao fator induzido por hipóxia (HIF-1 α), liberam o fator de crescimento vascular VEGF (*vascular endothelial growth factor – fator de crescimento endotelial vascular*), com a finalidade de criar vasos que garantam um aporte sanguíneo adequado para suprir as necessidades metabólicas das mesmas. A ativação celular endotelial, degradação enzimática da lâmina basal, migração e proliferação de células endoteliais, tubulogênese e estabilização de pericitos, são alguns dos passos necessários para a brotamento de novos vasos (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; KE; COSTA, 2006).

O segundo mecanismo ocorre quando a parede de um vaso se estende longitudinalmente dentro do próprio lúmen dividindo-o em dois, é evidenciada ao longo da vida de um organismo, porém tem um papel fundamental durante o desenvolvimento embrionário, caracterizado por um rápido crescimento e limitação de recursos. Esse tipo de angiogênese considera-se mais acelerada e eficiente do que primeira, pois não existe a necessidade imediata de proliferação e migração celular e o remodelamento da matriz extracelular é mais simples (Figura 1) (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; DVORAK, 2003; BURRI,

HLUSHCHUCK, DJONOV, 2004; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; FECHINE-JAMACARU, 2006; YUE *et al.* 2007; ADAIR; MONTANI, 2010; RIBEIRO, 2011; MELO, 2018).

Figura 1: Mecanismos de angiogênese.



Fonte: Adaptado de PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004.

A angiogênese é um processo complexo que requer um minucioso balanço entre agentes promotores como o VEGF, Factor de crescimento de fibroblastos, angiopoietinas etc., e inibidores como interferons, interleucinas, inibidores de protease, entre outros. O VEGF atua em ambos mecanismos, brotamento e intussuscepção, e é importante, entre outros motivos, por promover o aumento da permeabilidade vascular, estimular a migração, proliferação e invasão de células endoteliais, assim como inibir a apoptose das mesmas. Esse fator pró-angiogênico é composto por uma família de cinco isoformas, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PGF) e liga-se a dois receptores primários, do tipo tirosina quinase, nas células endoteliais: VEGFR1 e VEGFR2. A ativação do VEGFR2 além de levar a

proliferação, migração e diferenciação celular, também estimula a produção de óxido nítrico (NO), substância muito importante para completar a resposta angiogênica (PAPETI; HERMAN, 2002; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; FECHINE-JAMACARU, 2006).

Finalmente, a angiogênese tem um papel central em diversos processos fisiológicos como o desenvolvimento fetal, crescimento tecidual, processos cicatriciais, ciclo menstrual, resposta imune e desenvolvimento mamário durante a lactação. Porém, também está relacionada com diversas condições patológicas como doenças isquêmicas, inflamatórias, neoplásicas, metastáticas, entre outras, estando as duas últimas entre as principais áreas de pesquisa nos últimos anos. (VALIATTI, *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2011; YOO; KWON, 2013; WELTI, 2013; REDONDO 2016; RAJABI, 2017; JUANES *et al.*, 2019).

1.2 Ensaios de angiogênese *in vitro*

Ensaios de angiogênese realizados *in vitro* possibilitaram um significativo progresso na elucidação dos mecanismos de ação de vários fatores angiogênicos e antiangiogênicos. Entre as suas vantagens estão, permitir a identificação de efeitos diretos no funcionamento das células endoteliais e a sua manipulação genética, além de possibilitar a análise isolada não só dos processos que contribuem à angiogênese, também de variáveis como os componentes da matriz. Adicionalmente, e dependendo do tipo de ensaio, a quantificação de vasos sanguíneos pode ser mais fácil e automatizada, além de muitos deles poderem ser adaptados a modelos de grande escala. Por outro lado, a equipe de trabalho não precisa de conhecimentos especializados relacionados com a contenção animal e geralmente são mais baratos do que os ensaios *in vivo*. Contrário às vantagens anteriormente citadas, ensaios *in vitro* encontram algumas dificuldades principalmente quando as pesquisas são realizadas em tecidos humanos, pois o custo aumenta consideravelmente e a interpretação é mais complexa (GOODWIN, 2007; RIBATTI, 2010).

Agora bem, existem diferentes tipos de ensaios *in vitro*, porém o exame de neo-vasos em microcirculação e os biopolímeros vascularizados (Matrigel) são os mais utilizados. Os fatores que de fato vão determinar a escolha do método são o custo de reprodução, facilidade do uso, reprodutibilidade e confiabilidade do modelo (GOODWIN, 2007; RIBATTI, 2010).

1.3 Ensaios de angiogênese *in vivo*

Modelos realizados *in vivo* devem propiciar o desenvolvimento de angiogênese em ambiente natural, além de proporcionar a monitorização temporal e quantificação da resposta angiogênica (TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004; FECHINE-JAMACARU, 2006).

Importantes ensaios *in vivo* são os realizados nas bolsas jugais de hamster. Essas estruturas são invaginações saculares bilaterais e dilatáveis que se encontram nas mucosas jugais e se estendem, sob a pele, da parte caudal da cavidade oral até as escápulas do animal. Devido à sua grande capacidade de se distender e alterar o seu volume, têm como função principal o armazenamento de alimentos (HOCHMAN *et al.*, 2003; MELO, 2018).

As bolsas jugais são definidas como uma “zona de privilégio imunológico”, devido à ausência da circulação linfática e por sua vez bloqueio da resposta imune. Atividades que especificamente são realizadas pelos linfócitos, passam a ocorrer nos órgãos linfoides secundários (ARRUDA; NOGUEIRA; BORDON, 2002; MELO, 2018).

Em 2019 Juanes e colaboradores desenvolveram um novo modelo experimental no qual inoculavam um número padronizado de células tumorais na intenção de gerar maior consistência tumoral entre os indivíduos, visando resultados mais seguros. Modelos com implante de esponja visam estudar a angiogênese inflamatória, visto que esse implante causa um estímulo físico e de trauma tissular, havendo a liberação dos mediadores inflamatórios e dando início ao processo de formação de neovasos (CAMPOS *et al.*, 2006).

O ensaio de angiogênese em córnea é um dos modelos mais utilizados na fase pré-clínica para estudar o processo de constituição de novos capilares. No primeiro modelo, denominado de angiogênese inflamatória se dá com um estímulo artificial feito na córnea que tem como resultado uma resposta angiogênica, especialmente pelo mecanismo de brotamento, que se caracteriza pelo crescimento de novos vasos, derivados do plexo vascular límbico, no estroma corneano, em direção ao local do estímulo angiogênicos. Como esse modelo não é invasivo é possível o acompanhamento direto, temporal e espacial da formação de novos capilares, que podem ser detectados desde sua fase mais inicial, permitindo também a utilização de uma determinada droga a ser testada (CONRAD *et al.*, 1994; BECKER *et al.*, 1998; TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004; HASAN *et al.*, 2004; FECHINE-JAMACARU, 2005; RIBEIRO, 2011).

Em outro modelo cria-se uma bolsa na córnea e as substâncias a serem testadas são colocadas em microbolsas que vão inibir ou estimular a angiogênese. Devido a córnea ser uma estrutura que em condições normais é isenta de vasos sanguíneos e linfáticos, translúcida, de fácil acesso e observação, qualquer vaso que surja no seu estroma será decorrente de estímulo angiogênico prévio. Essa é uma grande vantagem desses métodos, podendo ser considerado um sítio privilegiado imunologicamente (AUERBACH *et al.*, 2003; TAHERGORABI; KHAZAEI, 2012; RIBEIRO, 2011).

Os modelos desenvolvidos em córnea tem como característica um padrão denominado bifásico, onde observa-se uma fase de proliferação vascular, com muito brotos e alta taxa de angiogênese e outra fase de maturação vascular, com vasos mais longos, menos ramificações e taxa de angiogênese estabilizada. Os ensaios em tecido corneano apesar de se beneficiar da fácil identificação de neovasos é considerado um ensaio relativamente caro e não adequado para rastreio em larga escala (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; FECHINE-JAMACARU, 2006; RIBEIRO, 2011; TAHERGORABI; KHAZAEI, 2011).

1.4 Ensaios de angiogênese em embrião de aves

O ensaio com embrião de galinha vem sendo muito estudado desde a época de Aristóteles, que examinava a progressão da angiogênese diariamente com a abertura dos ovos até os dias atuais. O baixo custo e a simplicidade de execução quando comparado a outros modelos, elevam o interesse da utilização do embrião de galinha em pesquisas de insumos biológicos e farmacêuticos (COSTA, 2011)

Nos EUA, União Europeia e Suíça estão em vigor leis que permitem experimentos com embriões de galinha sem a necessidade de autorização experimental dos comitês de ética animal, essas leis estão embasadas na afirmação que os experimentos começam e terminam antes dos ovos chocarem. Não descartando a necessidade de cuidado ao realizar os modelos, visando reduzir o número de embriões utilizados (COSTA, 2011).

Na maioria dos países, experimentos com embriões de aves não necessitam de procedimentos administrativos para obter aprovação em comitê de ética e pesquisa, pois só é considerado animal vivo após o 17º dia de desenvolvimento. Além disso, os experimentos são finalizados antes do desenvolvimento de centros cerebrais ligados a percepção da dor. Já o Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (IACUC), uma Associação do Centro

Médico e Tufts da Nova Inglaterra, bem como os Instituto Nacional de Saúde, EUA (National Institute of Health, 1991), estabeleceram que um embrião de galinha que não atingisse o 14º dia de gestação não teria experiência dolorosa e, portanto, pode ser usado para experimentação sem quaisquer restrições éticas ou aprovação prévia dos protocolos (RIBATTI, 2016).

1.4.1 Ensaio de angiogênese em membrana do saco vitelino (MSV) de embrião de galinha

A membrana do saco vitelino (MSV) é uma estrutura extraembrionária responsável por transferir os nutrientes necessários do conteúdo do saco vitelino para o embrião de galinha, nela ocorrem tanto a vasculogênese quanto a angiogênese. Vários protocolos são utilizados para aplicação de agentes no intuito de estudar angiogênese na MSV, dentre eles, estão: discos de metilcelulose, de silicone, discos de papel filtro e pastilhas de agarose (PEIFER; DANNHARDT, 2004; YADGARY; YAIR; UNI, 2011; COSTA, 2013).

Nesse método os ovos fertilizados são incubados por 3 dias a 38°C e 100% de umidade, no terceiro dia o ovo é aberto e seu conteúdo é transferido para uma placa de cultura de 100 mm de diâmetro que será incubada por mais 24 horas. Um pedaço de filtro de papel de 6 mm de diâmetro, contendo a substância a ser testada, é posicionado na superfície da membrana do saco vitelino, evitando os vasos sanguíneos principais. No sétimo dia o filtro de papel é removido e o crescimento vascular é avaliado nessa área (LIU; XIE; ZHOU, 2018).

É considerado um ótimo modelo para estudar a angiogênese, devido a quantidade aumentada de vasos, por ser de fácil reprodução, baixo custo bem como a ausência de um sistema imunológico maduro (PEIFER; DANNHARDT, 2004; CHENG *et al.*, 2016).

1.4.2 Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóide (MCA) de embrião de galinha

Neste ensaio, as substâncias a serem testadas são colocadas diretamente sobre a membrana corioalantóide através de uma abertura realizada na casca de ovos de embriões de galinha nos dias 7-9. A seguir a abertura é fechada e os ovos reincubados. A angiogênese é analisada após o tempo de incubação adequado (AUERBACH *et al.* 2003).

A principal desvantagem do ensaio em MCA é o fato de sua rede vascular ser bem desenvolvida levando ao aumento da dificuldade para especificar os efeitos da substância de teste. Uma importante limitação, é a reação inflamatória ao implante, para diminuir a chances de evoluir com reações inflamatórias é realizar um implante mais prematuramente aproveitando um sistema imunológico ainda imaturo (RIBATTI, 2008; RIBATTI, 2010).

Em outra abordagem metodológica, esponjas de gelatina contendo a substância angiogénica ou anti-angiogénica são colocadas na MCA em desenvolvimento. O desenvolvimento dos vasos sanguíneos pode ser realizado verticalmente na esponja e a borda entre a esponja e o mesênquima circundante e o número de vasos sanguíneos são contados 4 dias após a colocação (HASAN *et al.*, 2004; RIBATTI *et al.*, 2010).

Ensaio na MCA são considerados relativamente baratos de fácil execução e apropriados para triagem em larga escala. Entretanto apresentam problemas relacionados a rápida mudança morfológica que sofre e a análise pode ser dificultada devido ao disfarce dos novos vasos em relação aos já existentes (RIBATTI, 2010; TAHERGORABI; KHAZAEI, 2012;).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O processo da angiogênese tornou-se um importante alvo de estudos, visto que o uso clínico de fatores antiangiogênicos e o desenvolvimento de novas drogas pode ajudar a acelerar a corrida contra o câncer e auxiliar no tratamento de diversas outras doenças que se relacionam com esse fenômeno.

Diversos modelos animais foram utilizados para o estudo dos mecanismos da angiogênese fisiológica e patológica, incluindo modelos que utilizavam mamíferos, aves e peixes. Dentre eles, o modelo que utiliza embriões de galinha tem sido bem aceito, pois oferece características vantajosas, dentre elas podemos citar: a fácil manipulação dentro do ambiente laboratorial; o baixo custo; e a rica vascularização, permitindo a análise detalhada do crescimento de novos vasos.

Além disso, o estabelecimento dos modelos em angiogênese fisiológica de embrião de galinha abrem a possibilidade para realização de estudos em angiogênese tumoral, visto que o sistema imunológico do embrião é inativo até a segunda semana de desenvolvimento, permitindo a implantação de diversas linhagens diferentes de células e tumores sem que haja uma resposta imune competente.

Além disso segundo algumas classificações internacionais, modelos como esse não são considerados modelos animais, por se tratarem de embriões, não sendo classificados como um animal vivo em diversos países até o 17º dia de desenvolvimento embrionário, pontua-se também que os mesmos ainda não possuem o sistema nervoso maduro em relação a sensação de dor (RIBATTI, 2016).

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) constitui um núcleo de referência em pesquisa de novas substâncias com potencial terapêutico em diversas áreas, incluindo na oncologia. Atualmente o NPDM não dispõe de modelos adequados para a prospecção de fármacos com atividade antiangiogênica e que possibilitem a análise e quantificação das modificações induzidas por tais agentes na resposta angiogênica. Propomos também um modelo que, tem pouca frequência de uso (membrana do saco vitelino), fazendo um acompanhamento temporal por imagens de 12 em 12 horas até que se complete 48 horas de acompanhamento, tendo em vista que os estudos realizados fazem um acompanhamento de apenas 24 horas e se mostra pouco eficiente na observação do desenvolvimento de neovasos.

Assim, o estabelecimento desses modelos, são de grande relevância para incluir uma metodologia alternativa ao uso de roedores, contribuindo com o princípio dos 3R's (*Reduction, refinement and replacement*), e que pode ser de grande ajuda na descoberta de novas substâncias com potencial terapêutico anticâncer.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um modelo de angiogênese na membrana do saco vitelino de embrião de galinha que proporcione o monitoramento temporal do processo angiogênico e possibilite a prospecção de fármacos antiangiogênicos.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1** Estabelecer um modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos em membrana do saco vitelino de embrião de galinha com abordagem focal;
- 3.2.2** Elaborar um modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos em membrana do saco vitelino de embrião de galinha com abordagem não focal;
- 3.2.3** Propor parâmetros para quantificação manual do processo angiogênico em ambas as abordagens;
- 3.2.4** Demonstrar a utilidade do modelo proposto na detecção do efeito antiangiogênicos de fármacos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Se trata de um estudo metodológico com a finalidade de desenvolver e validar um ensaio para o estudo de angiogênese, que proporcione um acompanhamento temporal para prospecção de fármacos antiangiogênicos.

4.2 Aspectos éticos

A legislação brasileira não possui nenhuma menção a aspectos éticos em embriões de galinha, entretanto a maioria dos países não considera o embrião de galinha um animal vivo até o 17º dia de desenvolvimento embrionário. Nos Estados Unidos, o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH - *National Institute of Health*) estabeleceu que o embrião de galinha não tem sensações de dor até o 14º dia de desenvolvimento embrionário e, por isso, não podem ser utilizados em experimentos sem qualquer restrição ética ou necessidade de aprovação prévia (RIBATTI, 2016). No entanto, a realização desse estudo foi aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa Animal do NPDM, sob o número de protocolo 07010819-0 (ANEXO A).

4.3 Animais

Foram utilizados ovos férteis (*Gallus gallus domesticus*) adquiridos na granja (Companhia de Alimentos do Nordeste - Cialne), após a aquisição foram acondicionados no laboratório em local com temperatura controlada a 22º C do por, no máximo, 7 dias.

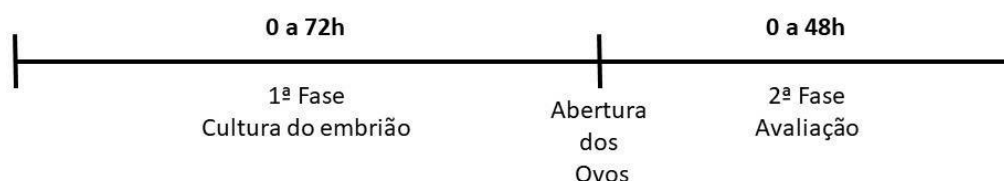
4.4 Local de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia Pré-clínica (LFPC) integrante do NPDM – Faculdade de Medicina – UFC, em Fortaleza-Ceará, o qual possui infraestrutura necessária para realização dos experimentos.

4.5 Cultura do embrião de galinha *in ovo*

São considerados ensaios realizados *in ovo* aqueles que são inteiramente executados no interior do ovo do animal. Já ensaios realizados totalmente fora do ovo, ou que em algum momento do ensaio, a cultura do embrião foi realizada externa ao ovo são denominados *ex ovo*.

O estudo é dividido em duas fases, a primeira denominada cultura do embrião, se inicia no tempo zero e termina no tempo 72h nessa fase o embrião encontra-se na chocadeira elétrica, a segunda fase é denominada avaliação, se inicia após a abertura dos ovos e vai do tempo zero ao tempo 48h, nessa fase foi feito o acompanhamento fotográfico dos embriões.



A primeira fase se dá início separando 20 ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*), após isso foram lavados individualmente em água corrente e secados com papel toalha, posteriormente foi realizado a antissepsia com gaze estéril e álcool 70%, logo após foram colocados na horizontal em uma chocadeira elétrica que possui um mecanismo automático e intervalado de rotação dos ovos (Modelo IP35D, Premium Ecológica) (Figura 2), com temperatura e umidade controladas (37,5 a 38° C; 60% de umidade) por 72 horas.

Figura 2: Chocadeira IP35D.



Fonte: <https://www.premiuecologica.com.br/chocadeira-ip-35d.html>

No tempo 60 horas foi repetida a antissepsia com álcool 70% e os ovos posicionados com a ponta mais romba para cima, fazendo com que a gema também adotasse esse sentido, uma vez posicionados punccionou-se cuidadosamente na extremidade oposta com a agulha 25mm x 0.7mm e seringa de 5 mL a 90° com a casca do ovo (Figura 3). Uma vez perfurada a casca era realizado um movimento com a agulha para traze-la a 90° com a bancada, diminuindo a angulação em relação a casca (Figura 4).

Figura 3: Seringa posicionada a 90° com a casca do ovo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 4: Seringa posicionada a 90° com a bancada.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após esse posicionamento foi coletado 5 mL de albume com seringa, para tampar o orifício utilizou-se um pedaço pequeno pedaço de fita adesiva, sendo colocado de volta na chocadeira com o orifício voltado para cima. Ao final das punções o mecanismo de rotação dos ovos era desligado. Esse procedimento de punção teve o objetivo de facilitar a abertura dos ovos, que será realizada ao final das 72 horas.

Momentos antes da abertura dos ovos os instrumentos cirúrgicos utilizados (tesouras, pinças), incubadora, copos de plástico, microscópio, bem como todo o ambiente era higienizado com álcool 70% a fim de diminuir o risco de contaminações. Ao final das 72 horas iniciava-se o processo de abertura, os ovos também eram limpos com álcool 70% e em seguida, tiras de fita adesiva eram coladas na superfície da casca, cobrindo aproximadamente metade do ovo, essa fita tinha o importante objetivo de grudar na casca para que no momento da abertura, essa casca não se despedaçasse caindo sobre o embrião (Figura 5).

Figura 5: Tiras adesivas sendo coladas na superfície da casca.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O processo de abertura consistia em fazer um furo na casca com a própria tesoura, seguindo para pequena abertura de forma elíptica com uma tesoura curva de microcirurgia cortando a casca para facilitar a visualização (Figura 6), nesse momento, eram coletados mais 15 mL de albume (Figura 7), com o objetivo de reduzir o volume de líquidos no interior do ovo mantendo a gema intacta e permitindo uma exposição ampla do embrião.

Figura 6: Início do corte da casca do ovo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 7: Coleta de 15 mL albume.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após a coleta, era feita uma abertura ampla da casca até visualização completa do interior do ovo e por sua vez a melhor visualização do embrião. O próximo passo era acomodar o ovo na horizontal sobre um copo descartável de poliestireno de 50 mL que teve sua borda cortada, com o objetivo de ficar mais maleável e assim acondicionar melhor o ovo, após isso, os dois eram colocados dentro de um outro copo descartável de poliestireno de 150 mL (Figura 8).

Figura 8: Acomodação do ovo na horizontal em cima do copo de 50mL e dentro do copo de 150mL.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

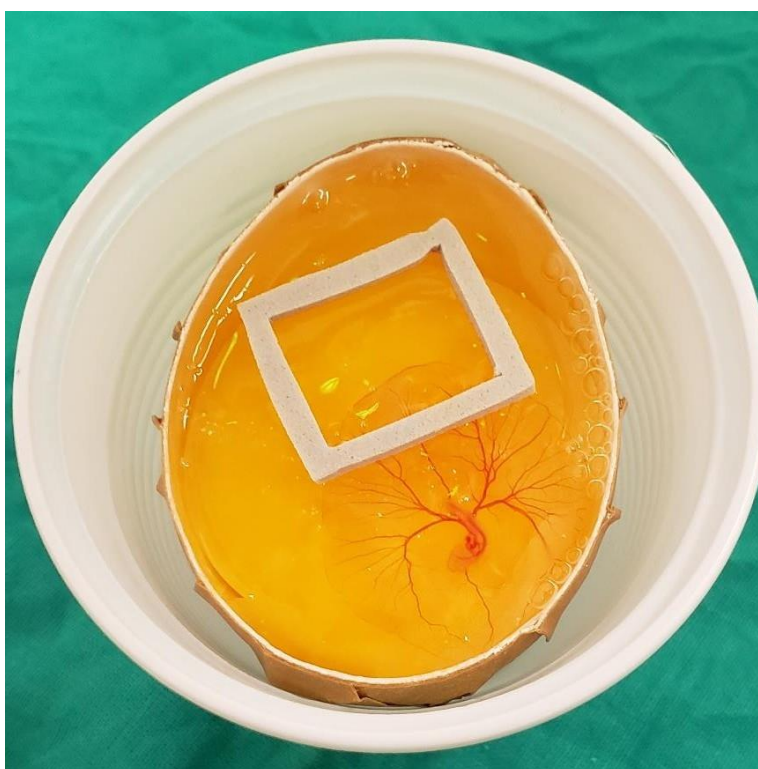
Após abertura dos ovos, era realizada a inoculação das substâncias testadas, o copo de 150mL era tampado com filme de policloreto de vinila (PVC) a fim de evitar contaminação e perfurado com agulha diversas vezes para facilitar a aeração, em seguida os ovos eram acomodados e mantidos em uma incubadora de CO₂ (Modelo MCO-17AC, Sanyo Scientific) com temperatura controlada de 37° C por mais 48h. Durante as 48h era realizado um acompanhamento temporal, com registros fotográficos realizados a cada 12 horas, tendo início imediato após a inoculação das substâncias, utilizando um microscópio cirúrgico (Modelo MC-M2222, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo).

4.6 Avaliação focal

4.6.1 Preparo do embrião

Nesse modelo a droga foi inoculada dentro de um campo retangular com área interna de 19mm por 16mm e paredes com espessura de 1,5 a 2mm. O campo era composto de espuma vinílica de acetato (EVA) e era colocado na borda da área vascular do embrião para inoculação da droga e acompanhamento temporal do crescimento dos vasos dentro do campo. Com o objetivo conter a substância naquele local que posteriormente seria analisado (Figura 9).

Figura 9: Posicionamento da moldura de EVA.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.6.2 Aquisição das imagens

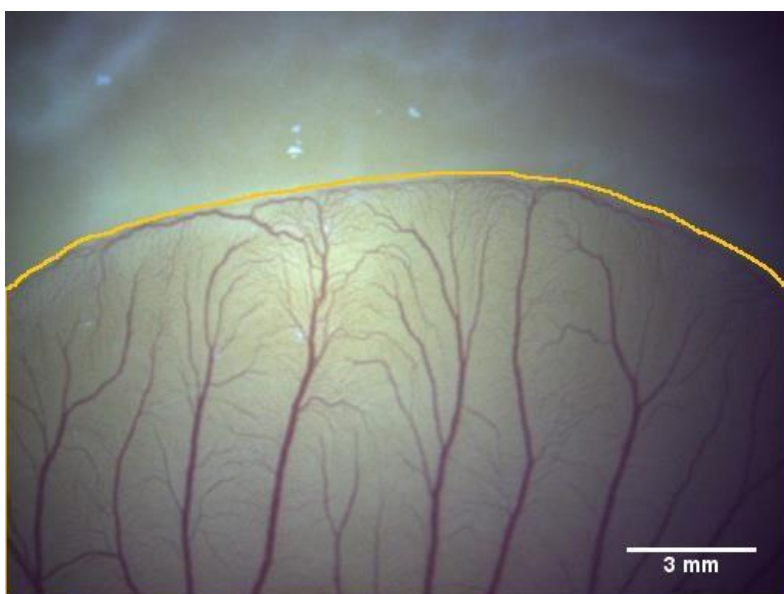
As imagens eram obtidas utilizando um microscópio cirúrgico (Modelo MC-M2222, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo) no aumento de 10X, com o foco ajustado para melhor visualização e iluminação ajustada e padronizada igualmente para todas as fotos e grupos.

4.6.3 Método de quantificação manual da resposta angiogênica

Na realização da quantificação manual foi utilizado o *software* ImageJ para obtenção das medidas que seriam posteriormente analisadas. O primeiro passo foi determinar no *software* uma escala em que fosse possível a conversão de pixel para milímetros.

Ao todo foram utilizados 3 métodos, o primeiro deles, foi para determinar a área vascularizada, utilizando o ImageJ realizava-se um contorno na área do embrião aparente no interior da janela de EVA, deste modo o *software* pôde determinar a área em mm^2 . A figura 10 abaixo mostra o traçado em cor laranja fazendo o contorno da região de interesse do embrião como descrito acima.

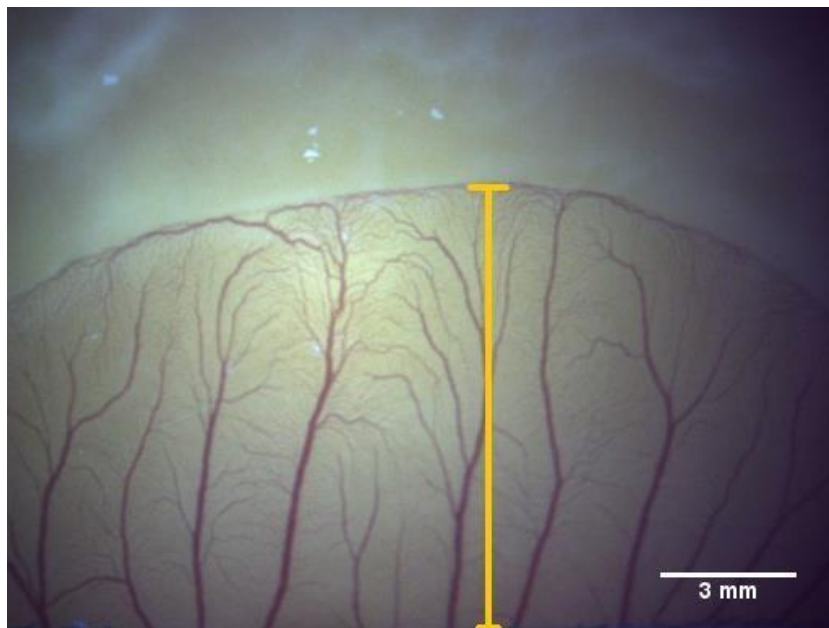
Figura 10: Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 10X com área demarcada.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A próxima medida realizada foi para obtenção do comprimento avançado, que é definido como a medida da distância entre a borda interna e inferior do EVA e o ponto vascular mais distante. Essa medida teve como objetivo observar o avanço da rede vascular. Abaixo, na figura 11 o traçado laranja indica a medida para obtenção do comprimento avançado.

Figura 11: Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 10X com medida de comprimento avançado demarcada.

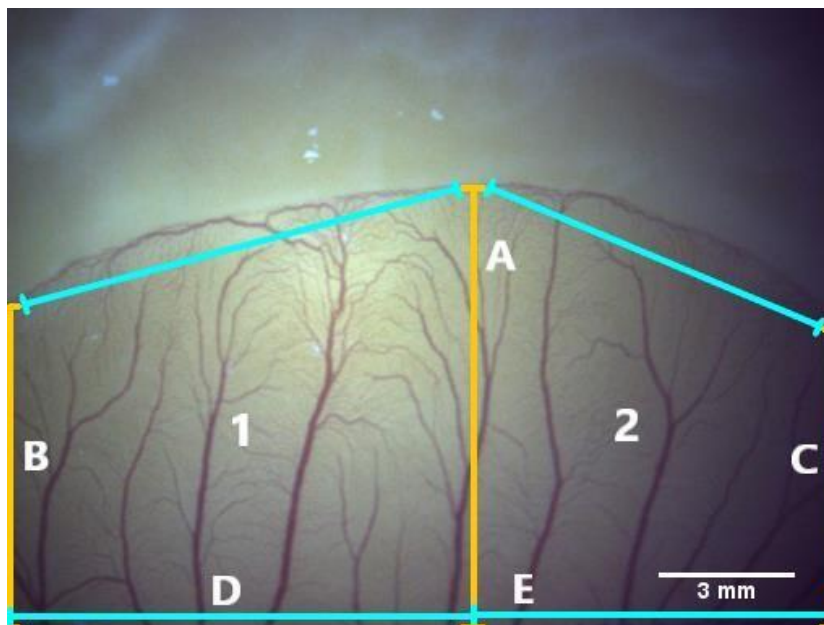


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Outro método utilizado foi para obtenção a área bitrapezoidal, nesse método, a área vascularizada era dividida em dois trapézios que tinham suas áreas calculadas separadamente e ao final somadas. As medidas para o cálculo das áreas dos trapézios estão demonstradas na figura 12.

$$\text{Área do trapézio} = \frac{(\text{Base maior} + \text{base menor}) \times \text{Altura}}{2}$$

Figura 12: Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 10X demonstrando base maior de ambos trapézios (A), base menor do trapézio 1 (B), base menor do trapézio 2 (C), altura do trapézio 1 (D) e altura do trapézio 2 (E).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.6.4 Método de quantificação automática da resposta angiogênica

Para quantificação automática da resposta angiogênica utilizou-se o Sistema de Análise Morfométrica Vascular (SAMV), *software* desenvolvido e validado para análise morfométrica e fractal da rede vascular em modelos experimentais de câncer (FECHINE-JAMACARU, 2018).

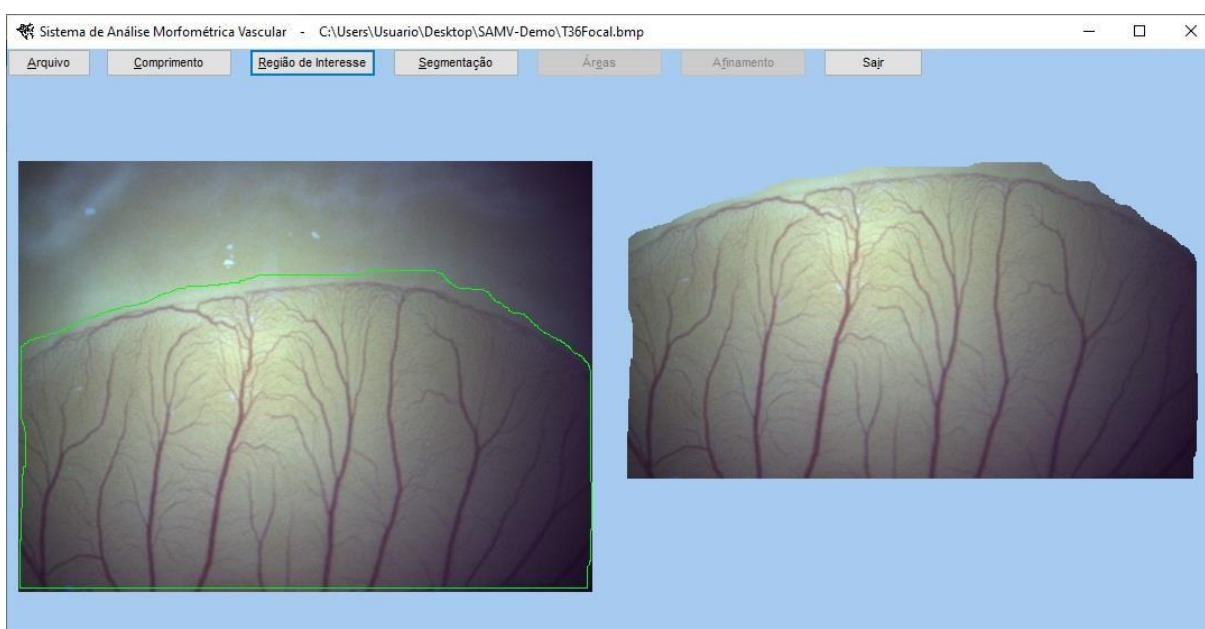
A partir desse sistema, foram obtidos parâmetros de área vascular, perímetro vascular, comprimento vascular total e espessura vascular. A área vascular consiste na contagem total dos pixels considerados vasos sanguíneos da imagem, o perímetro vascular consiste na contagem total dos pixels das bordas dos vasos, o comprimento vascular total consiste na extensão total de todos os vasos sanguíneos e a espessura vascular é calculada dividindo-se a área vascular pelo comprimento vascular total, sendo assim a espessura vascular média dos vasos.

A área vascular foi convertida de pixels em mm^2 , o perímetro vascular e o comprimento vascular total foram convertidos em mm, e a espessura vascular foi convertida de

pixels em μm . Todas as conversões foram feitas a partir do fator de escala 28 pixels/mm ou 784 pixels/mm².

Para análise das imagens, foram necessários alguns passos, o primeiro foi a seleção da área de interesse. Uma vez que as imagens registradas continham outros elementos que não vasos sanguíneos, que poderiam interferir na análise da imagem, foram selecionados apenas as regiões vascularizadas da imagem. A figura 13 mostra o processo de seleção da área de interesse.

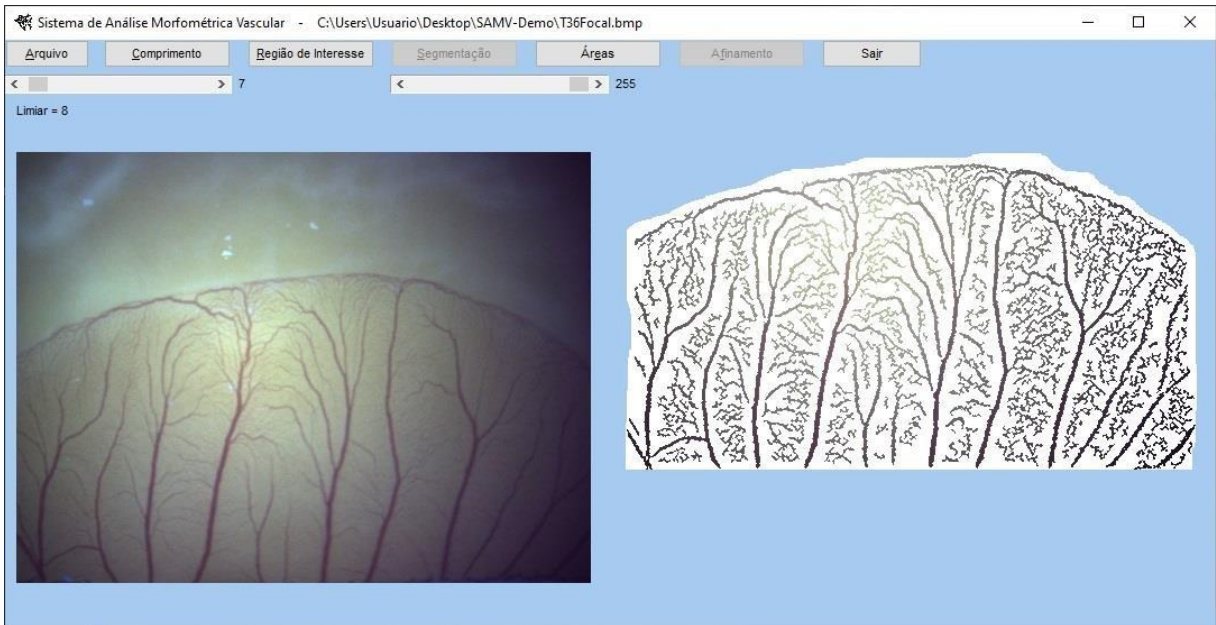
Figura 13: Seleção da área de interesse no SAMV em um embrião avaliado de forma focal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O segundo passo foi a segmentação, uma fase crítica no processamento das imagens, uma vez que é nesse momento que os objetos de interesse são extraídos para posterior análise (Figura 14).

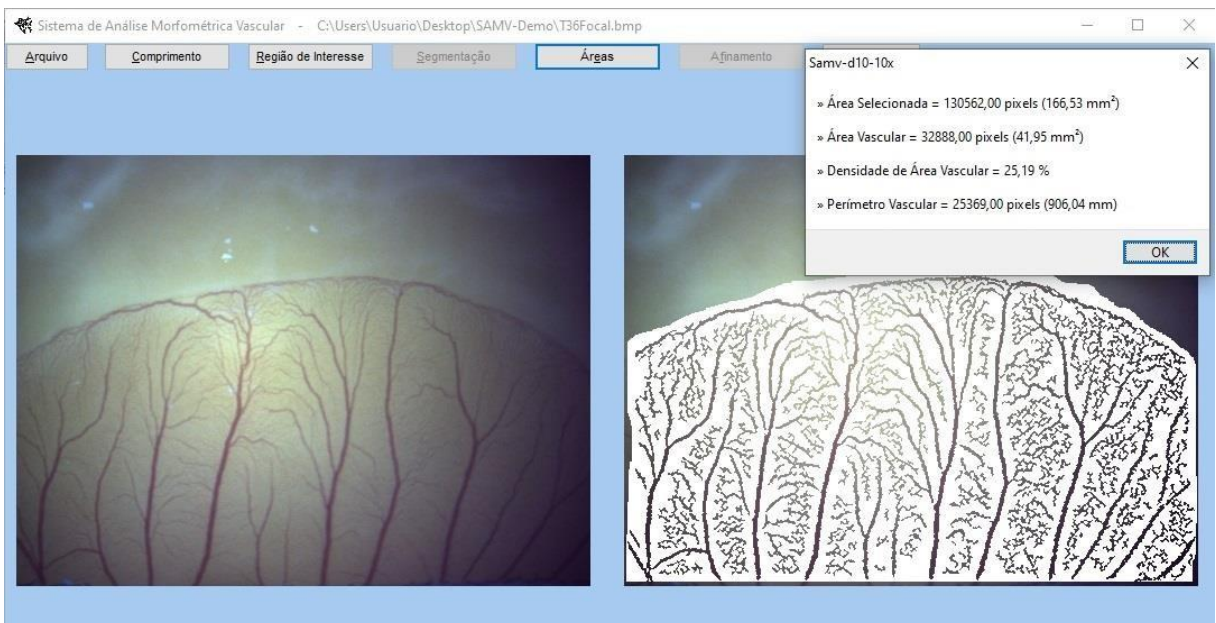
Figura 14: Processo de segmentação no SAMV em um embrião avaliado de forma focal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o processo de segmentação as imagens foram analisadas quanto a área vascular e o perímetro vascular (Figura 15).

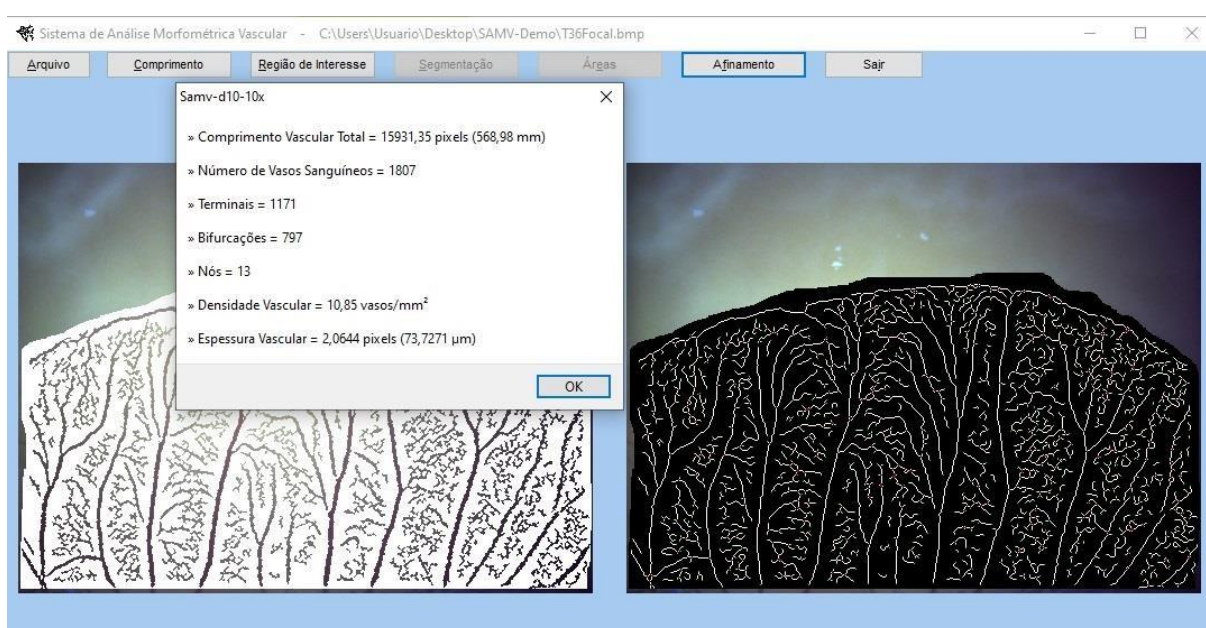
Figura 15: Processo para obtenção da área vascular e do perímetro vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma focal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O próximo passo foi processar as imagens para obtenção dos parâmetros de arquitetura vascular. Para tanto foi utilizado o afinamento, que utiliza um algoritmo de esqueletização, cujo resultado do processo constitui uma representação simplificada da distribuição espacial dos vasos. A partir das imagens afinadas foram obtidos o comprimento vascular total e a espessura vascular (Figura 16).

Figura 16: Processo de afinamento e obtenção do comprimento vascular total e da espessura vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma focal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6.5 Aplicação do método na avaliação do efeito antiangiogênico do bevacizumabe

Para aplicação do método focal na avaliação do efeito antiangiogênico do bevacizumabe, os embriões foram divididos em 2 grupos:

- Grupo Controle: Composto por 20 embriões, receberam 100 µL de solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%.
- Grupo Bevacizumabe: Composto por 27 embriões, receberam 100 µL de bevacizumabe 10^{-4} M, um inibidor da angiogênese diluído em solução de cloreto de sódio 0,9%.

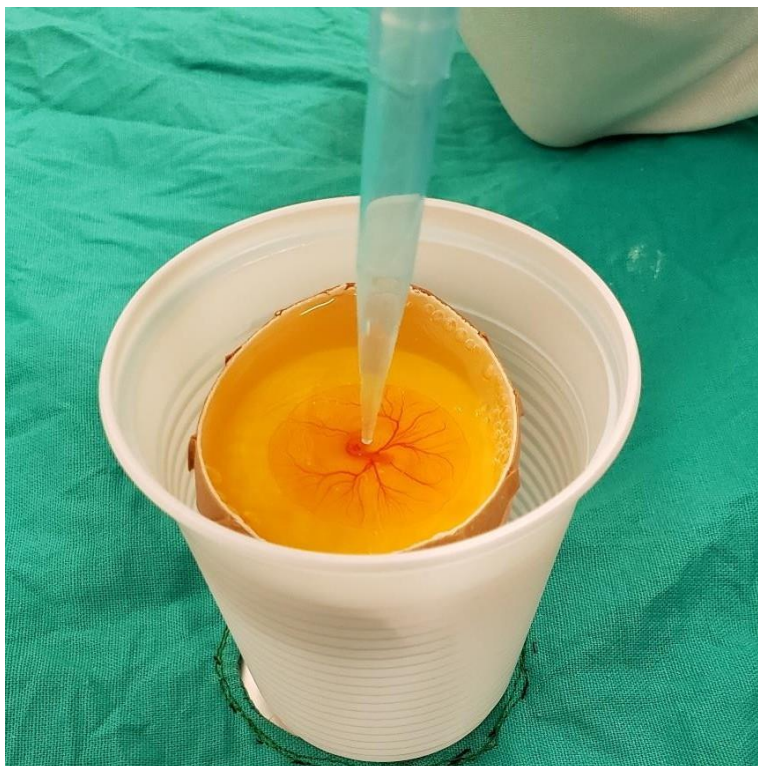
O número de embriões de cada grupo foi proposto com base em outros trabalhos e com base no risco de perdas por contaminação (Yildiz *et al*, 2013).

4.7 Avaliação não focal

4.7.1 Preparo do embrião

Nesse modelo a droga foi inoculada sobre o embrião se espalhando no entorno do mesmo sem a presença de um campo físico delimitando o espaço de inoculação e de acompanhamento, assim o acompanhamento temporal do crescimento dos vasos foi observado em todo o embrião. Nesse modelo, os tratamentos foram diluídos em um veículo de carboximetilcelulose 1% que é um polímero aniônico derivado da celulose, bastante solúvel em água, com o objetivo de aumentar a viscosidade do tratamento e melhorar a aderência ao embrião (Figura 17).

Figura 17: Inoculação da substância sobre o embrião.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.7.2 Aquisição das imagens

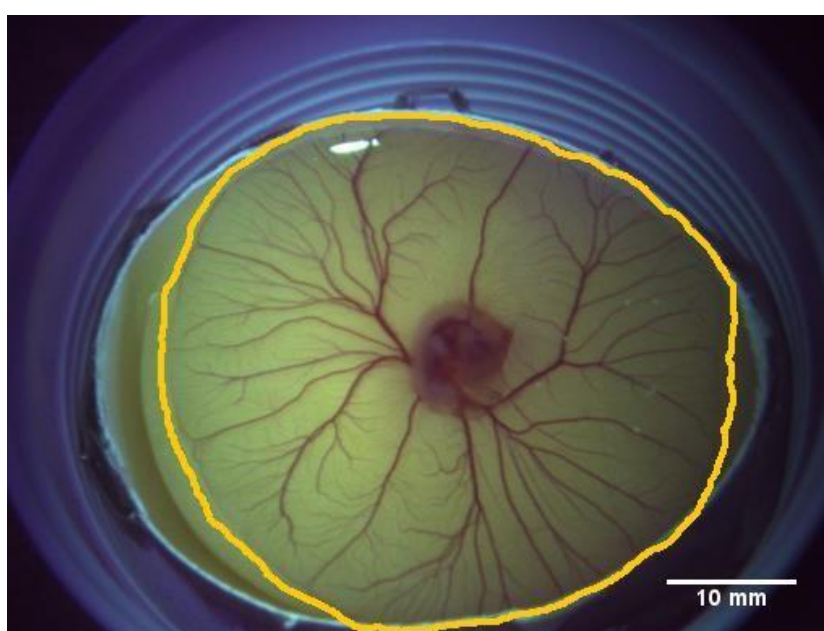
As imagens foram obtidas utilizando um microscópio cirúrgico (Modelo MC-M2222, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo) no aumento de 4X, com o foco ajustado para melhor visualização e iluminação ajustada e padronizada igualmente para todas as fotos e grupos.

4.7.3 Método de quantificação manual da resposta angiogênica

Para realização da quantificação manual no método não focal mais uma vez foi utilizado o *software* imageJ. Também realizou-se a conversão da escala de pixels para milímetros como já descrito anteriormente.

Foram utilizados 2 métodos, no primeiro determinou-se a área demarcada, utilizando o programa citado realizava-se a demarcação no entorno de todo o embrião, deste modo o *software* pôde determinar a área em mm^2 . A figura 18 abaixo mostra o traçado em cor laranja fazendo o contorno da região de interesse do embrião como descrito acima.

Figura 18: Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 4X com área demarcada.

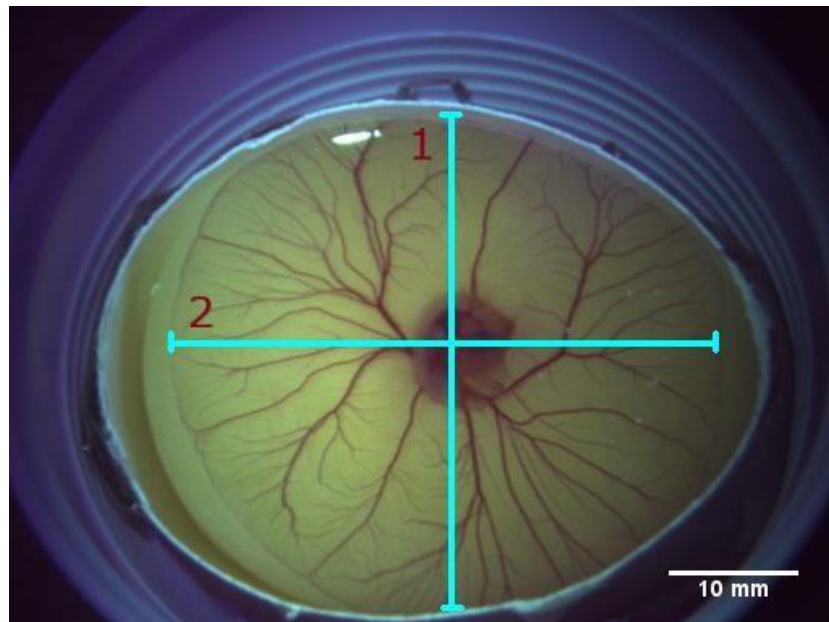


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O segundo método utilizado para quantificação manual foi o cálculo para obtenção da área da elipse. Nesse método são traçadas duas retas, o diâmetro vertical e o diâmetro horizontal e calculado a área da elipse. As medidas para o cálculo estão demonstradas na figura 19.

$$\text{Área da elipse} = \frac{\text{Diâmetro menor}}{2} \times \frac{\text{Diâmetro maior}}{2} \times \pi$$

Figura 19: Embrião no tempo de 36 horas no aumento de 4X demonstrando diâmetro menor (1) e diâmetro maior (2).



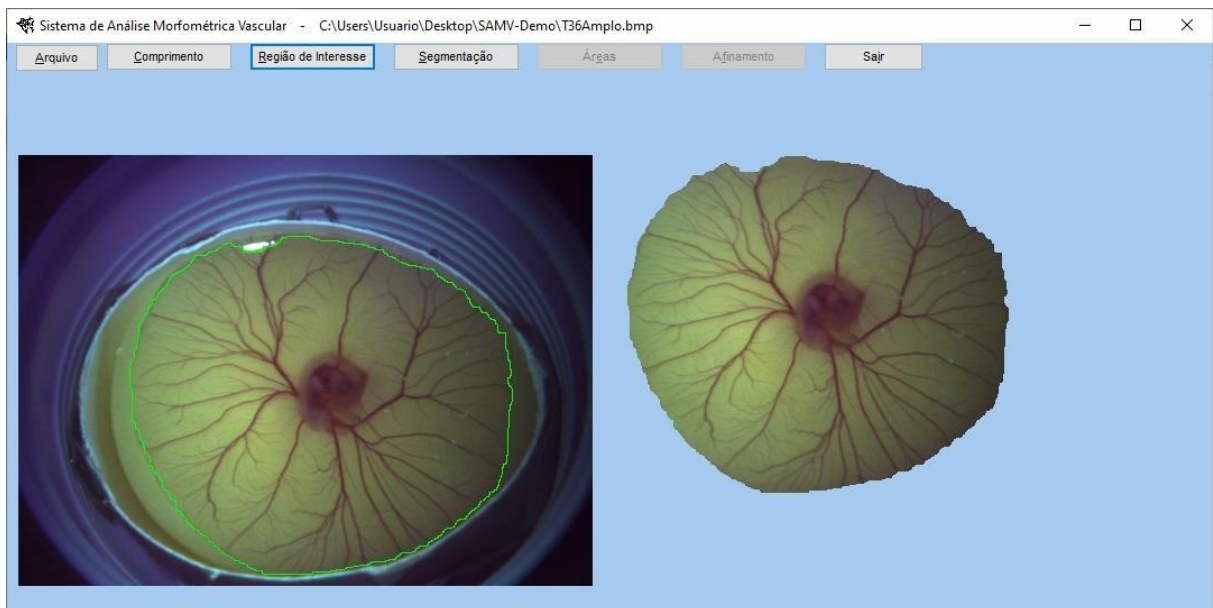
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.7.4 Método de quantificação automática da resposta angiogênica

Para análise automática da resposta angiogênica no método com avaliação não focal, também se utilizou o SAMV, conforme descrito no item 4.6.4, entretanto utilizou-se um fator de escala de 8 pixels/mm e 64 pixels/mm².

A Figura 20 mostra o processo de seleção da área de interesse em um embrião avaliado de forma não focal.

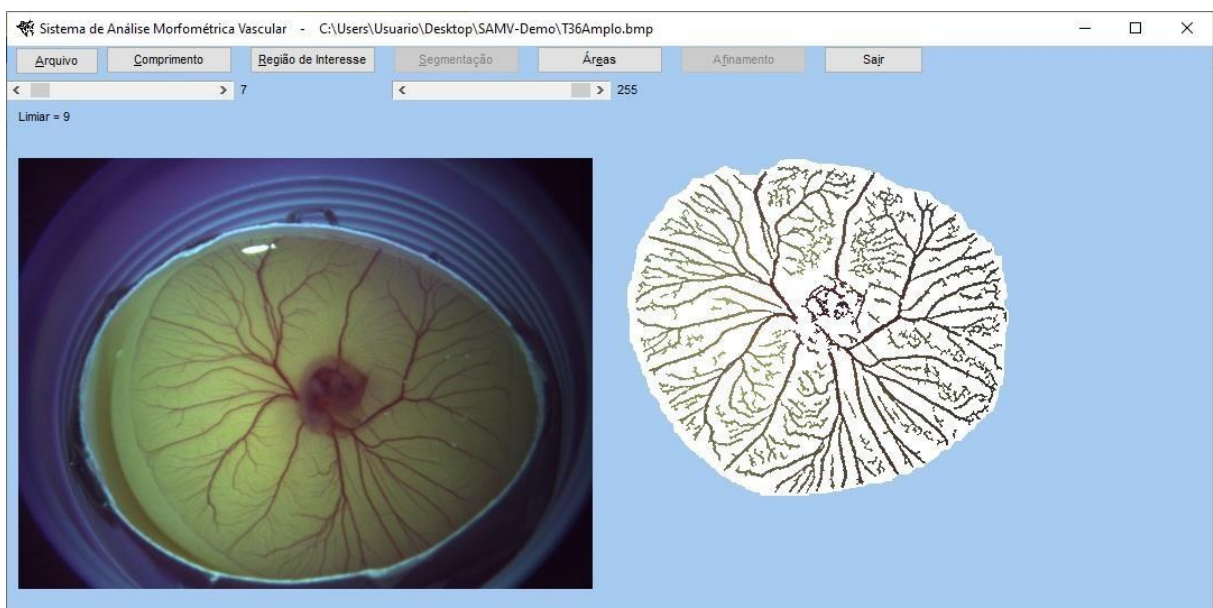
Figura 20: Seleção da área de interesse no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 21 mostra o processo de segmentação em um embrião avaliado de forma não focal.

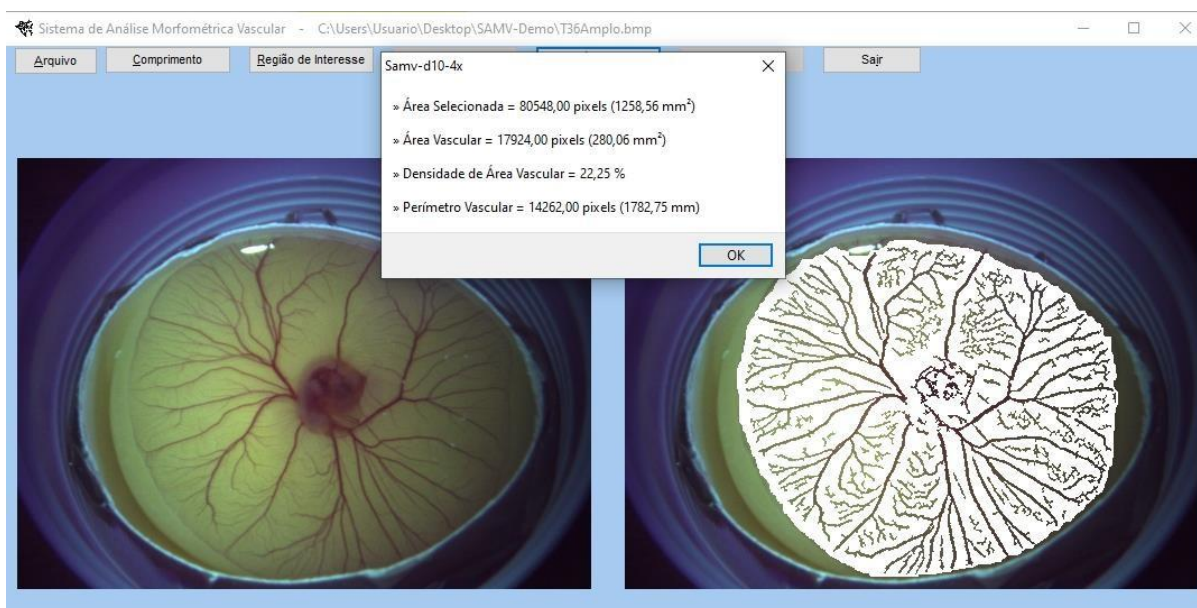
Figura 21: Processo de segmentação no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 22 mostra a obtenção da área e perímetro vascular em um embrião avaliado de forma não focal.

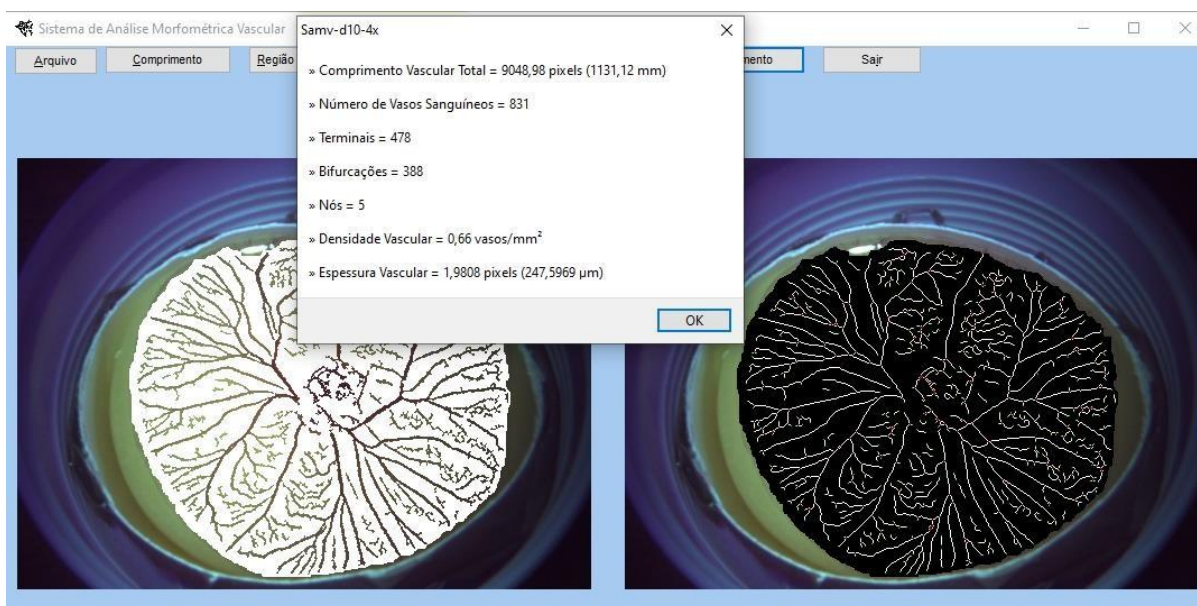
Figura 22: Processo para obtenção da área vascular e do perímetro vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 23 ilustra o processo de afinamento em um embrião avaliado de forma não focal.

Figura 23: Processo de afinamento e obtenção do comprimento vascular total e da espessura vascular no SAMV em um embrião avaliado de forma não focal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7.5 Aplicação do método na avaliação do efeito antiangiogênico do bevacizumabe

Para aplicação do método não na avaliação do efeito antiangiogênico do bevacizumabe, os embriões foram divididos em 2 grupos:

- Grupo Controle: Composto por 20 embriões, receberam 100 µL de solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% em um veículo composto por Carboximetilcelulose 1%.
- Grupo Bevacizumabe: Composto por 23 embriões, receberam 100 µL de bevacizumabe 10^{-4} M em um veículo composto por carboximetilcelulose 1%.

O número de embriões de cada grupo foi proposto com base em outros trabalhos e com base no risco de perdas por contaminação (YILDZ *et al.*, 2013).

4.8 Análise estatística

Os parâmetros manuais e automáticos foram expressos como variação relativa à primeira medida temporal, para tanto, utilizou-se a fórmula a seguir:

$$P_r = P_{tx} - P_{t0}$$

onde P_r é a medida relativa de um determinado parâmetro, P_{tx} é o valor absoluto do parâmetro em um determinado tempo e P_{t0} é o valor absoluto do parâmetro no tempo 0h.

As taxas de crescimento (T_c) foram calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$T_c = \frac{P_{T2} - P_{T1}}{T_2 - T_1}$$

onde T_c é a taxa de crescimento em um dado intervalo de tempo, P_{T2} e P_{T1} são os valores de um determinado parâmetro nos tempos T_2 (tempo final) e T_1 (tempo inicial), respectivamente. Foram calculadas três taxas de crescimento, T_c inicial (0 a 24h), T_c final (24 a 48h) e T_c global (0 a 48h).

Para avaliar de forma global o processo angiogênico ao longo do período de monitoramento (0 a 48 horas), calculou-se a área sob a curva (ASC) das medições temporais da área vascular, mensurada pelo método automático, e das áreas bitrapezoidal e da elipse, ambas medidas pelos métodos manuais, versus o tempo (em horas), utilizando-se, para tanto, o método dos trapézios.

Os parâmetros de quantificação de angiogênese, por se tratarem de variáveis quantitativas, foram inicialmente analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Como tal requisito foi verificado na maioria dos casos, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, bem como foram empregados métodos paramétricos para a estatística analítica. Um modelo de análise de variância para dois fatores de classificação com medidas repetidas foi usado para comparar o efeito dos dois tratamentos (fator 1: Controle e bevacizumabe) nos quantificadores do processo angiogênico ao longo dos tempos avaliados (fator 2: tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas), sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, para comparações entre tratamentos em cada tempo e entre os tempos dentro do mesmo grupo de tratamento. Comparações entre os grupos Bevacizumabe e Controle em relação à taxa de crescimento e à área sob a curva foram feitas por meio do teste t para variáveis não emparelhadas. As taxas de

crescimento inicial e final de um mesmo grupo foram ainda comparadas através do teste t para variáveis não emparelhadas.

O coeficiente de correlação linear de Pearson (r) foi utilizado para quantificar o grau e o sinal da correlação linear entre duas medidas manuais ou entre uma medida manual e uma automática.

Ademais, curvas de sobrevida foram construídas para ambos os grupos de tratamento conforme o método de Kaplan-Meier. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank.

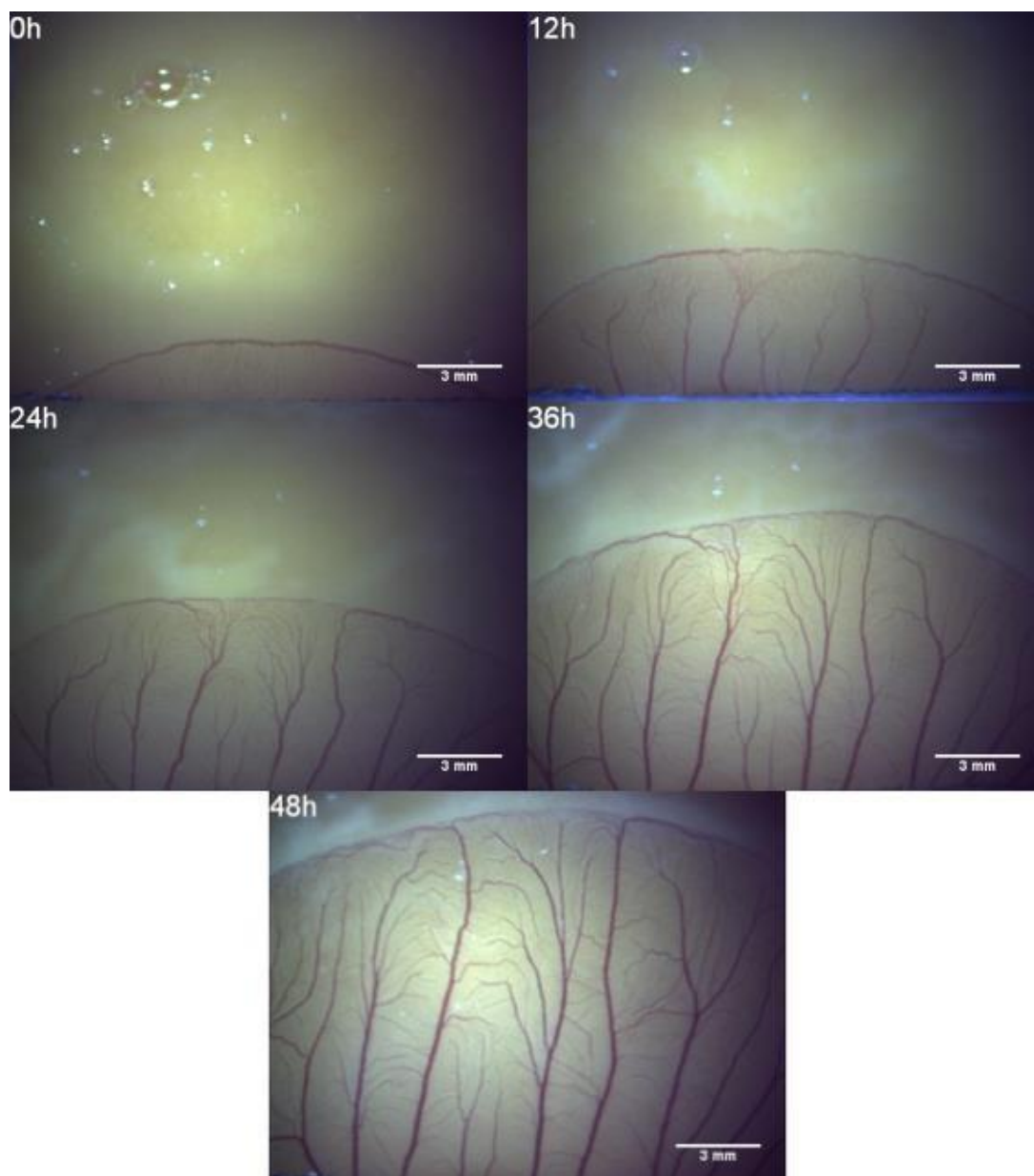
Em todas as análises, empregaram-se testes bicaudais, estabelecendo-se o nível de significância em 0,05 (5%), considerando-se, por conseguinte, como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05. O software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

5 RESULTADOS

5.1 Modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos em membrana de saco vitelino de embrião de galinha com abordagem focal

Observou-se, na abordagem focal do modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos proposto no presente trabalho, um crescimento vascular temporal linear com grande potencial para avaliação de drogas que interferem na angiogênese. A figura 24 mostra registros de um embrião do grupo Controle nos momentos de avaliação de 0 a 48 horas.

Figura 24: Registro temporal de embrião do grupo Controle do modelo com abordagem focal.

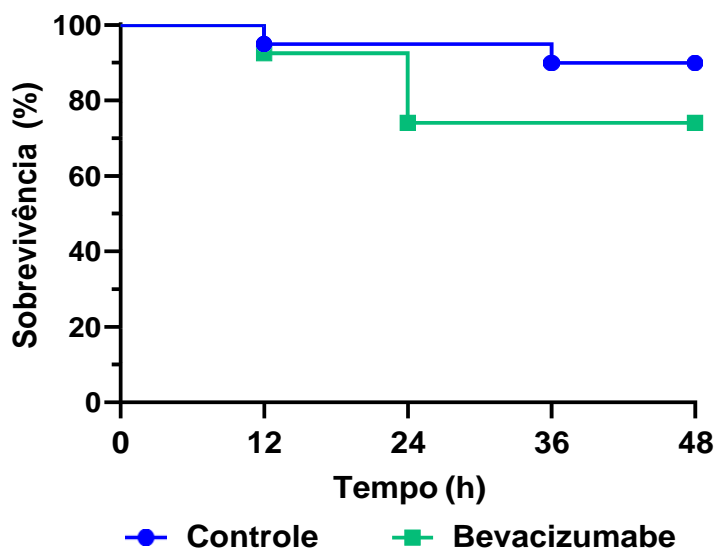


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.1 Mortalidade

Com o objetivo de se analisar a sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos em cada método, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier. Ao final das 48h de avaliação, foi observada uma sobrevivência de 90% dos embriões do grupo Controle, e 74,07% no grupo Bevacizumabe. Não foram observadas diferenças nas curvas de sobrevivência dos dois grupos ($P > 0,05$) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Grupos Controle (n=20) e Bevacizumabe (n=27). Gráfico obtido pelo método de Kaplan-Meier.

A Tabela 1 mostra os valores percentuais de sobrevivência em cada tempo de avaliação em ambos os grupos. Observa-se que os decréscimos do percentual de sobrevivência nos embriões do grupo Controle ocorreram nos tempos 12 e 36h, enquanto no grupo Bevacizumabe ocorreram nos tempos 12 e 24h. Além disso, observa-se uma pequena redução do percentual de sobrevivência nos embriões tratados com o Bevacizumabe, quando comparados ao grupo Controle.

Tabela 1: Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal.

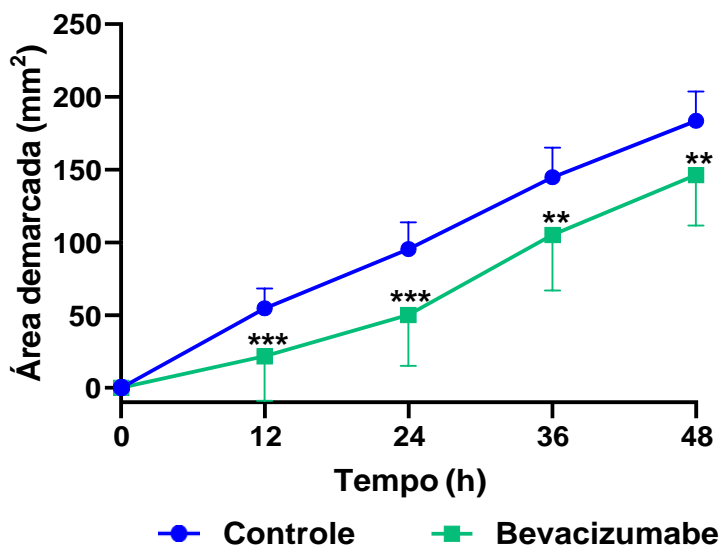
Tempo (h)	Controle (n=20)	Bevacizumabe (n=27)
0	100	100
12	95	92,59
24	95	74,07
36	90	74,07
48	90	74,07

Fonte: Dados da pesquisa

5.1.2 Medidas manuais de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas

Com relação às medidas manuais, foram realizadas 3 medidas, a primeira é a área demarcada, que consiste na medida da área vascularizada do embrião interna ao campo de EVA. No grupo Controle, foi observado um crescimento temporal progressivo em todo o período de avaliação. O grupo Bevacizumabe também apresentou um crescimento temporal, entretanto foi observada uma menor área em todos os tempos de avaliação, quando comparados ao grupo Controle ($P < 0,01$) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Progressão temporal da área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à área demarcada inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). ** demonstra diferença significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,01$); *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A Tabela 2 mostra os valores da área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe em todos os tempos de avaliação, bem como o valor exato de significância no pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 2: Área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal.

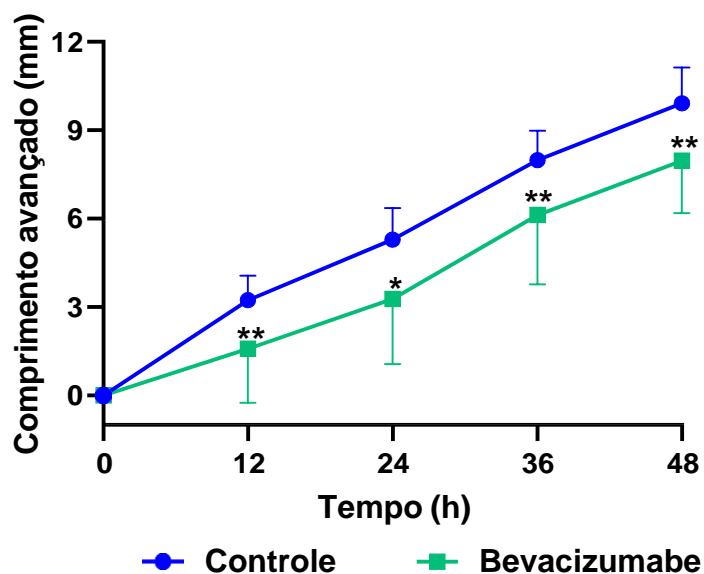
Tempo (h)	Controle (n=18)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP[#]	Média ± DP[#]	
12	54,70 ± 13,65	21,65 ± 30,41	P = 0,0006
24	95,38 ± 18,35	50,10 ± 34,77	P < 0,0001
36	144,86 ± 20,21	105,16 ± 38,17	P = 0,0013
48	183,49 ± 20,36	146,33 ± 34,73	P = 0,0012

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm²) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A segunda medida manual foi o comprimento avançado, que se baseia na medida da distância entre a parede inferior interna do campo de EVA e o ponto vascular mais distante. Foi observada uma progressão temporal no grupo Controle e no grupo Bevacizumabe, entretanto o comprimento avançado foi menor no grupo Bevacizumabe em todos os tempos de avaliação, quando comparados ao grupo Controle (P<0,05) (Gráfico 3).

Gráfico 3: Progressão temporal do comprimento avançado nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa ao comprimento inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). * demonstra diferença significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,05$); ** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,01$).

A Tabela 3 reúne todos os valores de comprimento avançado nos grupos Controle e Bevacizumabe, bem como a significância dos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 3: Comprimento avançado nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal.

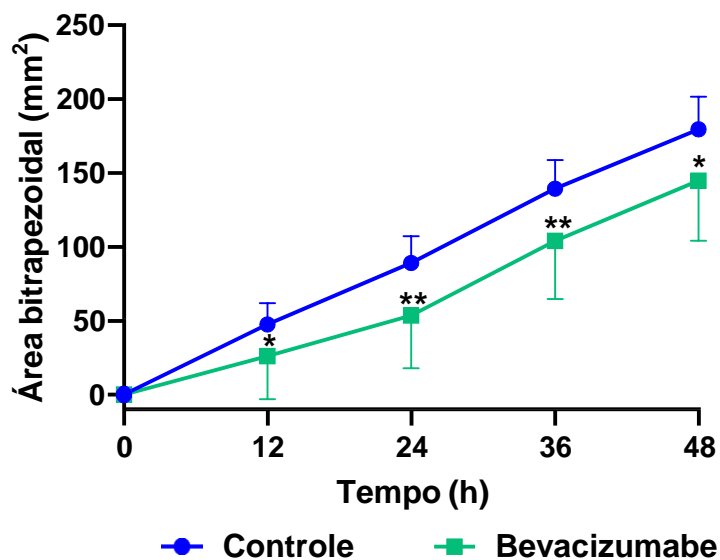
Tempo (h)	Controle (n=18)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP [#]	Média ± DP [#]	
12	3,23 ± 0,83	1,59 ± 1,83	P = 0,0049
24	5,29 ± 1,07	3,27 ± 2,21	P = 0,0044
36	7,99 ± 0,99	6,12 ± 2,34	P = 0,0122
48	9,92 ± 1,21	7,97 ± 1,78	P = 0,0014

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Outra medida manual proposta foi a divisão da área vascularizada em dois trapézios e somar a área de ambos. Assim como as outras medidas manuais, a área vascularizada calculada a partir dos trapézios também apresentou um crescimento temporal progressivo em ambos os grupos, entretanto, o grupo Bevacizumabe apresentou áreas menores em todos os tempos de avaliação, quando comparados ao grupo Controle ($P < 0,05$) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Progressão temporal da área bitrapezoidal nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à área bitrapezoidal inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). * demonstra diferença significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,05$); ** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,01$).

A tabela 4 mostra a progressão temporal da área bitrapezoidal, bem como a significância correspondentes aos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 4: Área bitrapezoidal nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal.

Tempo (h)	Controle (n=18)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP [#]	Média ± DP [#]	
12	47,51 ± 14,34	25,99 ± 29,10	P = 0,0262
24	89,09 ± 18,00	53,68 ± 35,82	P = 0,0021
36	139,35 ± 19,39	104,14 ± 39,52	P = 0,0056
48	179,38 ± 22,25	144,90 ± 40,73	P = 0,0105

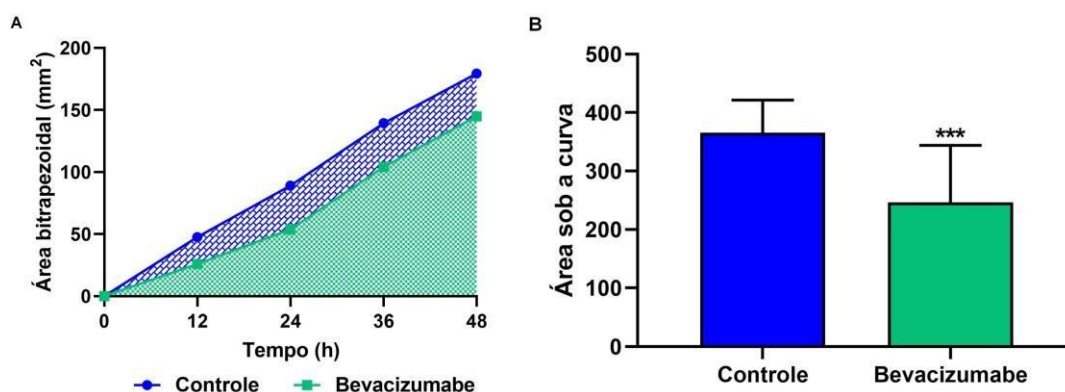
Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm²) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Como forma de avaliação global do crescimento da área vascularizada, foi realizado o cálculo da área sob a curva (ASC) da área bitrapezoidal. A ASC mostra uma visão global do efeito do Bevacizumabe sobre o crescimento vascular, visto que não são feitas comparações tempo a tempo, e sim a comparação da área total sob a curva, considerando todos os pontos.

O Gráfico 5A mostra a representação da área sob a curva nos grupos Controle e Bevacizumabe. O Gráfico 5B mostra os valores da ASC, onde observou-se no grupo Controle uma ASC de 365,6 ± 55,61, enquanto no grupo Bevacizumabe a ASC foi 246,3 ± 97,65. O Bevacizumabe foi capaz de reduzir significativamente a ASC da área bitrapezoidal, quando comparado ao grupo Controle (P<0,001).

Gráfico 5: Avaliação global do crescimento vascular através da ASC da progressão temporal da área bitrapezoidal no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

(A) Representa a área sob a curva nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). Dados expressos como variação relativa à área bitrapezoidal inicial (0h). Dados apresentados como média das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas. (B) Mostra a ASC dos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20) expressos como média \pm desvio padrão. *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,001$).

Como forma de avaliarmos o perfil de crescimento vascular dos grupos Controle e Bevacizumabe, foi calculado, a partir das áreas bitrapezoidais, a taxa de crescimento inicial (entre 0 e 24h), a final (entre 24 e 48h) e a taxa de crescimento global (entre 0 e 48h). A tabela 5 mostra os valores da taxa de crescimento vascular (mm²/h) nos grupos Controle e Bevacizumabe. Inicialmente observou-se que não houve diferença entre as taxas de crescimento inicial e final no grupo Controle, indicando que o crescimento vascular no grupo Controle é linear em todo o período de acompanhamento do estudo.

Ao comparar as taxas de crescimento no grupo Bevacizumabe, observa-se que existe uma alteração no padrão de crescimento no decorrer do tempo. A taxa de crescimento inicial foi significativamente menor que a taxa final ($P < 0,05$).

Tabela 5: Taxas de crescimento da área bitrapezoidal nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.

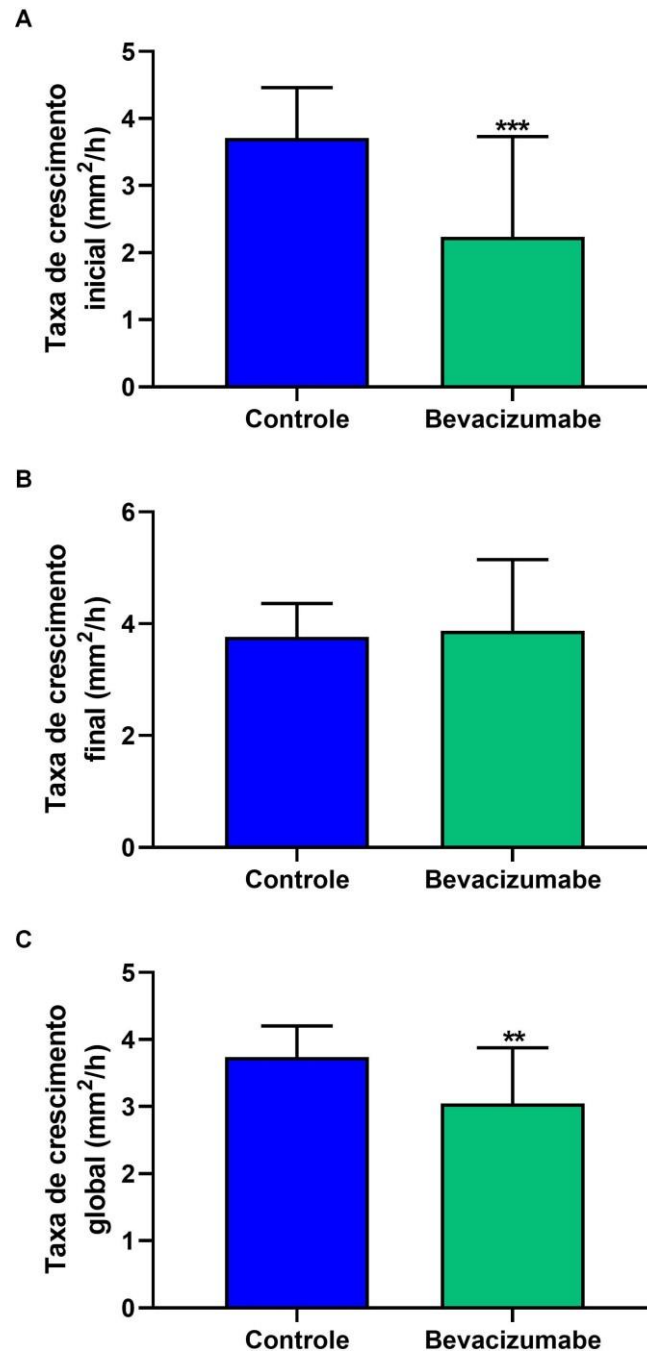
Intervalo de tempo (h)	Controle (n=18) Média ± DP[#]	Bevacizumabe (n=20) Média ± DP[#]	Significância*
0-24	3,71 ± 0,75	2,24 ± 1,49 ^a	P = 0,0005
24-48	3,76 ± 0,60	3,87 ± 1,28	P = 0,723
0-48	3,74 ± 0,46	3,04 ± 0,83	P = 0,0026

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm²/h) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado intervalo de tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. ^a denota diferença estatisticamente significativa quando comparados ao intervalo 24-48h do grupo Bevacizumabe (P<0,05).

O gráfico 6 mostra as três taxas de crescimento nos grupos Controle e Bevacizumabe. Ao se comparar os grupos Controle e Bevacizumabe em cada intervalo de tempo, observou-se uma redução significativa nas taxas de crescimento inicial (Gráfico 6A) e global (Gráfico 6C) do grupo Bevacizumabe, entretanto não houve diferença significativa entre as taxas de crescimento final do grupo Controle e Bevacizumabe (Gráfico 6B).

Gráfico 6: Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área bitrapezoidal dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

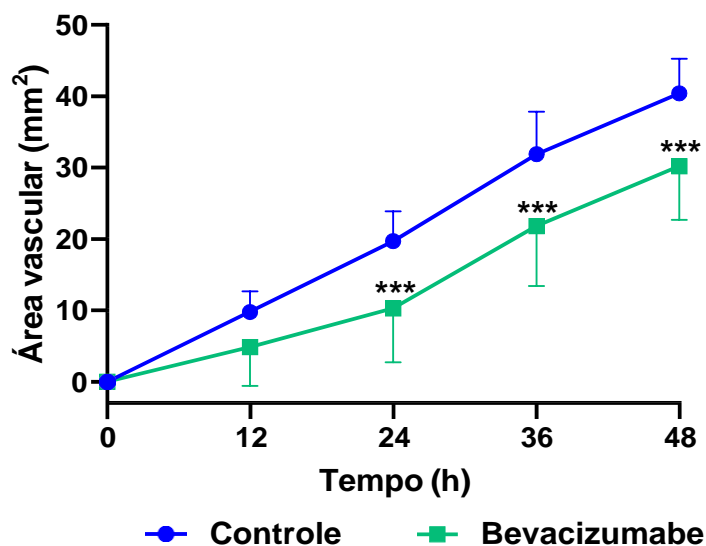
Dados expressos como média \pm desvio padrão. (A) Mostra as taxas de crescimento nas primeiras 24h nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). (B) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 24 e 48h nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). (C) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 0 e 48h nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). ** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,01$). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,001$).

5.1.3 Medidas automáticas de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas.

Para quantificação automática do crescimento vascular, foi utilizado um *software* que fornece diversos parâmetros, contudo foram selecionados 4 parâmetros que melhor caracterizaram o crescimento vascular: a área vascular, o perímetro vascular, o comprimento vascular total e a espessura vascular.

Com relação a área vascular, os dois grupos apresentaram um crescimento temporal ao longo de todo o período e avaliação, entretanto observou-se uma menor área vascular no grupo Bevacizumabe nos tempos 24, 36 e 48h, quando comparados ao grupo Controle ($P<0,001$) (Gráfico 7).

Gráfico 7: Progressão temporal da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à área vascular inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P<0,001$).

A tabela 6 reúne todos os valores de área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, bem como a significância dos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 6: Área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal.

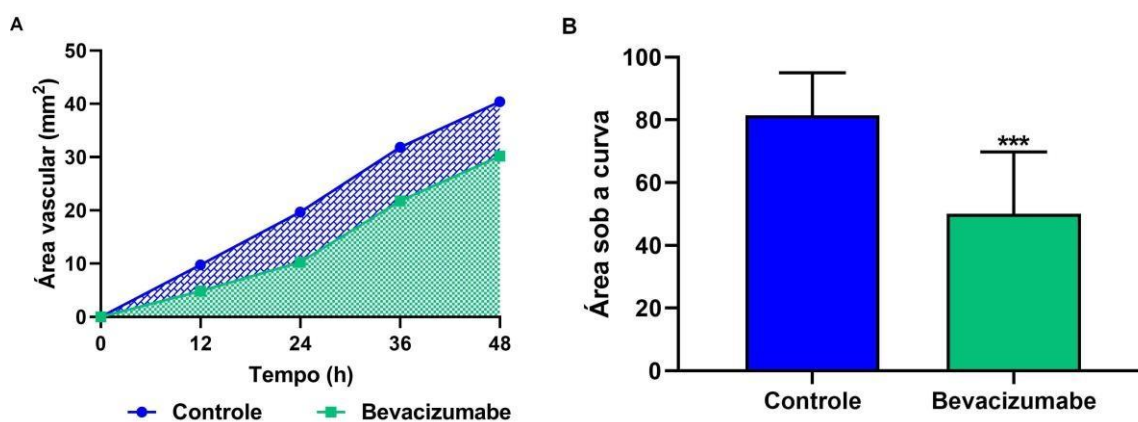
Tempo (h)	Controle (n=18)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP[#]	Média ± DP[#]	
12	9,76 ± 2,92	4,84 ± 5,42	P = 0,0627
24	19,70 ± 4,19	10,29 ± 7,57	P < 0,0001
36	31,86 ± 5,96	21,78 ± 8,38	P < 0,0001
48	40,38 ± 4,89	30,18 ± 7,52	P < 0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm²) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Também foi realizada a análise da ASC da progressão temporal da área vascular. O gráfico 8A mostra a representação da ASC nos grupos Controle e Bevacizumabe. Observou-se uma redução significativa da ASC no grupo Bevacizumabe (50,07 ± 19,69), quando comparado ao grupo Controle (81,50 ± 13,54) (P<0,001) (Gráfico 8B).

Gráfico 8: Avaliação global do crescimento vascular a partir da área sob a curva da progressão temporal da área vascular no modelo com abordagem focal.

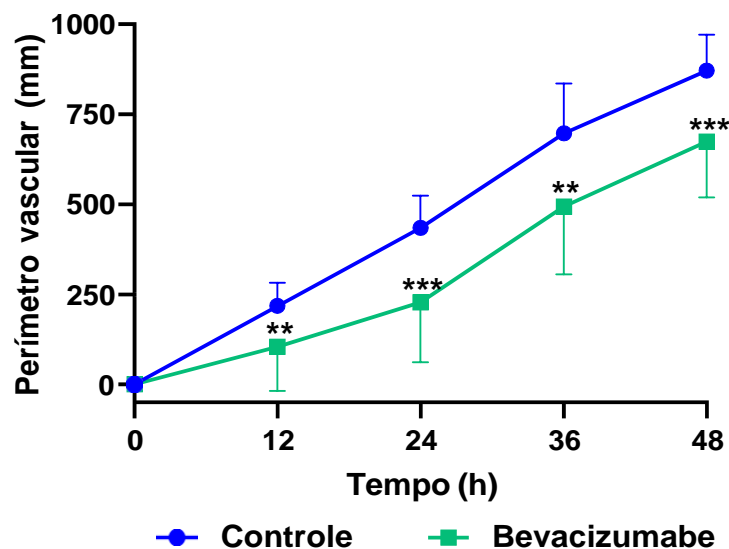


Fonte: Dados da pesquisa.

(A) Representa a área sob a curva nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). Dados expressos como variação relativa à área vascular inicial (0h). Dados apresentados como média das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas. (B) Mostra a ASC dos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20) expressos como média \pm desvio padrão. *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,001$).

Com relação ao perímetro vascular, também foi observado um crescimento temporal nos grupos Controle e Bevacizumabe, entretanto o grupo Bevacizumabe apresentou o perímetro vascular menor que o grupo Controle nos tempos 12, 24, 36 e 48h ($P < 0,01$) (Gráfico 9).

Gráfico 9: Progressão temporal do perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa ao perímetro vascular inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). ** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,01$); *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A tabela 7 mostra a progressão temporal do perímetro vascular, bem como a significância correspondente aos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 7: Perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal.

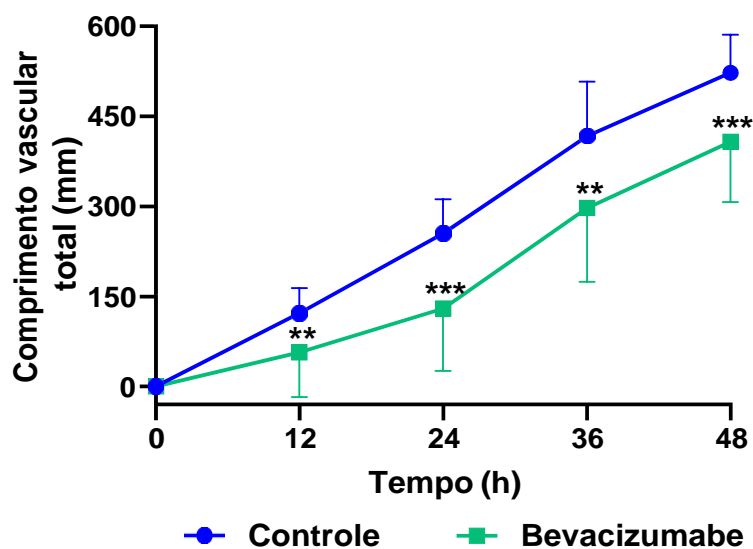
Tempo (h)	Controle (n=18) Média ± DP[#]	Bevacizumabe (n=20) Média ± DP[#]	Significância*
12	218,58 ± 63,42	104,11 ± 122,24	P = 0,0038
24	434,07 ± 89,12	227,50 ± 165,66	P = 0,0001
36	696,87 ± 138,34	494,21 ± 188,34	P = 0,0022
48	871,06 ± 100,02	674,25 ± 155,29	P = 0,0002

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O gráfico 10 mostra a progressão temporal do comprimento vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, onde observou-se um crescimento temporal similar aos outros parâmetros automáticos. O grupo Bevacizumabe apresentou comprimento vascular médio nos tempos 12, 24, 36 e 48h significativamente menor que o grupo Controle ($P < 0,01$).

Gráfico 10: Progressão temporal do comprimento vascular total nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa ao comprimento vascular total inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). ** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,01$); *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A tabela 8 mostra os valores do comprimento vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, bem como a significância correspondente aos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 8: Comprimento vascular total nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal.

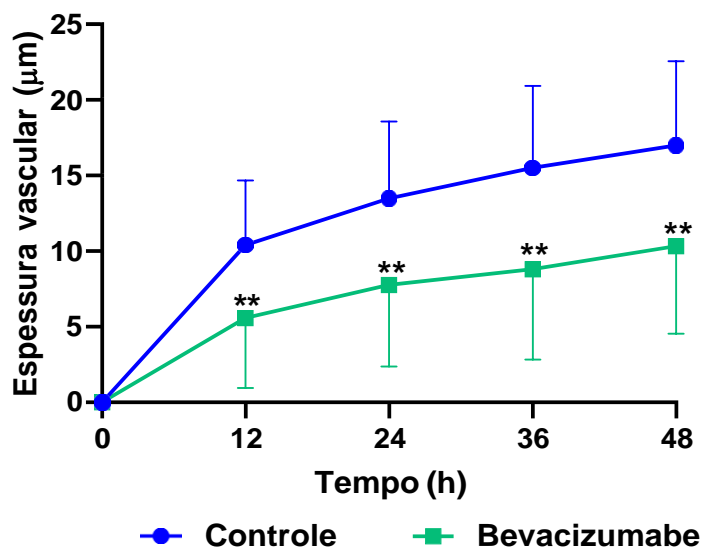
Tempo (h)	Controle (n=18)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP[#]	Média ± DP[#]	
12	121,81 ± 41,99	57,07 ± 74,83	P = 0,0091
24	254,89 ± 57,17	129,69 ± 103,72	P = 0,0002
36	416,83 ± 91,00	297,24 ± 122,65	P = 0,0062
48	522,63 ± 63,56	407,33 ± 100,20	P = 0,0006

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Com relação à espessura vascular, observou-se um padrão de crescimento diferente dos outros parâmetros. Nas primeiras 12h observa-se um crescimento mais pronunciado, enquanto nas horas seguintes observa-se um crescimento temporal menos pronunciado, crescimento esse que se seguiu até o final do acompanhamento. O Bevacizumabe foi capaz de reduzir significativamente a espessura vascular nos tempos 12, 24, 36 e 48h ($P < 0,01$) (Gráfico 11)

Gráfico 11: Progressão temporal da espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à espessura vascular inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). ** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,01$).

A tabela 9 reporta os valores relativos à progressão temporal da espessura vascular, bem como a significância correspondente aos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 9: Espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem focal.

Tempo (h)	Controle (n=18)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP	Média ± DP	
12	10,41 ± 4,27	5,58 ± 4,64	P = 0,0078
24	13,48 ± 5,09	7,76 ± 5,39	P = 0,0073
36	15,51 ± 5,43	8,80 ± 5,97	P = 0,0035
48	16,99 ± 5,56	10,32 ± 5,79	P = 0,0036

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para avaliação do perfil de crescimento vascular nos parâmetros automáticos, optou-se por fazer a taxa de crescimento da área vascular, pois é o parâmetro que melhor representa os vasos como um todo. A tabela 10 mostra os valores da taxa de crescimento vascular (mm^2/h) nos grupos Controle e Bevacizumabe.

O perfil de crescimento da área vascular foi similar ao perfil de crescimento da área bitrapezoidal, onde observou-se, no grupo Controle, um crescimento linear, sem diferenças significativas entre as taxas inicial e final. Entretanto o Bevacizumabe foi capaz de alterar esse perfil de crescimento, onde a taxa de crescimento inicial foi menor que a taxa final ($P < 0,05$), indicando um crescimento não linear (Tabela 10).

Tabela 10: Taxas de crescimento da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal.

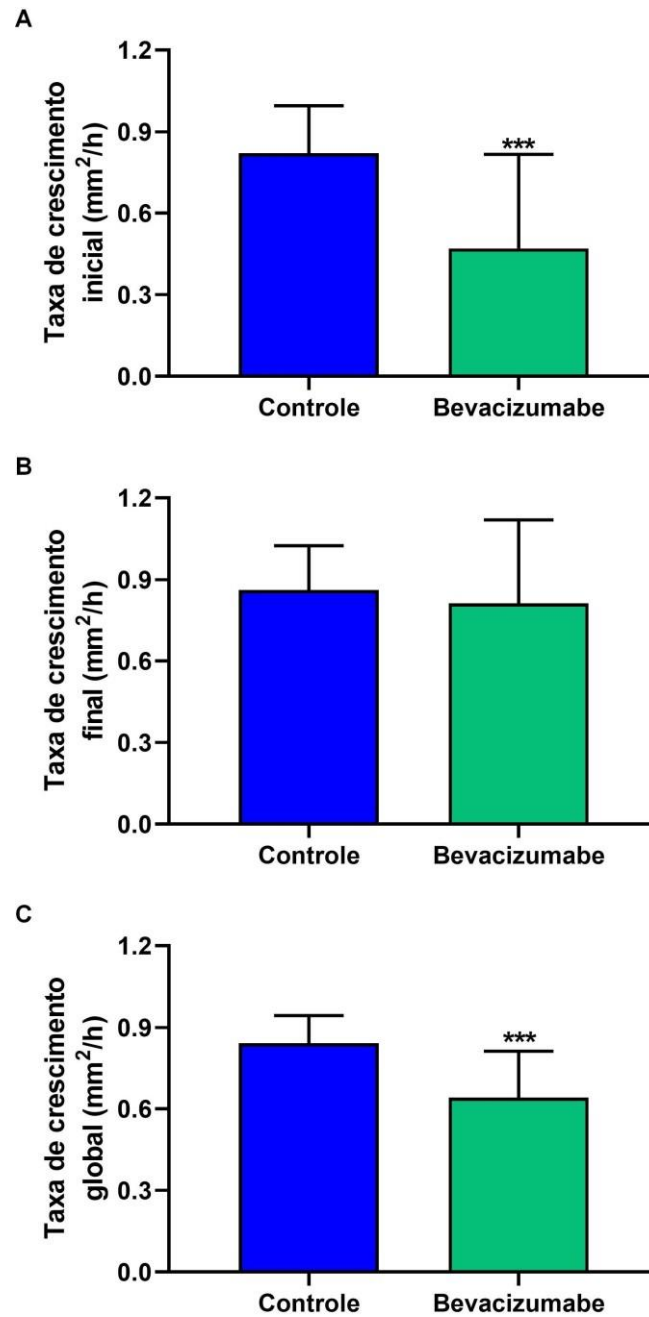
Intervalo de tempo (h)	Controle (n=18) Média ± DP[#]	Bevacizumabe (n=20) Média ± DP[#]	Significância*
0-24	0,82 ± 0,17	0,46 ± 0,34 ^a	P = 0,0002
24-48	0,86 ± 0,16	0,83 ± 0,31	P = 0,6499
0-48	0,84 ± 0,10	0,64 ± 0,17	P < 0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm²/h) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado intervalo de tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. ^a denota diferença estatisticamente significativa quando comparados ao intervalo 24-48h do grupo Bevacizumabe (P<0,05).

O gráfico 12 mostra as taxas de crescimento inicial, final e global dos grupos Controle e Bevacizumabe. Ao se comparar os grupos Controle e Bevacizumabe em cada intervalo de tempo, observou-se uma redução significativa induzida pelo Bevacizumabe nas taxas de crescimento inicial e global, entretanto ele não alterou a taxa de crescimento final, quando comparados ao grupo controle (P<0,001).

Gráfico 12: Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área vascular dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem focal.



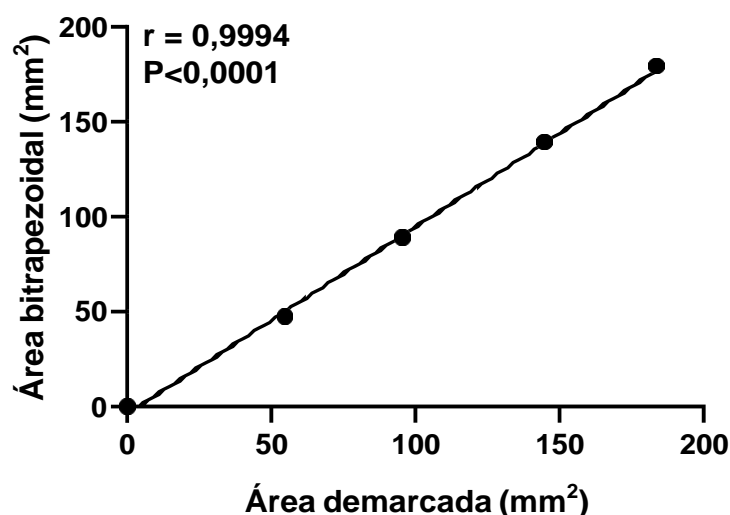
Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como média \pm desvio padrão. (A) Mostra as taxas de crescimento nas primeiras 24h nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). (B) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 24 e 48h nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). (C) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 0 e 48h nos grupos Controle (n=18) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,001$).

5.1.4 Correlação entre medidas manuais e automáticas de quantificação do crescimento vascular

Inicialmente foi verificada a correlação entre as duas medidas manuais (área bitrapezoidal e área demarcada). Observou-se uma correlação positiva excelente entre as duas medidas pela correlação de Pearson ($r=0,9994$; $P<0,0001$) (Gráfico 13).

Gráfico 13: Gráfico de dispersão entre as medidas manuais área bitrapezoidal e área demarcada.

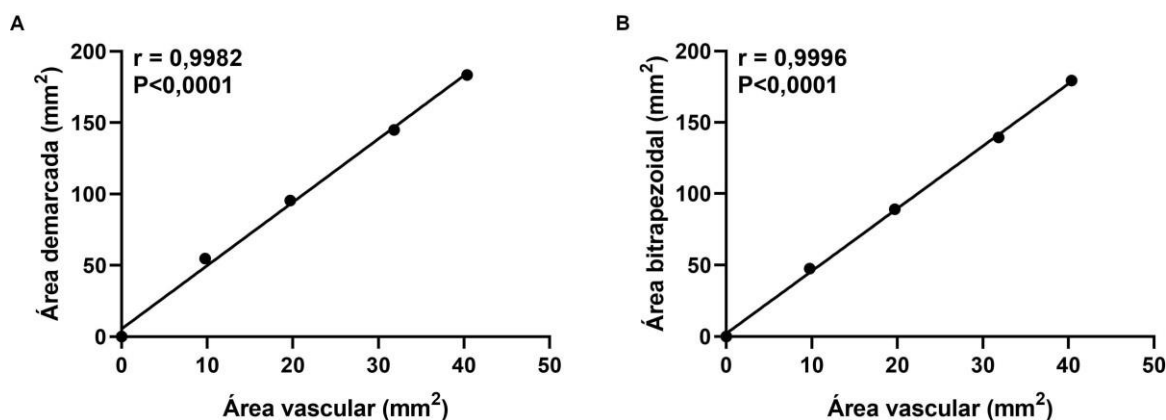


Fonte: Dados da pesquisa.

Os pontos representam a média das medidas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48h do grupo Controle, e a reta representa a regressão linear resultante dos pontos.

Também foi verificado a correlação entre as duas medidas manuais (área bitrapezoidal e área demarcada) e uma medida automática (área vascular), como forma de verificar se as medidas manuais propostas representam a área vascular. Foi observada uma correlação positiva excelente nas duas comparações (Gráfico 14).

Gráfico 14: Gráfico de dispersão entre a medida automática área vascular e as medidas manuais área demarcada (A) e área bitrapezoidal (B).



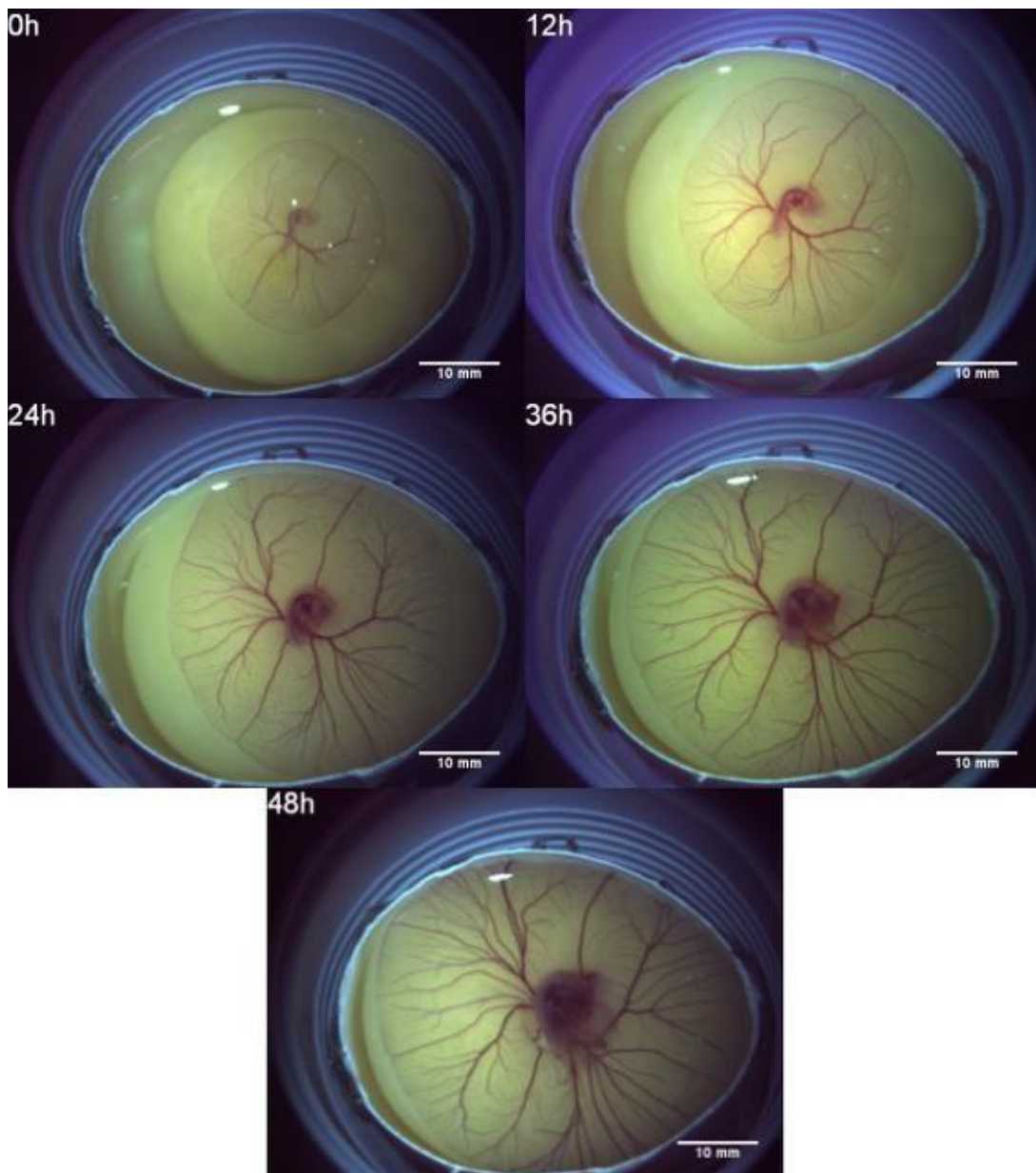
Fonte: Dados da pesquisa.

Os pontos representam a média das medidas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48h do grupo Controle, e a reta representa a regressão linear resultante dos pontos.

5.2 Modelo para prospecção de fármacos antiangiogênicos em membrana de saco vitelino de embrião de galinha com abordagem não focal

A abordagem não focal do modelo proposto no presente trabalho, consistiu em uma abordagem com inoculação da droga e avaliação no embrião todo, e não só em uma área delimitada. Observou-se um padrão de crescimento vascular um pouco diferente da abordagem focal, entretanto também foi possível verificar um crescimento vascular temporal em todo o período de avaliação, mostrando grande potencial para avaliação de drogas que interferem na angiogênese. A figura 25 mostra registros de um embrião do grupo Controle nos momentos de avaliação de 0 a 48 horas.

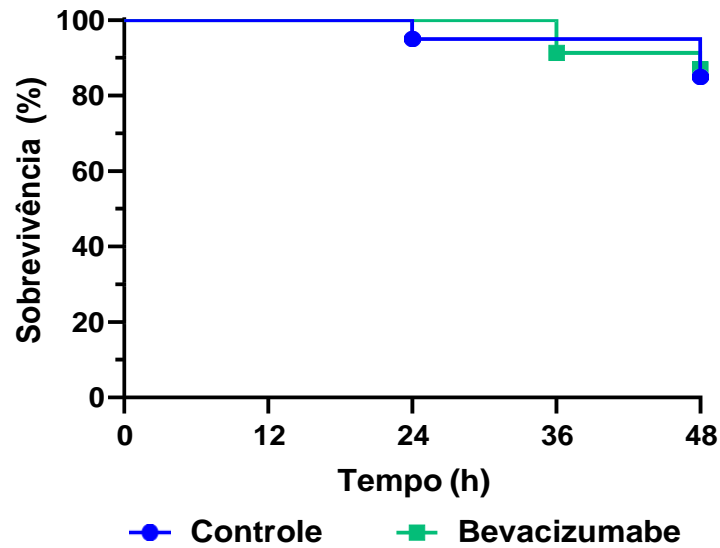
Figura 25: Registro temporal de um embrião do grupo Controle do modelo com abordagem não focal.



5.2.1 Mortalidade

Com relação a mortalidade, observou-se, ao final das 48h de avaliação, uma sobrevivência de 85% no grupo Controle e de 86,96% no grupo Bevacizumabe. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevivência dos dois grupos ($P > 0,05$) (Gráfico 15).

Gráfico 15: Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Grupos Controle (n=20) e Bevacizumabe (n=23). Gráfico obtido pelo método de Kaplan-Meier.

A tabela 11 mostra os valores percentuais de sobrevivência em cada tempo de avaliação em ambos os grupos. Pode-se observar que as mortes nos grupos Controle ocorreram nos tempos 24 e 48h, enquanto no grupo Bevacizumabe foram nos tempos 36 e 48h. O percentual final de sobrevivência foi muito similar em ambos os grupos.

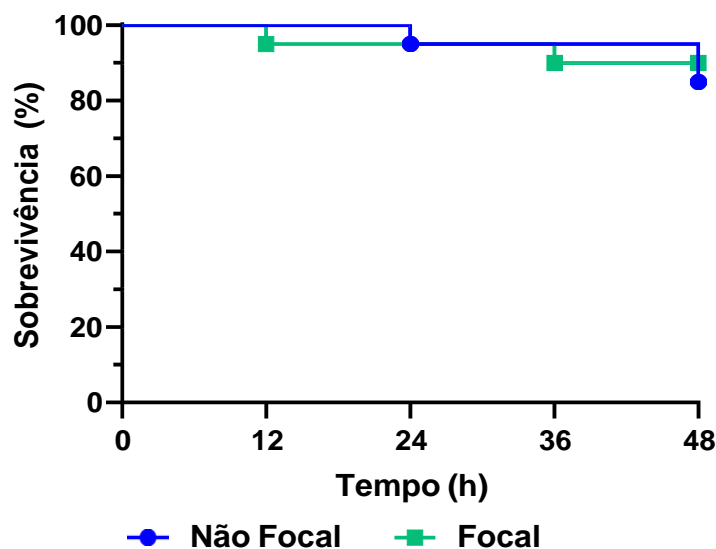
Tabela 11: Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem não focal.

Tempo (h)	Controle (n=20)	Bevacizumabe (n=23)
0	100	100
12	100	100
24	95	100
36	95	91,30
48	85	86,96

Fonte: Dados da pesquisa.

Além disso, com objetivo de verificar se alguma das abordagens apresentou mortalidade maior, comparou-se a curva de sobrevivência dos grupos Controle do método focal com o do método não focal. Não foram observadas diferenças entre as curvas ($P > 0,05$) (Gráfico 16).

Gráfico 16: Percentual de sobrevivência dos embriões após abertura dos ovos nos grupos Controle pelo método focal e não focal.



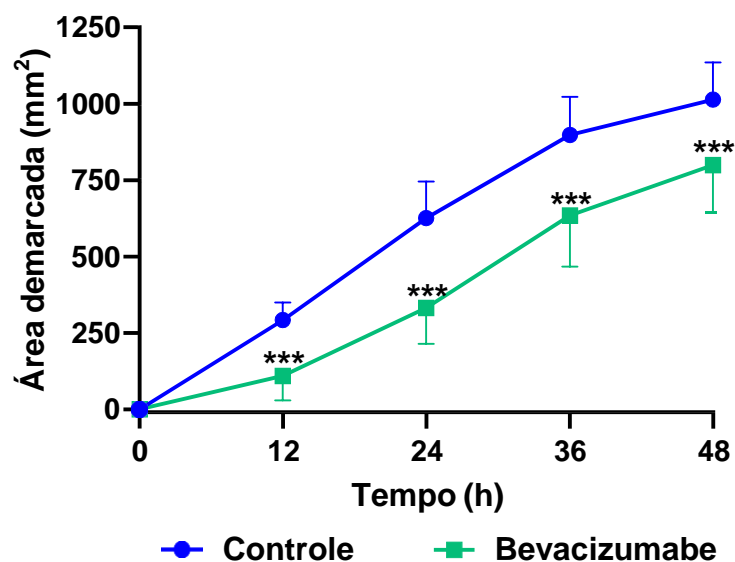
Fonte: Dados da pesquisa.

Grupos Focal (n=20) e Não focal (n=20). Gráfico obtido pelo método de Kaplan-Meier.

5.2.2 Medidas manuais de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas

No modelo com abordagem não focal, foram realizadas apenas duas medidas manuais: área demarcada e área da elipse. O grupo Controle apresentou um crescimento temporal com um perfil menos linear que a abordagem focal, sendo possível observar inicialmente um padrão linear com posterior suavização do crescimento, com redução da inclinação da curva de crescimento. O grupo Bevacizumabe apresentou um padrão menos linear, onde é possível observar uma curva com padrão sigmoide. Além disso, o grupo Bevacizumabe apresentou uma menor área demarcada, quando comparado ao grupo Controle, nos tempos 12, 24, 36 e 48h ($P < 0,001$) (Gráfico 17).

Gráfico 17: Progressão temporal da área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à área demarcada inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A tabela 12 mostra os valores da área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, bem como a significância referente aos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 12: Área demarcada nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal.

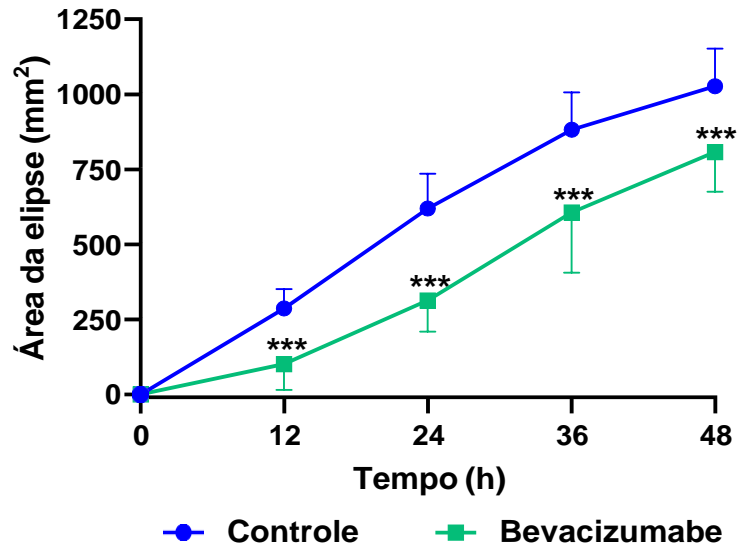
Tempo (h)	Controle (n=17) Média ± DP[#]	Bevacizumabe (n=20) Média ± DP[#]	Significância*
12	292,16 ± 57,28	109,10 ± 79,52	P < 0,0001
24	625,85 ± 119,70	332,19 ± 117,66	P < 0,0001
36	898,23 ± 124,87	634,11 ± 167,20	P < 0,0001
48	1013,05 ± 121,86	798,75 ± 156,15	P = 0,0002

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm²) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Com relação a área da elipse, observou-se um padrão de crescimento similar à área demarcada dos grupos Controle e Bevacizumabe. Foi observada uma redução na área da elipse do grupo Bevacizumabe, em comparação com o grupo Controle, nos tempos 12, 24, 36 e 48h (P<0,001) (Gráfico 18).

Gráfico 18: Progressão temporal da área da elipse nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à área da elipse inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A tabela 13 mostra os resultados da área da elipse nos grupos Controle e Bevacizumabe.

Tabela 13: Área da elipse nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal.

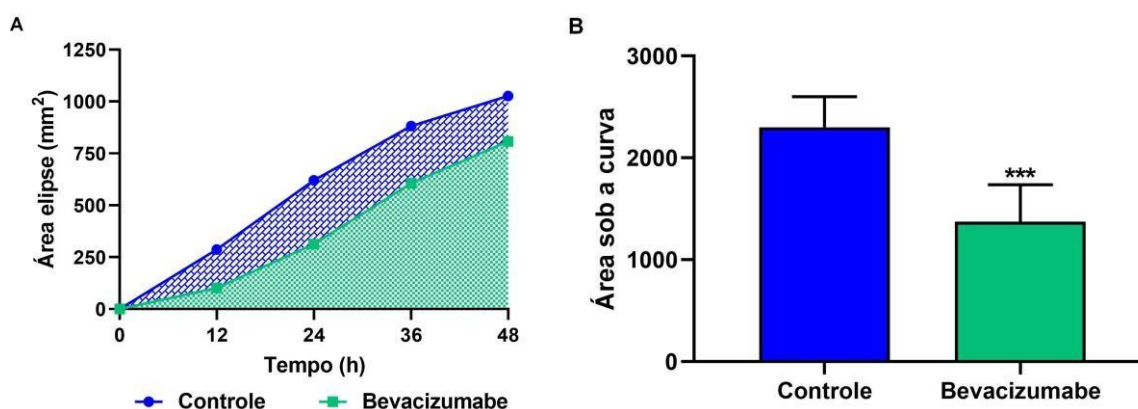
Tempo (h)	Controle (n=17)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP[#]	Média ± DP[#]	
12	287,01 ± 63,32	101,14 ± 86,50	P < 0,0001
24	619,81 ± 114,82	313,08 ± 104,66	P < 0,0001
36	882,14 ± 123,88	605,61 ± 199,88	P < 0,0001
48	1026,71 ± 125,21	807,31 ± 132,45	P < 0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm²) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O Bevacizumabe também foi capaz de reduzir a ASC da progressão temporal da elipse. O gráfico 19A mostra a representação da área sob a curva nos grupos Controle e Bevacizumabe. O Gráfico 19B mostra a comparação entre ASC entre os grupos Controle (2302±300,2) e Bevacizumabe (1373±362,3), sendo o segundo significativamente menor que o grupo Controle (P<0,001).

Gráfico 19: Avaliação global do crescimento vascular através da ASC da progressão temporal da área da elipse no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

(A) Representa a área sob a curva nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). Dados expressos como variação relativa à área da elipse inicial (0h). Dados apresentados como média das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas. (B) Mostra a ASC dos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20) expressos como média \pm desvio padrão. *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,001$).

Ao se avaliar a taxa de crescimento da área da elipse do grupo Controle, observou-se um padrão com dois momentos diferentes, onde a taxa de crescimento inicial foi significativamente maior que a taxa de crescimento final ($P < 0,01$), indicando a presença de um padrão não linear de crescimento. O Bevacizumabe foi capaz de inverter esse padrão de crescimento, ou seja, a taxa de crescimento inicial foi significativamente menor que a taxa de crescimento final ($P < 0,01$) (Tabela 14).

Tabela 14: Taxas de crescimento da área da elipse nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.

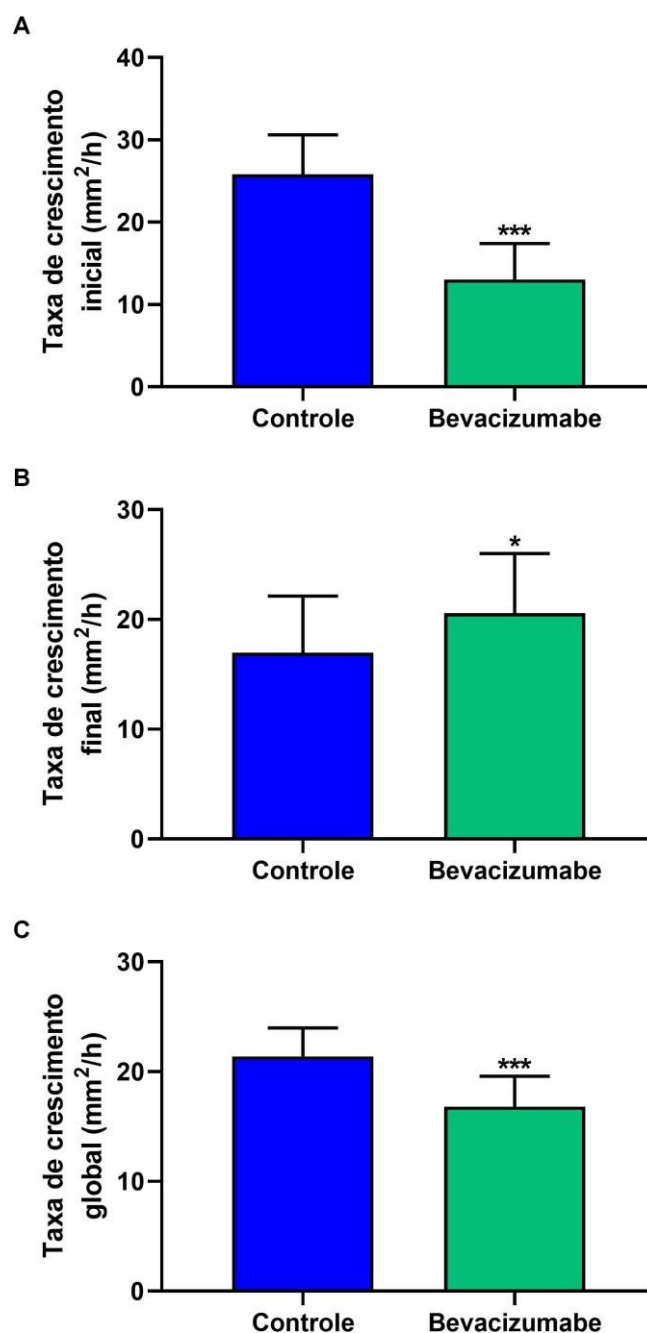
Intervalo de tempo (h)	Controle (n=17) Média ± DP	Bevacizumabe (n=20) Média ± DP	Significância*
0-24	25,83 ± 4,78 ^a	13,05 ± 4,36 ^b	P < 0,0001
24-48	16,95 ± 5,19	20,59 ± 5,43	P = 0,045
0-48	21,39 ± 2,61	16,82 ± 2,76	P < 0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm²/h) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado intervalo de tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. ^a denota diferença estatisticamente significativa quando comparados ao intervalo 24-48h do grupo Controle (P<0,01). ^b denota diferença estatisticamente significativa quando comparados ao intervalo 24-48h do grupo Bevacizumabe (P<0,01).

O gráfico 20 mostra as taxas de crescimento inicial, final e global da área da elipse dos grupos Controle e Bevacizumabe. Foram realizadas comparações entre os dois grupos em cada intervalo de tempo. Observou-se uma redução das taxas de crescimento inicial e global do grupo Bevacizumabe (P<0,001), entretanto a taxa de crescimento final do grupo Bevacizumabe foi significativamente maior que a taxa de crescimento final do grupo Controle (P<0,05).

Gráfico 20: Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área da elipse dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

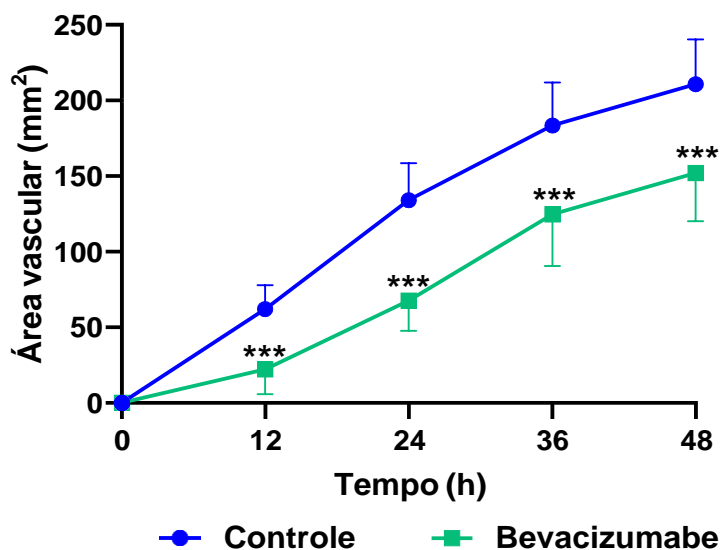
Dados expressos como média \pm desvio padrão. (A) Mostra as taxas de crescimento nas primeiras 24h nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). (B) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 24 e 48h nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). (C) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 0 e 48h nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). * denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,05$). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,001$).

5.2.3 Medidas automáticas de quantificação do crescimento vascular para avaliação de drogas antiangiogênicas

Como forma de método automático para quantificação do crescimento vascular no método não focal, também foram utilizados os mesmos 4 parâmetros do método com abordagem focal, quais são, área vascular, perímetro vascular, comprimento vascular total e espessura vascular.

Com relação a área vascular, foi observado um padrão semelhante às medidas manuais, onde pode-se observar uma fase linear com posterior redução da inclinação da curva. O Bevacizumabe foi capaz de reduzir a área vascular nos tempos 12, 24, 36 e 48h quando comparados com os mesmos tempos do grupo Controle ($P < 0,001$) (Gráfico 21).

Gráfico 21: Progressão temporal da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à área vascular inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A Tabela 15 mostra os dados da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, bem como a significância correspondente aos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 15: Área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal.

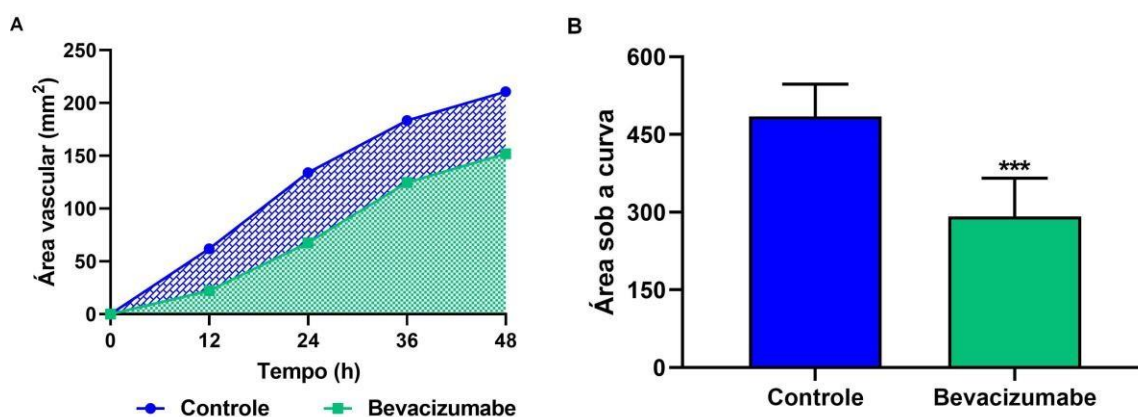
Tempo (h)	Controle (n=17)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP[#]	Média ± DP[#]	
12	62,08 ± 15,69	22,15 ± 16,38	P < 0,0001
24	134,04 ± 24,48	67,59 ± 19,98	P < 0,0001
36	183,37 ± 28,31	124,66 ± 34,07	P < 0,0001
48	210,67 ± 29,71	152,02 ± 31,91	P < 0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm²) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A análise da ASC da progressão temporal da área vascular mostrou uma redução significativa no grupo Bevacizumabe quando comparado ao grupo Controle (P<0,001) (Gráfico 22). O gráfico 22A mostra a representação da ASC nos dois grupos, enquanto o gráfico 22B mostra a comparação entre a ASC dos grupos Controle (484,8±62,66) e Bevacizumabe (291,7±74,08).

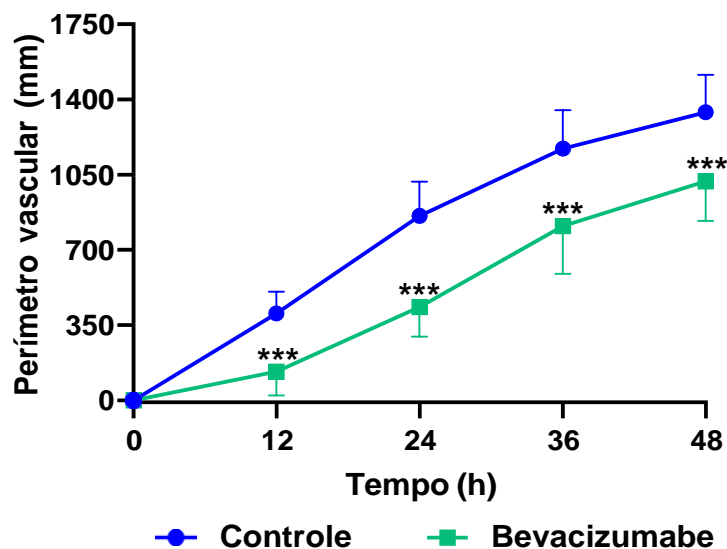
Gráfico 22: Avaliação global do crescimento vascular através da ASC da progressão temporal da área vascular no modelo com abordagem não focal.



(A) Representa a área sob a curva nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). Dados expressos como variação relativa à área vascular inicial (0h). Dados apresentados como média das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas. (B) Mostra a ASC dos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20) expressos como média \pm desvio padrão. *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P < 0,001$).

No que diz respeito ao perímetro vascular, observou-se um crescimento temporal com padrão semelhante ao da área vascular. O grupo Bevacizumabe apresentou um perímetro vascular menor nos tempos 12, 24, 36 e 48h ($P < 0,001$) (Gráfico 23).

Gráfico 23: Progressão temporal do perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa ao perímetro vascular inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A tabela 16 resume os valores relativos ao perímetro vascular dos grupos Controle e Bevacizumabe nos tempos 12, 24, 36 e 48h.

Tabela 16: Perímetro vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal.

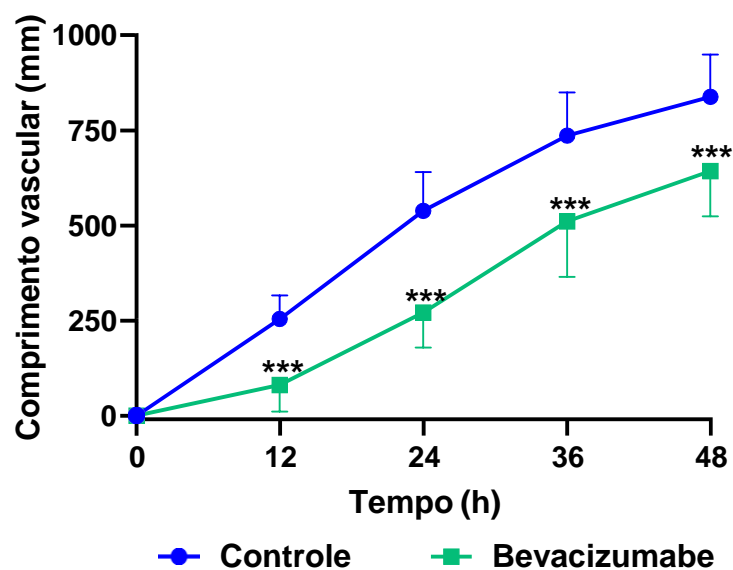
Tempo (h)	Controle (n=17)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP [#]	Média ± DP [#]	
12	404,46 ± 101,31	132,41 ± 110,22	P < 0,0001
24	858,23 ± 158,91	433,85 ± 138,32	P < 0,0001
36	1171,17 ± 179,38	811,33 ± 224,36	P < 0,0001
48	1340,42 ± 173,57	1018,29 ± 184,08	P < 0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O comprimento vascular também apresentou um padrão de crescimento temporal semelhante aos outros parâmetros automáticos, incluindo a redução induzida no grupo Bevacizumabe nos tempos 12, 24, 36 e 48h (P<0,001) (Gráfico 24).

Gráfico 24: Progressão temporal do comprimento vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa ao comprimento vascular inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,001$).

A tabela 17 reúne os valores relativos ao comprimento vascular total nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h.

Tabela 17: Comprimento vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal.

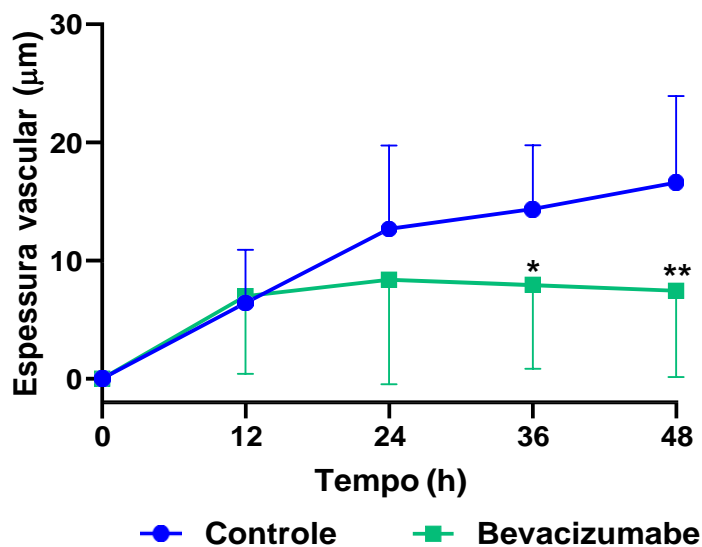
Tempo (h)	Controle (n=17)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP [#]	Média ± DP [#]	
12	254,14 ± 62,42	80,46 ± 69,82	P = <0,0001
24	538,57 ± 101,44	270,73 ± 91,69	P = <0,0001
36	736,43 ± 113,72	510,53 ± 145,36	P = <0,0001
48	837,72 ± 110,97	642,86 ± 118,61	P = <0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A espessura vascular apresentou um padrão de crescimento diferente, onde pode-se observar que o crescimento é dividido em dois momentos lineares, um primeiro com uma angulação maior, mostrando uma maior velocidade de crescimento, e um segundo momento com uma redução na angulação, indicando uma menor velocidade de crescimento. O Bevacizumabe foi capaz de reduzir significativamente a espessura nos tempos 36 e 48h, quando comparados ao controle ($P < 0,05$) (Gráfico 25).

Gráfico 25: Progressão temporal da espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como variação relativa à espessura vascular inicial (0h). Dados apresentados como média \pm desvio padrão das medições nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 horas nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). * denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,05$); ** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe em um determinado tempo ($P < 0,01$).

A tabela 18 mostra os valores médios de espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, bem como a significância correspondente aos testes de comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 18: Espessura vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, nos tempos 12, 24, 36 e 48h, no modelo com abordagem não focal.

Tempo (h)	Controle (n=17)	Bevacizumabe (n=20)	Significância*
	Média ± DP#	Média ± DP#	
12	6,40 ± 4,53	7,00 ± 6,59	P > 0,9999
24	12,68 ± 7,06	8,39 ± 8,86	P = 0,4394
36	14,35 ± 5,41	7,97 ± 7,12	P = 0,0155
48	16,60 ± 7,32	7,45 ± 7,30	P = 0,0023

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros quadrados (mm) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A taxa de crescimento da área vascular se comportou de modo semelhante à taxa de crescimento da área da elipse. Observou-se, no grupo Controle, uma taxa de crescimento inicial significativamente maior que a taxa final (P<0,001). No grupo Bevacizumabe foi observada uma inversão do padrão de crescimento, onde a taxa de crescimento inicial foi significativamente menor que a taxa final (P<0,001) (Tabela 19).

Tabela 19: Taxas de crescimento da área vascular nos grupos Controle e Bevacizumabe, no modelo com abordagem não focal.

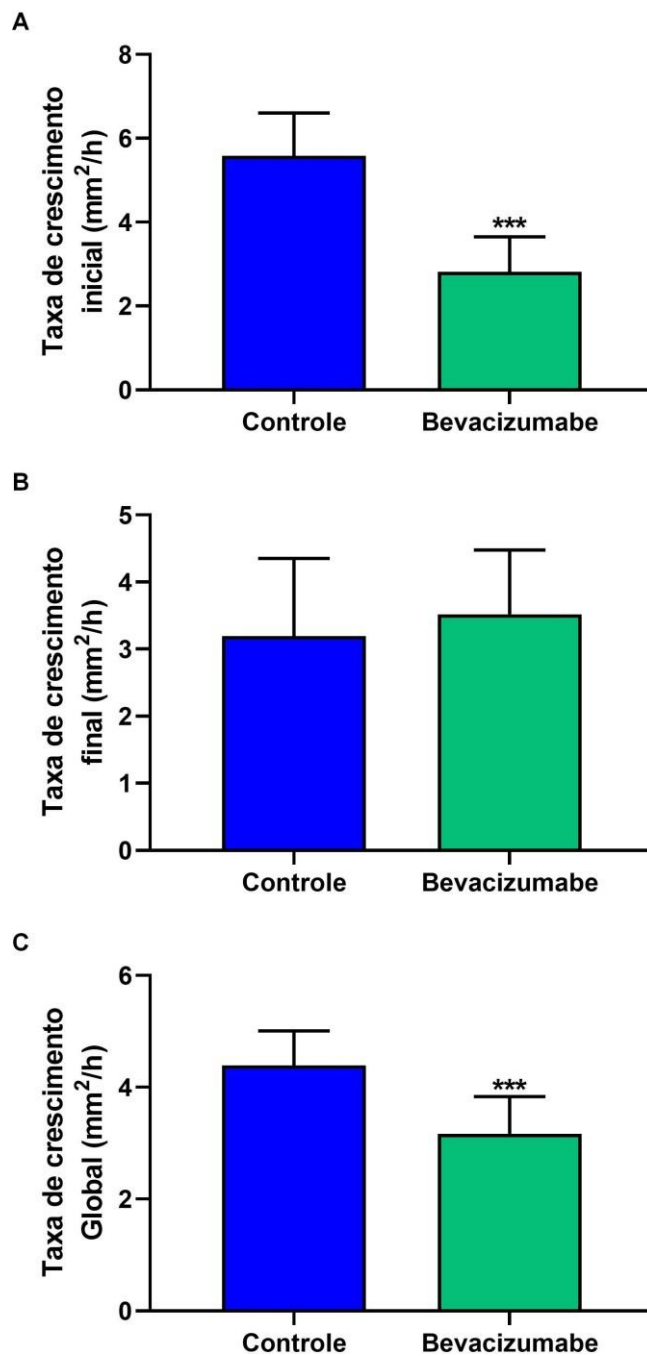
Intervalo de tempo (h)	Controle (n=17) Média ± DP[#]	Bevacizumabe (n=20) Média ± DP[#]	Significância*
0-24	5,59 ± 1,02 ^a	2,82 ± 0,83 ^b	P = <0,0001
24-48	3,19 ± 1,16	3,52 ± 0,96	P = 0,3651
0-48	4,39 ± 0,62	3,17 ± 0,66	P = <0,0001

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos em milímetros (mm²/h) como média ± desvio padrão. * Valores de significância correspondentes à comparação entre os grupos Controle e Bevacizumabe, em um determinado intervalo de tempo, pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. ^a denota diferença estatisticamente significativa quando comparados ao intervalo 24-48h do grupo Controle (P<0,001). ^b denota diferença estatisticamente significativa quando comparados ao intervalo 24-48h do grupo Bevacizumabe (P<0,001).

As taxas de crescimento ainda foram comparadas entre os grupos nos diferentes momentos. Observou-se uma redução das taxas de crescimento inicial (P<0,001) e global (P<0,001) no grupo Bevacizumabe, entretanto não houve diferença entre as taxas de crescimento finais dos dois grupos (Gráfico 26).

Gráfico 26: Taxas de crescimento inicial (A), final (B) e global (C) da área da vascular dos grupos Controle e Bevacizumabe no modelo com abordagem não focal.



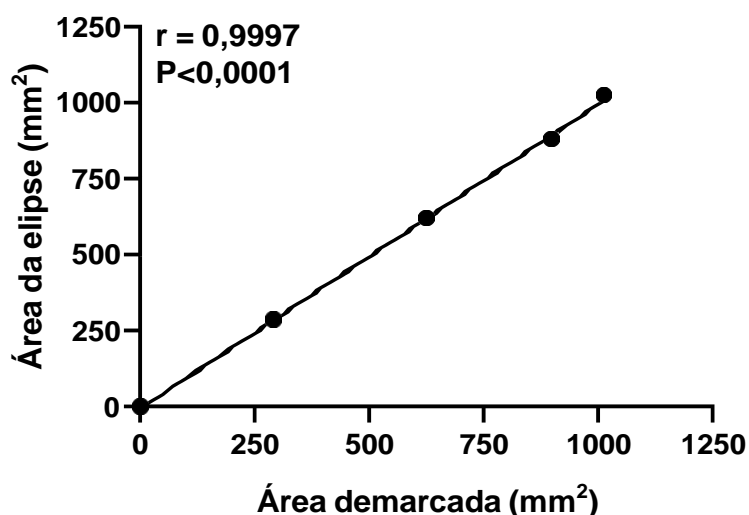
Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como média \pm desvio padrão. (A) Mostra as taxas de crescimento nas primeiras 24h nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). (B) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 24 e 48h nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). (C) Mostra as taxas de crescimento entre os tempos 0 e 48h nos grupos Controle (n=17) e Bevacizumabe (n=20). *** denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Bevacizumabe ($P<0,001$).

5.2.4 Correlação entre medidas manuais e automáticas de quantificação do crescimento vascular

A correlação entre as duas medidas manuais (área demarcada e área da elipse) observada foi positiva e excelente pela correlação de Pearson ($r=0,9997$; $P<0,0001$) (Gráfico 27).

Gráfico 27: Gráfico de dispersão entre as medidas manuais área da elipse e área demarcada.

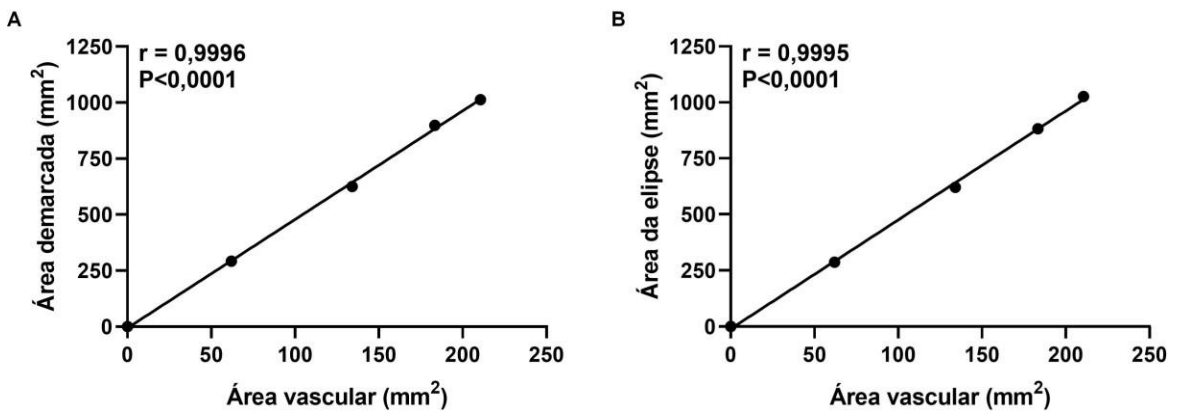


Fonte: Dados da pesquisa.

Os pontos representam a média das medidas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48h do grupo Controle, e a reta representa a regressão linear resultante dos pontos.

Além disso, verificou-se a correlação entre as medidas manuais (área demarcada e área da elipse) e a área vascular. As duas medidas manuais mostraram uma correlação positiva excelente (Gráfico 28).

Gráfico 28: Gráfico de dispersão entre a medida automática área vascular e as medidas manuais área demarcada (A) e área da elipse (B).



Fonte: Dados da pesquisa.

Os pontos representam a média das medidas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48h do grupo Controle, e a reta representa a regressão linear resultante dos pontos.

6 DISCUSSÃO

Nos dias atuais é possível afirmar que o processo angiogênico desempenha um papel importante em várias doenças, dentre elas o câncer, tendo participação fundamental nos processos de crescimento, progressão e metástase do tumor. A inibição desse processo pode ser utilizada juntamente com o tratamento convencional ou como uma alternativa para o tratamento de tumores (MAKRILIA *et al.*, 2009).

Atualmente existem vários modelos desenvolvidos para a pesquisa de fármacos pro ou antiangiogênicos, os principais determinantes para a escolha de um modelo específico são custo, facilidade de uso, reprodutibilidade e confiabilidade. Segundo Costa *et al.*, 2013 e Cheng, *et al.*, 2016 a membrana do saco vitelino de galinha é considerada um excelente modelo para o estudo da formação de novos vasos sanguíneos, devido à alta vascularização, fácil reprodutibilidade, por ser simplista e de baixo custo (RIBATTI, 2008; RIBATTI 2010).

O modelo proposto nessa pesquisa em saco vitelino possuem diversos benefícios do ponto de vista de reprodução de pesquisa, são eles, o número reduzido de animais, a facilidade de reprodução, custo de execução baixo, rápida realização e o fato da não necessidade de aprovação em comitês de ética e pesquisa, visto que, segundo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH - *National Institute of Health*), o embrião não tem o desenvolvimento neural suficiente associados a percepção de dor antes de 14º dia de desenvolvimento. Nas duas abordagens descritas no presente estudo, o tempo de realização não ultrapassou o 5º dia de desenvolvimento.

Dentro dos objetivos propostos, a viabilidade de um modelo de angiogênese em membrana de saco vitelino intra-ovo, visando preservar um ambiente mais fisiológico, foi um grande desafio, entretanto a concretização do modelo foi totalmente possível durante a constituição do piloto. Restava saber sobre o comportamento do embrião na presença de um corpo estranho no caso da utilização do EVA no modelo focal e na presença da carboximetilcelulose 1% no modelo não focal (CMC). Com os resultados obtidos e analisados de forma automática (SAMV) e manuais, ficou demonstrado a viabilidade e reprodutibilidade do modelo.

Ribatti afirma que a acessibilidade ao embrião principalmente para imagens se torna muito melhor quando feito no ex ovo. No entanto, a viabilidade a longo prazo é geralmente menor. Sobre a técnica intra ovo, o autor afirma poder preservar o ambiente mais fisiológico e

possuir alta viabilidade na incubação principalmente a longo prazo, porém ressalta que essa técnica tem limitação para visualização do embrião. No presente estudo, essa limitação foi superada com a elaboração da técnica de abertura ampla da casca do ovo. O desenvolvimento dessa abertura foi crucial para a progressão do método, visto que se fez necessário em vários pontos a observação mais ampla do embrião. Para a realização da ampla abertura, foram puncionados o total de 20 mL de albume, utilizou-se uma fita adesiva colada a casca sobre todo o local que seria aberto, assim como Aleksandrowicz e Herr realizaram em 2015 com a finalidade evitar rachaduras na casca do ovo (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; RIBATTI, 2016).

Na primeira fase do estudo os ovos eram lavados em água corrente e realizada antissepsia com álcool 70%, em seguida eram acomodados na chocadeira elétrica em temperatura e umidade controladas (37,5 a 38°C; 60% de umidade) durante 72h. No tempo 60h era realizado uma metodologia própria de punção de 5mL de albume de cada ovo, com o propósito de diminuir quantidade de líquido no interior do ovo e assim permitir a abertura da casca, a realização dessa metodologia teve como finalidade não lesar a gema. (PEIFER; DANNHARDT, 2004; NORRBY, 2006; WANG *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2013).

Ao final das 72h do processo de chocagem, o próximo passo do estudo foi realizar abertura ampla da casca. Tiras de fita adesiva foram cuidadosamente coladas sobre a casca do ovo, em seguida se utilizava uma tesoura curva para a realização da perfuração da casca e abertura inicial. A utilização da fita grudada a casca tinha grande importância para evitar que fragmentos da casca caíssem sobre o embrião. Após a abertura inicial eram coletados mais 15 mL de albume, essa técnica própria tem a finalidade de permitir a ampliação ao máximo do orifício.

No estudo realizado por Aleksandrowicz e Herr em 2015 que visou estabelecer um método para eutanásia in ovo do embrião de galinha, via administração de pentobarbital intravenoso, também foi utilizado uma fita grudada a casca, entretanto, não foi realizada abertura ampla que permitisse total visualização do embrião e boa aquisição de imagens nem tampouco foi realizada punção de grande quantidade de albume.

Uma vez aberto, era adotado uma metodologia própria para posicionamento dos ovos. Esses eram alocados na horizontal e com a abertura realizada pra cima, sobre um copo descartável de poliestireno pequeno (50 mL) que teve sua borda superior retirada, afim de aumentar sua maleabilidade e acomodar melhor a superfície oviforme do ovo. Em seguida,

tanto ovo quanto o copo pequeno eram colocados dentro de outro copo maior (150 mL) para melhorar a estabilização e proteção do ovo.

Quanto aos métodos de aplicação das substâncias, foi escolhido como metodologia própria o EVA que é de fácil obtenção e de custo extremamente baixo quando comparado com anéis de plástico utilizados em estudos como o de Wang, *et al.* em 2007 ou os anéis de gel de sílica utilizados por Zhou, *et al.* em 2013. A utilização do EVA no formato de moldura com medidas específicas, teve o objetivo de limitar a área de inoculação e obtenção das imagens em aumento de 10x sem que o EVA aparecesse nas imagens. Outra metodologia própria adotada foi a diluição das substâncias em carboximetilcelulose 1%, um agente espessante, com o objetivo de aumentar a viscosidade da solução e melhorar a aderência ao embrião, mantendo a solução retida ao campo de inoculação. Após a diluição inoculou-se diretamente sobre o embrião com a intenção que se espalhasse no entorno do embrião, fosse absorvido por vasos maiores que ali estão e assim se propagasse mais uniformemente por todo o embrião, visto que a análise dessa metodologia não seria focal.

A partir desse ponto se inicia uma segunda fase do estudo, quando a contagem de horas se reinicia para melhor entendimento do acompanhamento temporal das imagens. A obtenção das imagens seguiu um padrão temporal, sendo estabelecido acompanhamento fotográfico de 12 em 12 horas até que se completasse 48 horas, com o objetivo de acompanhar mais de perto possíveis mudanças no padrão de desenvolvimento dos vasos sanguíneos dos embriões. Esse padrão temporal de avaliação não é consenso, há alguns trabalhos que realizaram as análises somente e tempos tardios, como Costa e colaboradores em 2013, que observaram as imagens de ovos de codorna, somente ao atingir 72 horas e 96 horas, outro exemplo é o estudo realizado por Cheng e colaboradores em 2016, que observaram as imagens no tempos de 12 e 36 horas, no entanto, apesar do acompanhamento fotográfico iniciar precocemente, possui um grande espaço de tempo entre a primeira e a segunda observação.

Na obtenção das referidas imagens, foi utilizado o filtro verde do microscópio, proporcionando um melhor contraste entre os vasos sanguíneos e as demais estruturas. Esse filtro também é chamado de “sem vermelho” e usualmente é utilizado para detecção automática de vasos sanguíneos (MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2007; MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 2019).

Após a inoculação e obtenção da imagem, o copo era tampado com filme de policloreto de vinila (PVC) a fim de evitar contaminação e perfurado com agulha diversas vezes para facilitar a aeração.

Há alguns anos *softwares* de análise de imagens vem sendo utilizados em diversas áreas da pesquisa e principalmente na investigação dos processos angiogênicos, como realizado por Peifer e Dannhardt em 2004, quando propuseram um novo ensaio angiogênico utilizando análise digital de imagem. No entanto, pesquisadores que não tem acesso a programas como o acima citado, ficam privados de desenvolver pesquisas com angiogênese com o mesmo grau de confiabilidade.

No método desenvolvido pelo presente estudo as análises das imagens foram realizadas de duas formas distintas, com o propósito de comparar e desenvolver uma metodologia específica para que qualquer pesquisador que tenha ou não acesso a *softwares* de quantificação de vasos sanguíneos, possam realizar em estudos futuros a quantificação da angiogênese de forma manual, equivalente a realizada por *softwares*. Observou-se correlações extremamente positivas quando cruzados os dados entre os resultados obtidos nas análises das imagens nas formas manual e automática nos dois métodos de inoculação.

Diversas drogas antiangiogênicas apresentam efeito tóxico em embrião de galinha e já foi observado um efeito citotóxico do bevacizumabe em células oculares (Beedie *et al.*, 2016; Spitzer *et al.*, 2006), entretanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças na mortalidade nos grupos que utilizaram o bevacizumabe em relação ao grupo controle.

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal inibidor do fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF) também chamado de anti-VEGF, é considerado o agente anti-angiogênico mais avançado clinicamente. Embora o Bevacizumabe tenha ganhado um lugar no tratamento de primeira linha do câncer colorretal e câncer de pulmão de células não pequenas, há um corpo de evidências em rápido crescimento de sua eficácia também no tratamento de vários outros tumores sólidos (HURWITZ, *et al.*, 2004; FAYETTE; SORIA; ARMAND, 2005; GASPARINI *et al.*, 2005; CARVALHO, 2011; YILDIZ, *et al.*, 2013).

Nas análises das abordagens focal e não focal descritas, foram encontrados comportamentos muito semelhantes, levando em consideração os métodos de análise manual e automático. Com relação a área demarcada, que se apresenta como uma medida manual, na abordagem focal os dois grupos se comportaram com um padrão de crescimento linear, enquanto que na abordagem não focal esse crescimento dos grupos teve padrão menos linear, tendendo a redução do crescimento no último ponto.

Outra medida realizada de forma manual foi área bitrapezoidal da abordagem focal e a área da elipse da não focal, ambas também apresentaram comportamento temporal

progressivo. Mesmo tendo sido realizada apenas com cálculos matemáticos sem auxílio de nenhum *software*, esse resultado apresentou um padrão de desenvolvimento muito parecido com a área demarcada.

O crescimento aumentado apresentado nas áreas dos grupos Controles, em relação aos grupos Bevacizumabes foi observado pontualmente em análises anteriores, esse resultado também foi identificado quando avaliado globalmente os resultados obtidos com a análise da ASC bitrapezoidal na abordagem focal e na ASC da elipse na abordagem não focal.

Na atualidade não há estudos que quantifiquem de forma manual a angiogênese em embrião de galinha. Atualmente os trabalhos que quantificam angiogênese em embrião de galinha se limitam a avaliar de forma focal e com métodos de automáticos, realizado por *softwares*, como o estudo realizado por Cheng *et al.* em 2016, que avaliou de forma automática a área ocupada pelos vasos, bem como a densidade dos vasos sanguíneos, porém de forma automática. Já no estudo realizado por Costa *et al.* em 2013 foi realizado a análise do global da MSV de ovos de codorna, entretanto, também foi utilizado a análise automática. Observa-se também falta de padronização na aquisição e análise das variáveis.

Ainda sobre o crescimento das áreas, avaliou-se a velocidade de crescimento, esse dado foi denominado taxa de crescimento. Na abordagem focal, foi calculado por meio das áreas bitrapezoidais e no não focal, por meio da área da elipse. Nas duas abordagens, os grupos Controles apresentaram uma taxa de crescimento maior durante as primeiras 24h, já no intervalo de tempo de 24 a 48h os grupos Bevacizumabes apresentaram uma taxa mais alta. Entretanto quando observado as 48h, os grupos Controles apresentaram maiores taxas de crescimento. Esse comportamento pode ser explicado, pela provável ação do inibidor de VEGF atuando mais no início do desenvolvimento e diminuindo sua eficácia com o passar do tempo.

Em 2007, Wang e colaboradores também avaliaram a taxa de crescimento dos vasos sanguíneos, nesse estudo os autores desenvolveram um modelo de angiogênese em MSV, realizado no *ex ovo* e analisado de maneira global, porém se utilizou apenas de análises automáticas de imagem. Já na pesquisa realizada por Zhou e colaboradores em 2013, também foi realizado o cálculo da taxa de crescimento vascular da MCA e da MSV, utilizando apenas metodologia focal e automática.

Outra maneira realizada para calcular a área de desenvolvimento, foi através da área vascular, realizada automaticamente pelo *software* SAMV. Os resultados obtidos aqui foram

muito semelhantes quando comparados o focal e o não focal e apresentam padrões similares aos resultados das medidas manuais.

A partir dos dados de área vascular obtidos pelo *software* SAMV calculou-se a áreas sobre a curvas nas abordagens focal e não focal e obteve-se como resultado a demonstração de que os grupos que utilizaram bevacizumabe apresentaram resultados totais de área menores que os grupos controles. Ressaltando mais uma vez o caráter antiangiogênico da droga. Em 2004, Peifer e Dannhardt desenvolveram um novo ensaio de angiogênese em MCA usando um modelo de análise digital com avaliação apenas focal, nesse estudo foi realizado um acompanhamento de 48h dos embriões, entretanto, sem um padrão bem estabelecido de intervalo de horas.

Outro ponto em que os resultados corroboraram com a progressão linear do desenvolvimento dos embriões nos grupos Controle e retardo no desenvolvimento do grupo Bevacizumabe foi a medida manual denominada comprimento avançado. Este, foi avaliado apenas na abordagem focal, devido o método de escolha para realizar o cálculo não se aplicar a abordagem não focal.

Os pontos comprimento vascular total e perímetro vascular foram avaliados de maneira automática e se comportaram de forma muito semelhante, mostrando progressão dos valores dos grupos Controle e Bevacizumabe, entretanto essa progressão se mostra reduzida nos grupos que fizeram uso do antiangiogênico.

Esse padrão não foi seguido quando avaliado a espessura vascular, também pelo método automático. Na abordagem focal o grupo controle se desenvolveu de forma mais rápida e progressiva que o grupo Bevacizumabe, porém mais evidente nas primeiras 12 horas. Já na abordagem não focal os grupos Controle e o Bevacizumabe apresentaram um desenvolvimento similar até as 12 horas, a partir desse ponto as curvas de desenvolvimento vão em direções opostas, o Controle seguindo progressivamente e o Bevacizumabe decrescendo, principalmente após as 24h terminando a curva em direções opostas. Não foram encontrados estudos que calcularam o comprimento vascular total, perímetro vascular e espessura vascular, entretanto alguns autores calcularam outros pontos aqui não abordados, como Wang *et al.* em 2007, onde foi calculado através de análise automática a densidade vascular em MSV

Ao final das duas abordagens foram realizadas correlações entre os resultados a fim de verificar a equivalência das análises. Nas análises manuais foram correlacionados a área bitrapezoidal com área demarcada na abordagem focal e na abordagem não focal, área da elipse

com área demarcada, as duas correlações se apresentaram de forma extremamente positiva. Levando ao entendimento de que áreas realizadas somente com cálculos matemáticos foram equivalentes nos seus resultados com áreas obtidas de forma manual, porém calculada com auxílio do ImageJ.

As próximas correlações se deram com o cruzamento das medidas manuais correlacionadas acima, com medidas exclusivamente automáticas, obtidas pela análise do *software* SAMV. No focal primeiramente foram cruzados os dados da área demarcada com área vascular e posteriormente da área bitrapezoidal com área vascular. Na abordagem não focal o cruzamento foi realizado entre área demarcada com área vascular e área da elipse e área vascular. Todas as correlações citadas acima tiveram excelentes resultados positivos. Os resultados obtidos com as correlações realizadas no presente estudo levam ao entendimento de que as medidas automáticas e manuais podem apresentar resultados correspondentes, permitindo assim que mesmo os pesquisadores que não disponham de *software* específico para a análise do desenvolvimento dos vasos sanguíneos em MSV do embrião de galinha possam desenvolver pesquisas com resultados consistentes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um modelo de angiogênese na membrana do saco vitelino de embrião de galinha que proporcionasse o monitoramento temporal do processo angiogênico e possibilitasse a prospecção de fármacos antiangiogênicos. Foi verificado que o modelo estudado possibilita o teste de fármacos antiangiogênicos em MSV de embrião de galinha.

O modelo desenvolvido nessa pesquisa reúne qualidades importantes num ensaio de angiogênese, são elas: fácil reprodutibilidade, simplista e de baixo custo, além de se apresentar como um modelo sensível a ensaios antiangiogênicos, permitir monitorização temporal e espacial do processo angiogênico, se utilizar de variáveis que possibilitam uma mensuração objetiva da resposta angiogênica e proporcionar a prospecção de fármacos antiangiogênicos.

Os resultados antiangiogênicos encontrados com o uso do bevacizumabe poderiam ser melhorados com a repetição da dose no tempo 24h, visto que os melhores resultados observados foram de 0 a 24h. Outro obstáculo encontrado, foi a difícil padronização do posicionamento do EVA sobre o embrião, visto que ao abrir os ovos encontrava-se os embriões em diferentes posições. Supõe-se que a contaminação pode ter sido um fator importante para a morte de alguns embriões, com base nessa suposição sugere-se fazer uso de fluxo laminar e autoclave afim de diminuir as chances de contaminação.

A partir dos dados adquiridos nesta pesquisa podemos sugerir estudos futuros que tenham como objetivo a prospecção de fármacos pro e antiangiogênicos. Ademais, também podem ser realizadas pesquisas de avaliação do processo angiogênico em MSV se utilizando dos parâmetros manuais descritos nesse estudo.

8 CONCLUSÃO

O modelo de angiogênese na membrana do saco vitelino, tanto na abordagem focal como na não focal, proporciona o monitoramento temporal do processo angiogênico e possibilita a demonstração do efeito antiangiogênico de fármacos.

REFERÊNCIAS

ADAIR, T. H.; MONTANI, J.P.; **Overview of Angiogenesis**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

ALEKSANDROWICZ, E.; HERR, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. **Altex**, v. 32, p.143-147, 2015.

ARRUDA, M. S. P.; NOGUEIRA, M. E. S.; BORDON, A. P. Histological evaluation of the lesion induced by inoculation of *Leishmania mexicana* in the cheek pouch of the hamster. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 293-297, 2002.

AUERBACH, R. *et al.* Angiogenesis assays: a critical overview. **Clinical Chemistry**, v. 49, p. 32-40, 2003.

AUSPRUNK, D. H.; FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 14, n. 1, p. 53-65, 1977.

BECKER, M. D. *et al.* *In vivo* fluorescence microscopy of corneal neovascularization. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 236, p. 390-398, 1998.

BEEDIE, S. L. *et al.* Shared mechanism of teratogenicity of anti-angiogenic drugs identified in the chicken embryo model. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-10, 2016.

BURRI, P. H.; HLUSHCHUK, R.; DJONOV, V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. **Developmental Dynamics**, v. 231, n. 3, p. 474-488, 2004.

CAMPOS, P. P. *et al.* Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyetherpolyurethane sponge implant model. **Histology and Histopathology**, v. 12, p. 1263-1270, 2006.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932-936, 2005.

CARVALHO, A. A. *et al.* Natural products used as candidates for angiogenesis inhibitors in cancer therapy. **Trends in Organic Chemistry**, v. 15, p. 79-93, 2011.

CHENG, X. *et al.* Dexamethasone exposure accelerates endochondral ossification of chick embryos via angiogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 149, n. 1, p. 167-177, 2016. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfv227>.

CONRAD, T. J. *et al.* *In vivo* measurement angiogenesis of corneal with video data acquisition and computerized image analysis. **Laboratory Investigation**, v. 70, n. 3, p. 426-434, 1994.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, n. 3, p. 507-521, 2001.

COOKE, R. C. **A Guerra contra o câncer: a revolucionária descoberta da angiogênese e as novas perspectivas para a cura do câncer**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. Tradução de: Maria Tereza Machado.

COSTA, E. V. *et al.* Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in Japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. **Bioelectromagnetics**, v. 34, n. 2, p. 114-121, 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/bem.21759>.

COSTA, P. M. **Potencial efeito inibitório do Lassbio-596, um análogo da talidomida, na angiogênese inflamatória em córnea de coelho**. 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina / Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2011.

DVORAK, H. F. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 6, p. 1747-1757, 2003.

EDELMAN, J. L.; CASTRO, M. R.; WEN, Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression blood vessels in the rat cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 6, p. 1112-1123, 1999.

FAYETTE, J.; SORIA, J. C.; ARMAND, J. P. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1109-16, 2005.

FECHINE-JAMACARU, F. V. **Desenvolvimento e validação de um método para análise morfológica e fractal da rede vascular peritumoral em modelos experimentais de câncer**. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) / Mestrado Profissional em Farmacologia / Clínica Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

FECHINE-JAMACARU, F. V. **Quantificação de angiogênese corneana *in vivo* através de processamento de imagens digitais**. 2006. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina / Departamento de Cirurgia / Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Cirurgia, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2006.

FECHINE-JAMACARU, F. V.; FECHINE JÚNIOR, J. U.; DE MORAES FILHO, M. O. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 64-73, 2005.

GASPARINI, G., *et al.* Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 1295-1311, 2005.

GOODWIN, A. M. *In vitro* assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. **Microvascular Research**, v. 74, p. 172-183, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2007.05.006>.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353-364, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7).

HASAN, J. *et al.* Quantitative angiogenesis assays *in vivo*-a review. **Angiogenesis**, v. 7, p. 1-16, 2004.

HOCHMAN, B. *et al.* Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 415-430, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502003000500007>.

HURWITZ, H., *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 2335-2342, 2004.

JUANES, C. C. *et al.* Red propolis and L-lysine on angiogenesis and tumor growth in a new model of hamster cheek pouch inoculated with Walker 256 tumor cells. Einstein (São Paulo), **Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein**, v. 17, n. 2, p. 1-7, 2019. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019ao4576.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 5, p.1469-1480, 2006.

LIU, M.; XIE, S.; ZHOU, J. Use of animal models for the imaging and quantification of angiogenesis. **Experimental Animals**, v. 67, n. 1, p. 1-6, 2018.

MAKRILIA, N. *et al.* The role of angiogenesis in solid tumours: An overview. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, n. 7, p. 663-71, 2009.

MARTINEZ-PEREZ, M. E. *et al.* Automatic optic disc detection in colour fundus images by means of multispectral analysis and information content. **Peerj**, v. 7, p. 1-24, 2019.

MARTINEZ-PEREZ, M. E. *et al.* Segmentation of blood vessels from red-free and fluorescein retinal images. **Medical Image Analysis**, v. 11, p.47-61, 2007.

MELO, N. O. R. **Potencial efeito inibitório do Lassbio-596, um análogo da talidomida, na angiogênese inflamatória em córnea de coelho.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina / Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2018.

NORRBY, K. *In vivo* models of angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, p. 588-612, 2006.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **American Journal of Physiology-cell Physiology**, v. 282, p. 947-970, 2002. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>.

PEIFER, C.; DANNHARDT, G. A novel quantitative chick embryo assay as an angiogenesis model using digital image analysis. **Anticancer Research**, v. 24, p. 1545-1551, 2004.

PRIOR, B. M.; YANG, H. T.; TERJUNG, R. L. What makes vessels grow with exercise training? **Journal Of Applied Physiology**, v. 97, n. 3, p. 1119-1128, 2004.

RAJABI, M.; MOUSA, S. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p. 34-46, 2017.

REDONDO, A. R. **Determinação do sítio de ligação de um peptídeo anti-angiogênico em seus receptores.** 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de São Paulo / Instituto de Química / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), São Paulo, 2016.

RIBATTI, D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 270, p. 181-224, 2008.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of Development**, v. 141, p. 70-77, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.003>.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* assay to study antiangiogenesis. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 3, p. 482-513, 2010.
<http://dx.doi.org/10.3390/ph3030482>.

RIBEIRO, J. C. M. L. **Potencial efeito inibitório do Lassbio-596, um análogo da talidomida, na angiogênese inflamatória em córnea de coelho**. 2011. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina / Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2011.

SPITZER, M. S. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. **British Journal Of Ophthalmology**, v. 90, n. 10, p.1316-1321, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1136/bjo.2006.095190>.

TAHERGORABI, Z; KHAZAEI, M. A review on angiogenesis and its assays. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, p. 1110-1126, 2012.

TARABOLETTI, G.; GIAVAZZI, R. Modelling approaches for angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 881-889, 2004.

VALIATTI, F. B. *et al.* Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 2, p. 106-113, 2011.

WANG, H. M. *et al.* Chick yolk sac membrane assay: a novel angiogenesis model. **Journal of Biological Research**, v. 7, p. 93-97, 2007.

WELTI, J. *et al.* Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3190-3200, 2013

YADGARY, L.; YAIR, R.; UNI, Z. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. **Poultry Science**, v. 90, n. 2, p. 410-416, 2011.
<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2010-01075>.

YILDIZ, C. *et al.* Anti-angiogenic effects of diltiazem, imatinib, and bevacizumab in the CAM assay. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, p. 1-8, 2013.

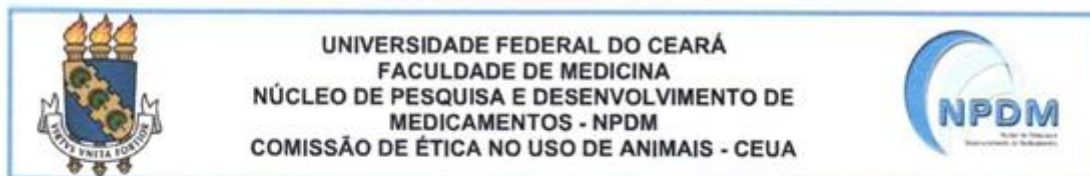
YOO, S. Y.; KWON, S. M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-11, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/127170>.

YOSHIDA, W. B. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 4, n. 4, p. 316-318, 2005.

YUE, P. *et al.* Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. **Chinese Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2007.

ZHOU, Q. *et al.* A novel four-step system for screening angiogenesis inhibitors. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 6, p.1734-1740, 2013.

9 ANEXO A



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTABELECIMENTO DE MODELO PARA PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS ANTIANGIOGÊNICOS EM MEMBRANA DO SACO VITELINO DE EMBRIÃO DE GALINHA", registrada com o protocolo 07010819-0, sob a responsabilidade de **Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru** e **Pedro Henrique Freitas Maia** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 19 / 09 / 2019.

We hereby certify that the project entitled "ESTABLISHMENT OF A MODEL FOR ANTIANGIOGENIC SUBSTANCES SCREENING ON YOLK SAC MEMBRANE FROM CHICK EMBRYO", identified by the protocol number 07010819-0, and conducted by **Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru** and **Pedro Henrique Freitas Maia** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo Chordata, sub-vertebrate Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching) - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in a meeting of 09 / 19 / 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: SETEMBRO/2019 Fim: DEZEMBRO/2020
Espécie	Galinha (<i>Gallus domesticus</i>)
Linhagem	Não se aplica.
Nº de animais autorizados	80
Peso	Não se aplica.
Idade	0 a 5 dias
Sexo	Não se aplica.
Origem (fornecedor)	Companhia de Alimentos do Nordeste - Cialne
Local do experimento	Laboratório de Farmacologia Pré-clínica NPDM