



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAROLINA ESMERALDO ALVES DE OLIVEIRA

**ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDE (CAM): MODELO
EXPERIMENTAL COMO ALTERNATIVA À UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM
PESQUISA E SUAS APLICAÇÕES**

FORTALEZA

2020

CAROLINA ESMERALDO ALVES DE OLIVEIRA

ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDE (CAM): MODELO
EXPERIMENTAL COMO ALTERNATIVA À UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM
PESQUISA E SUAS APLICAÇÕES

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Roberta Jeane
Bezerra Jorge.

Coorientador(a): Dra. Aline Diogo Marinho

FORTALEZA

2020

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)

- O46e Oliveira, Carolina Esmeraldo Alves de.
Ensaio da membrana corioalantoide (CAM) : modelo experimental como alternativa à utilização de animais em pesquisa e suas aplicações / Carolina Esmeraldo Alves de Oliveira. – 2020.
78 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.
Coorientação: Profa. Dra. Aline Diogo Marinho.
1. Membrana corioalantoide. 2. Princípio dos 3Rs. 3. Revisão bibliográfica. 4. Angiogênese. 5. Toxicidade. I. Título.

CDD 570

CAROLINA ESMERALDO ALVES DE OLIVEIRA

ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDE (CAM): MODELO
EXPERIMENTAL COMO ALTERNATIVA À UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM
PESQUISA E SUAS APLICAÇÕES

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Aline Diogo Marinho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Danilo Galvão Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao Lippy, por sua companhia e amor genuíno e puro durante 16 anos de vida, descanse em paz.
E à minha família e meus amigos, por todos os momentos de apoio e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais, pelo amor, carinho e suporte em todas as etapas da minha vida, além de todos os sacrifícios feitos para que meus sonhos fossem alcançados. À minha mãe, Alberlene, por ter me ensinado a ser firme e persistente sem perder o ânimo e por ser um exemplo de mulher para mim, em todos os sentidos. Ao meu pai, Carlos, por todo o esforço e compreensão infinitos dedicados a mim. E à minha irmã, Isabella, por sua amizade, por todas as risadas, brigas, conselhos e, principalmente, por ser uma pessoa tão verdadeira e competente. Vocês foram os pilares que me apoiaram para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Por essa razão, vocês têm todo meu amor e minha gratidão eterna.

À minha orientadora, Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge, que há 1 ano me acolheu no laboratório e é uma profissional por qual tenho profundo respeito e admiração. Obrigada por ter me ajudado a amadurecer cientificamente e me dado a oportunidade de trabalhar com o que eu aprecio. Agradeço por todos os ensinamentos, por seus constantes incentivos, pela paciência e total apoio e por não ter desistido de mim, mesmo com todas as adversidades deste ano.

À minha coorientadora, Dra. Aline Diogo Marinho, outro grande exemplo de pesquisadora para mim. Obrigada por ter sido tão atenciosa e prestativa e por depositar confiança em meu trabalho, contribuindo para o meu enriquecimento com suas valiosas sugestões. Agradeço imensamente por seu apoio, disponibilidade e orientação, que viabilizaram a realização desta monografia.

Ao Me. Danilo Galvão Rocha, por ter aceitado o convite de participar da banca, e por ter sido uma das pessoas mais compreensivas e admiráveis que já conheci. Acredito que, sem o seu suporte, este trabalho não teria sido realizado, você foi praticamente o meu segundo coorientador, então serei eternamente grata por sua ajuda e por todos os seus incentivos.

A todos que compõem o Laboratório de Toxinologia/Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET), em especial a Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, que abriu as portas do seu laboratório para a nossa pesquisa, os ICs Brenda Uchôa, Amanda Oliveira, Hendyelle Rodrigues, Mariana Maia e Renan Ribeiro, que sempre estiveram dispostos a ajudar nos experimentos, além de Wendell Barbosa, Júnior Nogueira e Alison Silveira, por todos os ensinamentos compartilhados e companheirismo em todas as horas e dias da semana. Um agradecimento especial à Jacqueline Braga, que não está mais no laboratório, mas sua presença foi especial e inesquecível, que sempre vou guardar com muito carinho, e à Natália Cavalcante, que, além de ser uma grande amiga, me ajudou a realizar este trabalho e me deu apoio emocional

de uma forma que eu nunca poderei agradecer apropriadamente. Enfim, obrigada pelo ano incrível de conhecimentos e formação que adquiri no laboratório. Vocês são pessoas incríveis e exemplos de cientistas, e eu admiro profundamente todos vocês.

A toda a equipe do Laboratório de Farmacologia Bioquímica, Profa. Nylane Alencar, que me deu a oportunidade de ingressar na área de Farmacologia, e meus ex colegas de laboratório, Tamiris Goebel, Marília Nunes, Fernanda Soares, Gisele Pinheiro, Bianca Kurita, Kayanny Ferreira, Anderson Dantas, Liviane Rabelo, Rebeca Duarte, Manuel Monteiro e Patrícia Samara. Vocês me introduziram ao NPDM e me acolheram como uma família. Sempre terei muito orgulho de ter sido parte desse grupo e me inspiro em cada um de vocês.

Aos meus colegas da turma de Biologia, pelos 5 anos de companheirismo ao longo da nossa jornada de graduação. Obrigada por serem pessoas tão incríveis, por todas as memórias inesquecíveis que guardarei para a minha vida e por todos os momentos de descontração durante o curso. Aos meus amigos mais próximos, João, Elivânia, Letícia, Susy, Lara, Joel, Lucas e Andreza, por todo o apoio emocional, principalmente neste ano tão difícil, e por todos os momentos que estivemos juntos, apesar de distantes fisicamente, nos esquecendo dos problemas, que trouxeram tanta leveza e carinho entre nós. Não há palavras para definir o quanto devo esta realização pessoal a cada um, esse sentimento não caberia nesse espaço tão pequeno, então só posso me limitar a agradecer infinitamente pela amizade de vocês.

Aos órgãos de fomento à pesquisa FUNCAP e CNPq, pelo apoio financeiro e científico durante grande parte da minha graduação. E ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), por me conceder a oportunidade da realização deste trabalho e pelo suporte físico, intelectual e administrativo.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao curso de Ciências Biológicas, por ressignificarem minha vida e, ao mesmo tempo, darem um rumo para ela. Estar nesse curso, em uma universidade pública de qualidade, me proporcionou o privilégio de não só ter vivências únicas que me agregaram e que me tornaram um ser humano melhor, mas que também me capacitaram como profissional durante vários anos seguidos. Agradeço por todas as oportunidades dadas e, principalmente, por todas as pessoas incríveis que me trouxe.

Por fim, a todos que me inspiraram com seus ensinamentos e comprometimento com a pesquisa e que de alguma forma me influenciaram, torceram por mim e contribuíram direta ou indiretamente com a minha formação em mais uma fase da minha vida, muito obrigada!

“Imagination is the discovering faculty, pre-eminently. It is that which penetrates into the unseen worlds around us, the worlds of Science.” (Ada Lovelace)

RESUMO

Diante dos incentivos para seguir o princípio dos 3Rs estabelecidos pela ciência do século XXI, tem-se visto uma tendência global na adoção de métodos alternativos à experimentação com animais em pesquisas. Uma alternativa muito promissora é o ensaio da membrana corioalantoide do embrião de galinha (CAM), técnica que tem sido utilizada há muitos anos como modelo experimental robusto para a elucidação de diversos processos biológicos. Desse modo, objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica narrativa para demonstrar o uso potencial do ensaio CAM como modelo alternativo à experimentação animal, enfatizando sua relevância no âmbito científico. Uma descrição detalhada sobre protocolos de cultivo distintos e vantagens e limitações do ensaio CAM foi apresentada, comparando-o com outros modelos *in vivo* comumente utilizados. Também foram descritas algumas das aplicações mais relevantes deste método, identificando publicações relativas ao seu uso e concluindo com um esboço sobre as contribuições científicas e as perspectivas do uso deste modelo no cenário internacional. Foi verificado que o ensaio possui inúmeras vantagens em comparação a outros modelos experimentais, tais como: baixo custo, simplicidade, reprodutibilidade e acessibilidade. Através desse ensaio, pesquisadores têm estudado processos associados à angiogênese e ao efeito de substâncias na vascularização de tecidos. Por ser naturalmente imunodeficiente e altamente vascularizada, a CAM pode receber enxertos de diferentes tecidos e espécies. Este modelo ainda permite acelerar o processo de triagem de várias amostras durante ensaios pré-clínicos. Além disso, não exige grandes preocupações éticas, já que nenhuma dor é acometida aos embriões. A CAM tem sido aplicada em diversas pesquisas relacionadas à engenharia de tecidos, crescimento tumoral e metástase, desenvolvimento de fármacos, perfil toxicológico e atividade angiogênica e antiangiogênica de moléculas. Espera-se que o emprego deste método se amplie nos próximos anos, principalmente devido à sua popularização e o incentivo à validação de novas metodologias alternativas. A legislação brasileira ainda não possui nenhuma menção aos aspectos éticos deste modelo, mas a participação do país neste tocante está se potencializando cada vez mais. Concluiu-se que o ensaio CAM representa um modelo *in vivo* bastante eficaz e versátil para diversos estudos pré-clínicos, podendo atuar de forma complementar aos testes *in vitro* antes de prosseguir para experimentos com modelos mamíferos, o que evidencia seu potencial como método alternativo ao uso de animais em pesquisas científicas.

Palavras-chave: Membrana corioalantoide. Princípio dos 3Rs. Revisão bibliográfica. Angiogênese. Toxicidade.

ABSTRACT

In view of the new incentives to follow the principle of 3Rs established by science in the 21st century, there has been a global trend for the adoption of alternative methods to animal experimentation in research. One of the most promising alternatives is the chick embryo chorioallantoic membrane assay (CAM), a technique that has been used for many years as a robust experimental model for the elucidation of several biological questions. Thus, the purpose of this study was to present a narrative literature review which demonstrates the potential use of the CAM assay as an alternative model to animal experimentation, emphasizing its relevance in the scientific field. A detailed description of different cultivation protocols and advantages and limitations of the assay was presented, comparing it with other commonly used *in vivo* models. A few of the most relevant applications of this method were also described, identifying publications related to its use and concluding with a summarized update of the scientific contributions and perspectives of using this model in the international scenario. This review indicated that the CAM assay has numerous advantages compared to other experimental models, such as: low cost, simplicity, reproducibility and accessibility. With this model, researchers are able to study several processes associated with angiogenesis and the effect of substances on tissue vascularization. Being naturally immunodeficient and highly vascularized, the CAM may receive transplantations from different tissues and species. This model also allows a rapid screening process of several samples during pre-clinical trials. Moreover, it does not require major ethical concerns, as no pain is perceived by the chick embryos. The CAM has been applied in several studies related to tissue engineering, tumor growth and metastasis, drug development, toxicological profile and angiogenic and antiangiogenic activity of molecules. It is expected that the use of this method will expand in the coming years, mainly due to its popularization and the incentive to validate new alternative methodologies. Until now, Brazilian legislation does not have any mentions concerning the ethical aspects of the use of this model, but the country's participation in this regard is increasingly prominent. In conclusion, the CAM assay represents a very effective and versatile *in vivo* model for several preclinical studies, as it is able to complement *in vitro* assays before proceeding to experiments with mammalian models, which shows its potential as an alternative method to the use of animals for scientific purposes.

Keywords: Chorioallantoic membrane. 3Rs Principle. Literature review. Angiogenesis. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Coelhos submetidos ao teste de irritação ocular de Draize	18
Figura 02 – Embrião de galinha e estruturas extraembrionárias associadas	26
Figura 03 – Representação esquemática da organização das estruturas extraembrionárias no ovo de galinha e os epitélios que revestem a estrutura da CAM	27
Figura 04 – Desenvolvimento gradual da disposição dos vasos sanguíneos na CAM	28
Figura 05 – Etapas de cultivo do embrião de galinha em sistema <i>in ovo</i>	34
Figura 06 – Etapas de cultivo do embrião de galinha em sistema <i>ex ovo</i>	35
Figura 07 – Design do ovo artificial desenvolvido para o cultivo do embrião <i>in vitro</i>	37
Figura 08 – Diferentes métodos para investigar a indução de efeitos vasculares na CAM	39
Figura 09 – Indução de angiogênese utilizando uma matriz avascular no ensaio CAM	43
Figura 10 – Cultivo de células e tumores cancerígenos enxertados na CAM	45
Figura 11 – Osso humano regenerado e integrado à vasculatura da CAM	47
Figura 12 – Representação esquemática do teste HET-CAM	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Número de artigos publicados entre os anos de 1980 e 2018 relacionados aos ensaios com a membrana corioalantoide	56
Gráfico 02 – Número de publicações relativas ao ensaio CAM por país	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Número estimado de animais utilizados em pesquisas científicas por país anualmente	17
Tabela 02 – Métodos alternativos com aceitação regulatória internacional reconhecidos pelo CONCEA e suas respectivas referências no Guia de Teste da OECD	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs	Substituição, redução e refinamento
3T3 NRU	Ensaio de captação do vermelho neutro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Ensaio de permeabilidade e opacidade da córnea bovina
BraCVAM	Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos
CAM	Membrana corioalantoide
CAM-TBS	Ensaio da membrana corioalantoide com azul de tripan
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DL ₅₀	Dose letal média
ECVAM	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
HET-CAM	Ensaio da membrana corioalantoide do embrião de galinha
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interagências para Validação de Métodos Alternativos
ICE	Ensaio do olho isolado de galinha
JaCVAM	Centro Japonês para Validação de Métodos Alternativos
KoCVAM	Centro Coreano para Validação de Métodos Alternativos
LLNA	Ensaio do linfonodo local
MTT	Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
ONGs	Organizações não-governamentais
PDcE	<i>Patient-derived chicken egg tumor model</i>
RBC	Teste de hemólise (<i>Red Blood Cell</i>)
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RhCE	Epitélio corneal humano reconstruído
rLLNA	Versões não-radioativas do ensaio do linfonodo local
TER	Teste de resistência elétrica transcutânea
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Experimentação animal	16
2.2	Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório	19
2.2.1	<i>Validação de métodos alternativos</i>	21
2.3	Embrião de galinha como modelo experimental	24
2.4	Membrana corioalantoide (CAM)	25
2.4.1	<i>Estrutura e desenvolvimento embrionário</i>	25
2.4.2	<i>Funções fisiológicas</i>	29
2.5	Ensaio da membrana corioalantoide	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	METODOLOGIA	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Metodologia experimental	33
5.1.1	<i>Método in ovo</i>	34
5.1.2	<i>Método ex ovo</i>	35
5.1.3	<i>Plataformas 3D artificiais</i>	36
5.2	Vantagens e limitações	37
5.3	Aplicações do ensaio CAM	41
5.3.1	<i>Moléculas pró e antiangiogênicas</i>	42
5.3.2	<i>Crescimento de tumores e metástase</i>	44
5.3.3	<i>Engenharia de tecidos e transplantes</i>	46
5.3.4	<i>Produção de medicamentos</i>	49
5.3.5	<i>Estudos toxicológicos</i>	50
5.4	Aspectos éticos	52
5.5	Perspectivas futuras	54
5.5.1	<i>Processo de validação no Brasil e no mundo</i>	54
5.5.2	<i>Tendência crescente no número de estudos publicados</i>	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A experimentação animal tem servido, ao longo de muitos anos, como um meio de se determinar a eficácia e a segurança de produtos, nas mais diversas áreas. Diferentes técnicas que utilizam modelos *in vivo* são importantes em pesquisas experimentais por contribuir para o conhecimento humano e esclarecer diferentes questões biológicas e biomédicas (FERNANDES; PEDROSO, 2017). Entretanto, para que essas práticas sejam realizadas, vários fatores devem ser considerados, incluindo suas limitações metodológicas e seu alto custo de manutenção. Além disso, a preocupação com o bem-estar dos animais utilizados em experimentos trouxe um maior foco nos aspectos éticos relacionados a esta prática (ANDERSEN; WINTER, 2019). Assim, tem-se observado uma tendência global em minimizar o uso de animais na pesquisa científica, principalmente com o advento do princípio dos 3Rs (do inglês, Substituir, Reduzir e Refinar) (ÁVILA; VALADARES, 2019).

A partir de esforços constantes para buscar novos modelos experimentais baseados nesses preceitos, uma série de métodos alternativos foram propostos para melhorar a produtividade e eficiência de estudos pré-clínicos. No entanto, modelos *in vivo* filogeneticamente mais próximos de humanos, que sejam bem estabelecidos e caracterizados, ainda são necessários para uma melhor previsão das funções fisiológicas relevantes para a pesquisa biomédica (BJØRNSTAD *et al.*, 2015). Portanto, seria vantajoso desenvolver modelos adicionais que, na fase exploratória inicial de estudos científicos, pudessem auxiliar na redução do número de animais necessários para a realização de experimentos.

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no interesse pelo ensaio da membrana corioalantoide do embrião de galinha (CAM) e no seu uso para elucidação de diversos processos biológicos. A razão para isso se deve ao fato de que esse modelo fornece uma maneira simples, rápida e eficaz de estudar sistemas biológicos complexos com tecidos vasculares bem desenvolvidos, já que a CAM é caracterizada por uma estrutura rica em vasos sanguíneos e linfáticos, mimetizando o ambiente *in vivo* de outros organismos (KUE *et al.*, 2015; LOKMAN *et al.*, 2012).

A CAM é uma membrana extraembrionária que se forma por meio da fusão do córion com o alantoide durante o desenvolvimento do embrião, efetuando diversas funções fisiológicas durante esse processo, principalmente trocas gasosas e de nutrientes (YUAN *et al.*, 2014). Devido à sua composição altamente vascularizada, este sistema tem sido amplamente utilizado em estudos elucidativos sobre angiogênese e a atividade de substâncias na vascularização de tecidos, pois é possível observar diretamente esses efeitos vasculares de

maneira dinâmica e *in vivo* (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014). A visibilidade, acessibilidade e rápido crescimento da CAM oferecem vantagens únicas para a análise de funções vasculares. Desse modo, o método pode ser aplicado em diversas áreas científicas, como bioengenharia, oncologia, farmacologia e toxicologia (AVRAM *et al.*, 2017).

Nesse contexto, as diferentes análises que podem ser realizadas com a CAM reforçam o interesse pela aplicação deste modelo em pesquisas rotineiras, de forma confiável e reproduzível. Além disso, em relação à ética animal, experimentos que utilizam embriões aviários parecem ser eticamente mais toleráveis do que aqueles realizados com modelos mamíferos (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015). Portanto, o ensaio CAM pode servir como um modelo alternativo bastante eficaz para estudos preliminares, contribuindo para a redução do número de animais usados em experimentos.

Devido à crescente utilização e reconhecimento do ensaio CAM pela comunidade científica, torna-se necessário investigar mais profundamente sua relevância, aplicabilidade e validação científica, visto que este modelo representa uma alternativa promissora à experimentação *in vivo* tradicional. Assim, neste trabalho, será apresentada uma revisão bibliográfica narrativa sobre o método da CAM, trazendo uma discussão sobre o uso do ensaio no meio científico e abordando suas características metodológicas, vantagens, limitações, aplicações e, por fim, seu potencial como modelo experimental *in vivo* alternativo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Experimentação animal

A utilização de animais para fins científicos configura uma prática histórica na civilização humana, havendo relatos desde a Antiguidade (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016). Inicialmente, essas atividades eram executadas no intuito de produzir conhecimentos sem necessariamente obedecer a quaisquer métodos sistematizados de rigor científico (PARODI, 2009). No entanto, com o passar dos anos, além de serem utilizados para investigar princípios biológicos básicos, os animais se tornaram uma ferramenta fundamental para o avanço da área da saúde humana, promovendo uma melhor compreensão de conceitos sobre anatomia, fisiologia, patologia e farmacologia. A possibilidade de realizar experimentos em ambientes controlados e mimetizar condições fisiológicas específicas motivou o desenvolvimento de diversos métodos científicos neste âmbito e levou à criação do conceito de modelos experimentais *in vivo* (ANDRADE *et al.*, 2019; ANDERSEN; WINTER, 2019; GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016).

Muitos animais podem ser utilizados como modelos experimentais, como insetos (*Drosophila*), nematoides (*Caenorhabditis elegans*), peixes (*Danio rerio*) e sapos (*Xenopus*), porém, em geral, a maioria equivale a espécies mamíferas, principalmente roedores, coelhos, cães e macacos, devido à sua maior proximidade filogenética com humanos (ANDERSEN; WINTER, 2019). Dentre estes, coelhos, ratos e camundongos são os animais mais comumente usados em pesquisas científicas, configurando quase 80% da totalidade de modelos experimentais disponíveis (ADLER *et al.*, 2011, FERNANDES; PEDROSO, 2017).

Estima-se que, em todo o mundo, cerca de 14 bilhões de dólares sejam gastos em experimentos *in vivo* por ano, exigindo o uso de mais de 192 milhões de animais de laboratório (MEIGS *et al.*, 2018; TAYLOR; ALVAREZ, 2019). Destes, aproximadamente 65% são utilizados em pesquisa básica e biomédica, 14% em controle de qualidade e segurança de produtos e 9% em testes de toxicidade (ADLER *et al.*, 2011). Um estudo recente realizado por Taylor e Alvarez (2019) apresentou o número estimado de animais utilizados para fins científicos de alguns países anualmente, de acordo com a Tabela 1. Os dados encontrados pelos autores demonstraram que, em 10 anos, houve um aumento de 36,9% na quantidade de procedimentos *in vivo* em pesquisas, o que é preocupante, principalmente no que diz respeito às suas características insustentáveis e o impacto socioeconômico dessa prática.

Tabela 1 – Número estimado de animais utilizados em pesquisas científicas por país anualmente.

Países	Estimativa em milhões*
China	20.496.670
Japão	15.033.305
Estados Unidos	14.574.839
União Europeia	8.247.326
Canadá	3.570.352
Austrália	3.248.483
Coreia do Sul	3.110.998
Reino Unido	2.586.942
Brasil	2.179.621
Noruega	1.328.080

*Dados consideram ratos, camundongos, macacos, cachorros, peixes, aves, anfíbios, répteis e cefalópodes. Fonte: Taylor e Alvarez (2019).

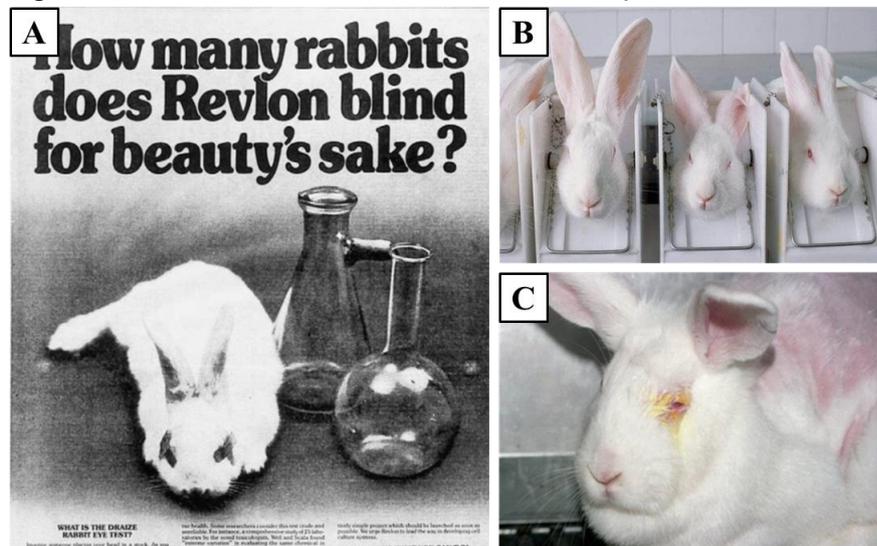
Além de ser uma prática que gera despesas elevadas, a experimentação animal em atividades científicas acarreta temáticas bastante controversas, tendo em vista que, muitas vezes, ela envolve procedimentos invasivos. Por exemplo, nas últimas décadas, ensaios toxicológicos aplicados no controle de qualidade de formulações farmacológicas e substâncias químicas – como os testes *in vivo* para detecção de contaminantes pirogênicos, testes para determinar a dose letal média (DL₅₀) em ratos e camundongos e os testes de irritação e corrosão cutânea e ocular em coelhos (testes de Draize) – têm sido questionados pelos grupos defensores do bem-estar animal por levarem ao sofrimento e sacrifício injustificado de um grande número de animais (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008; ANDRADE *et al.*, 2019).

Em 1959, com a publicação de "*The Principles of Humane Experimental Technique*", os autores Russell e Burch estabeleceram o Princípio dos 3Rs – cuja sigla em inglês significa *Replacement, Reduction, Refinement* –, que se tornou um dos principais marcos para a discussão sobre a bioética na experimentação animal (RUSSELL; BURCH, 1959). Cada “R” representa um preceito para o uso ético de animais na pesquisa: (1) substituição, o principal objetivo, remete à busca de modelos experimentais alternativos, ao invés do uso de testes *in vivo*; (2) redução consiste na execução de diferentes estratégias que utilizem o mínimo possível de animais, mas sem causar a perda de informações relevantes para a pesquisa; e, por fim, (3) refinamento, ou seja, aplicação de métodos que evitem o sofrimento e o estresse animal (ANDERSEN; WINTER, 2019; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Durante o século XIX, o uso de animais em pesquisas científicas foi se intensificando, ao mesmo tempo em que leis de regulamentação voltadas especificamente para as práticas vivisseccionistas ainda eram inexistentes. Isso gerou muitas preocupações

relacionadas aos aspectos legais e éticos para a realização dessas práticas, o que despertou conflitos entre a comunidade científica e os grupos defensores da regulamentação dos direitos animais (LIRA *et al.*, 2016). Como consequência do aumento da pressão pública sobre essas questões, durante a década de 1980, a indústria de cosméticos foi uma das mais atacadas por ONGs e diversos segmentos da sociedade, apontando os testes de Draize (Figura 1) como os maiores alvos de críticas. Ativistas passaram a boicotar empresas de cosméticos que realizavam testes em coelhos para análises toxicológicas de seus produtos como forma de protesto. Isso levou a uma diminuição considerável do número de animais utilizados no processo de avaliação de segurança de cosméticos em vários países (CRUZ; ANGELIS, 2012; HOLDEN, 1989).

Figura 1 – Coelhos submetidos ao teste de irritação ocular de Draize.



(A) Cartaz de protesto contra o teste de Draize; (B) Coelhos presos em suportes restritivos para que não possam fugir ou limpar os olhos; (C) Danos oculares causados por agentes severamente corrosivos. Fonte: Adaptado de Wilhelmus (2001) e Walters (2015).

Esse cenário evidenciou a necessidade de regulamentar o uso de animais em pesquisas científicas, impondo regras a essa prática, de forma a evitar ou impedir atos de crueldade e de maus-tratos em animais utilizados em experimentações e promover o aprimoramento dos aspectos metodológicos e éticos de estudos científicos. Em diversos países, foi crescente a preocupação com o estabelecimento de leis que incluíssem critérios de bem-estar animal, modos de experimentação para diferentes objetivos e proibições quanto ao seu uso em larga escala (LIRA *et al.*, 2016). Nesse contexto, as primeiras leis voltadas para a regulamentação dos direitos de animais utilizados em pesquisa começaram a surgir no mundo.

Durante esse período, verificou-se um aumento crescente da propagação de debates acerca do impacto ético, social e econômico de pesquisas científicas envolvendo testes *in vivo*

a nível internacional. Isso também motivou a discussão sobre tais considerações no Brasil, que se consolidou na criação da Lei 11.794/2008, também conhecida como “Lei Arouca”. Essa lei instituiu o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), responsável por regulamentar o uso de animais para fins científicos no país (PRESGRAVE *et al.*, 2016). A partir disso, toda e qualquer pesquisa que envolva a criação, a manutenção e o manuseio de animais de laboratório deverá ser previamente aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs), estabelecidas para cada instituição de pesquisa do país (ÁVILA; VALADARES, 2019; FERNANDES; PEDROSO, 2017).

Hoje, o Princípio dos 3Rs é universal para a comunidade científica, orientando a conduta de diversos países quanto à utilização de animais em pesquisa e encorajando o pensamento ético e a valorização do conceito de bem-estar animal em vários segmentos da sociedade. De forma geral, a maioria dos pesquisadores concorda que os testes em animais devem ser realizados quando não houver alternativas eficazes disponíveis, desde que sejam realizados sob regulamentos estritos (KEHINDE, 2013). Além disso, a utilização de animais deve, obrigatoriamente, seguir os preceitos do rigor científico e da ética que norteiam os delineamentos experimentais e as normas recomendadas internacionalmente, de forma a contribuir para o refinamento dos métodos disponíveis e a diminuição do sofrimento a que possam ser submetidos durante a realização de ensaios (FERNANDES; PEDROSO, 2017).

2.2 Métodos alternativos ao uso de animais de laboratório

No passado, a experimentação *in vivo* com modelos mamíferos foi uma grande aliada da humanidade para o avanço das ciências básicas. No entanto, com a evolução tecnocientífica, estes deixaram de ser a primeira opção para vários ensaios biológicos e avaliações pré-clínicas, se tornando insustentáveis por vários motivos, dentre eles, seu alto custo, pequena capacidade preditiva e de reprodutibilidade e seus dilemas éticos (STRICKLAND *et al.*, 2016). Portanto, os avanços científicos começaram a se relacionar à busca por modelos mais eficazes que levassem em consideração a fisiologia do corpo humano e a fisiopatologia de reações induzidas física e quimicamente (HARTUNG, 2017). Devido ao gasto excessivo em pesquisas científicas, isso reforçou a necessidade de aprimorar os métodos experimentais disponíveis até então.

Visando adaptar o princípio dos 3Rs, grandes investimentos têm sido aplicados no desenvolvimento de novas metodologias relevantes para a pesquisa biomédica, principalmente para investigar mecanismos fisiopatológicos, validar novos medicamentos e fornecer

informações sobre toxicidade de substâncias químicas (FERNANDES; PEDROSO, 2017). Além de melhorias promovidas pelo refinamento de modelos *in vivo*, tem-se visto um grande esforço por parte dos cientistas para encontrar abordagens alternativas que substituam ou minimizem o uso de animais em pesquisa. De fato, nos últimos anos, ocorreram mudanças drásticas no campo da toxicologia experimental, principalmente com o desenvolvimento das metodologias *in vitro*. Os testes *in vivo* em mamíferos passaram a ser considerados antiquados em comparação com os métodos *in vitro*, os quais apresentaram a possibilidade de obter resultados bem mais relevantes e eficientes (ÁVILA; VALADARES, 2019).

Nessa perspectiva, a ciência moderna, por sua vez, agora objetiva a ampla utilização de metodologias alternativas que se mostrem vantajosas em termos de redução de custos, questões éticas e facilidade de incorporação por outros laboratórios e que apresentem resultados mais confiáveis e preditivos do que os obtidos em ensaios *in vivo* convencionais (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008). No contexto do Brasil, conforme Decreto 6.899/09, que regulamenta a Lei 11.794/08, os métodos alternativos são caracterizados por:

Procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que não utilizem animais, usem espécies de ordens inferiores, empreguem menor número de animais, utilizem sistemas orgânicos *ex vivo* ou diminuam ou eliminem o desconforto (BRASIL, 2009).

Já existem grandes avanços nesse campo, os quais são resultados da promoção de legislações específicas, pesquisas inovadoras e novas tecnologias, que se apropriaram do avanço científico e impulsionaram o desenvolvimento de novos métodos para substituir a experimentação animal (ÁVILA; VALADARES, 2019). Essas metodologias incluem modelos *ex vivo* que fazem uso de tecidos de animais mortos, ensaios de citotoxicidade baseados em cultivo celular *in vitro*, modelos organotípicos, de tecidos reconstituídos e de órgãos isolados e técnicas *in silico* de bioinformática (BALLS; COMBES, 2017; CAZEDEY *et al.*, 2009).

Assim, com a tendência mundial de substituição do uso de animais, alguns setores industriais, especialmente de cosméticos, se tornaram mais avançados na busca de opções alternativas e pelo aperfeiçoamento das metodologias já existentes. Isso ficou ainda mais evidente desde que a Comunidade Europeia tornou obrigatória a adoção de metodologias alternativas à experimentação animal para a avaliação da segurança de produtos cosméticos (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015). Isso implicou na gradual substituição de alguns métodos tradicionalmente realizados em animais para este propósito, como o teste de Draize, por um conjunto de métodos alternativos reconhecidos e validados cientificamente, como, por

exemplo, os ensaios de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP), do olho isolado de galinha (ICE) e da membrana corioalantoide (HET-CAM) (CRUZ; ANGELIS, 2012).

No entanto, vale salientar que o uso de métodos alternativos nem sempre é possível, mesmo diante do avanço científico observado atualmente, pois ainda não existem meios de reproduzir de forma absoluta a complexidade das reações fisiológicas e interações celulares que ocorrem nos organismos de forma sistêmica (CANCIAN *et al.*, 2014; GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016). A maioria dos modelos alternativos consegue demonstrar vantagens com metodologias promissoras, mas não são capazes de identificar um único método que se mostre plenamente eficaz, aplicável e que venha substituir os testes *in vivo*, como é o caso do teste de Draize. Dessa forma, modelos *in vivo* devem ser utilizados sempre que não existam métodos alternativos válidos disponíveis que possam substituí-los ou, em casos específicos, após triagem com técnicas *in vitro* em estudos pré-clínicos (CANCIAN *et al.*, 2014).

2.2.1 Validação de métodos alternativos

Para que um método alternativo possa ser reconhecido e adotado oficialmente, é necessária a elaboração de estudos que avaliem sua relevância e reprodutibilidade. Portanto, ele precisa passar por diversas pesquisas colaborativas de validação para, posteriormente, ser publicado em compêndios oficiais e, finalmente, ser aceito por órgãos regulatórios internacionais, como a OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). Métodos que não tenham passado pelo processo completo de validação, mas para os quais existe quantidade de dados suficientes comprovando sua eficácia e confiabilidade, apesar de não possuírem aceitação regulatória, também podem servir como metodologias complementares para pesquisas, de acordo com critérios determinados pelos órgãos oficiais (ANVISA, 2012; PRESGRAVE *et al.*, 2016).

Diversos métodos alternativos que não utilizam modelos *in vivo* tradicionais se apresentam viáveis para aplicação em pesquisa, porém, muitos ainda não foram validados ou se encontram em diferentes estágios de validação. Embora possa parecer simples, este é um processo difícil e demorado, pois requer estudos rigorosos, que, por sua vez, demandam o envolvimento de várias instituições e laboratórios, a supervisão de pesquisadores capacitados e o investimento de muito dinheiro (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008; BALLS; COMBES, 2017). Os métodos devem ser submetidos a uma série de avaliações, tais como sua eficácia, segurança, reprodutibilidade, especificidade, sensibilidade e valor preditivo, antes que sejam eventualmente aceitos e validados pelas agências regulatórias de forma efetiva (KNOP;

MARIA, 2016).

Alguns países, percebendo a complexidade desse processo, já contam com centros especializados, criados exclusivamente para avaliação de novos métodos alternativos, para que o uso dos mesmos seja regulamentado (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Dentre estas instituições, cabe citar algumas com maior relevância internacional: ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*), JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) e KoCVAM (*Korean Center for the Validation of Alternative Methods*), representando Estados Unidos, União Europeia, Japão e Coreia do Sul, respectivamente (PRESGRAVE *et al.*, 2016). Esses centros têm como objetivo principal promover, coordenar, revisar, supervisionar e financiar estudos que levem em consideração o princípio dos 3Rs para o desenvolvimento, validação e regulamentação de métodos alternativos ao uso de animais. Eles também auxiliam na sua implementação e aceitação no mercado após o processo de validação (ÁVILA; VALADARES, 2019; BOTTINI *et al.*, 2008).

Como consequência do esforço por parte da comunidade científica no desenvolvimento de novas metodologias alternativas, existe hoje um número considerável de ensaios validados ou aceitos para fins regulatórios no mundo (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008). A maioria consiste em métodos *in vitro* relacionados a ensaios de toxicidade (DANESHIAN *et al.*, 2015). Tais métodos podem ser aplicáveis ao controle da qualidade de produtos e, em geral, possuem inúmeras vantagens quando comparados aos modelos *in vivo* que pretendem substituir, apresentando boa especificidade, sensibilidade, maior rapidez e precisão de resultados e melhor custo-benefício (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008).

No Brasil, o processo de validação de métodos alternativos segue as diretrizes estabelecidas pela OECD, ocorrendo por meio da colaboração de três entidades: o CONCEA, a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e o Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM). Estas instituições trabalham em conjunto para conduzir o processo de validação de métodos alternativos no país (ÁVILA; VALADARES, 2019). Assim, as metodologias mais promissoras, que tenham eficácia comprovada por outros órgãos regulatórios ou que já possuam aceitação internacional, podem passar por estudos de validação organizados pelo RENAMA e ser recomendadas pelo BraCVAM para que, por fim, sejam aceitas pelo CONCEA e implementadas oficialmente no Brasil (PRESGRAVE *et al.*, 2016).

Como resultado, esses órgãos já promoveram a validação de diversos métodos alternativos no país, que foram reconhecidos internacionalmente pela OECD ou descritos em Farmacopeias nacionais, como exposto na Tabela 2.

Tabela 2 – Métodos alternativos com aceitação regulatória internacional reconhecidos pelo CONCEA e suas respectivas referências no Guia de Teste da OECD.

Propósito	Método	Referência
Absorção cutânea	Absorção cutânea <i>in vitro</i>	OECD TG 428
Corrosividade	TER	OECD TG 430
	Epiderme Humana Reconstituída	OECD TG 431
Fototoxicidade	3T3 NRU	OECD TG 432
Genotoxicidade	Teste do Micronúcleo em células de mamíferos <i>in vitro</i>	OECD TG 487
Irritação cutânea	Pele e Epiderme Reconstituídas	OECD TG 439
Irritação ocular	BCOP	OECD TG 437
	ICE	OECD TG 438
	Permeação de Fluoresceína	OECD TG 460
	Teste de Curta Duração <i>in vitro</i>	OECD TG 491
	RhCE	OECD TG 492
Penetração cutânea	Barreira de Membrana <i>in vitro</i>	OECD TG 435
Pirogenicidade	Teste da endotoxina bacteriana	Farmacopeia Brasileira Art. 3º
Sensibilização cutânea	LLNA	OECD TG 429
	rLLNA	OECD TG 442A;B
	Ensaio de reatividade do peptídeo	OECD TG 442C
	Teste da luciferase ARE-Nrf2	OECD TG 442D
Toxicidade oral aguda	Estimativa da Dose Inicial	OECD TG 129
	Doses Fixas	OECD TG 420
	Classe Tóxica Aguda	OECD TG 423
	<i>Up-and-Down</i>	OECD TG 425
Toxicidade reprodutiva	Triagens de toxicidade reprodutiva/desenvolvimento	OECD TG 421; 422

Fonte: CONCEA (2016).

Alguns métodos alternativos validados podem substituir por completo o uso de animais, como, por exemplo, testes *in vitro* para detecção da presença de contaminantes pirogênicos ou modelos organotípicos para avaliação do potencial de irritação ocular (ALVES; COLLI, 2006). Em outras situações, a substituição plena ainda não é possível, como descrito anteriormente. No entanto, é importante destacar que toda pesquisa na área de métodos alternativos é válida e recomendada pelas agências regulatórias internacionais, visto que diversos estudos já geraram importantes contribuições em termos de refinamento das técnicas ou redução do número de animais utilizados (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008).

Entende-se que os métodos alternativos representam amplamente muitas áreas de conhecimento e abrangem não apenas aspectos éticos, mas também de desenvolvimento científico e inovação tecnológica (PRESGRAVE *et al.*, 2016). Assim, além de tentar validar novos métodos, cabe a comunidade científica o bom senso de excluir de seus compêndios oficiais metodologias obsoletas, que pouco contribuam no fornecimento de dados relevantes para a ciência e que utilizem um grande número de animais ou provoquem dor, angústia ou sofrimento aos mesmos.

Paralelamente, do ponto de vista do impacto econômico, para substituir, reduzir ou refinar tais modelos *in vivo* antiquados, é essencial que as exigências para a validação de quaisquer novos métodos alternativos sejam harmonizadas globalmente. A colaboração entre diferentes centros de validação localizados nas Américas, Ásia e Europa dedicados nesse aspecto é um fator positivo, pois, com isso, promove-se um maior diálogo entre essas instituições, envolvendo a comunidade científica internacional na busca para uma melhor compreensão e aceitação de modelos alternativos.

2.3 Embrião de galinha como modelo experimental

Há muitas décadas, pesquisadores da área de biologia do desenvolvimento e embriologia fazem o uso de espécies ovíparas para ter acesso aos estágios de formação embrionária, a fim de observar como ocorre o processo de maturação do embrião até sua eclosão. Dentre os vários modelos *in vivo* adotados para pesquisas experimentais, os embriões aviários, principalmente da espécie *Gallus domesticus*, se destacam como organismos que podem proporcionar informações cruciais sobre os processos de embriogênese e organogênese. Desde que Aristóteles começou a dissecar embriões de galinha por volta de 350 a.C., esse modelo tem contribuído substancialmente para nossa compreensão sobre os princípios básicos do desenvolvimento humano e importantes noções em imunologia, toxicologia e outras áreas da biomedicina (STERN, 2005; VARGAS *et al.*, 2007).

O embrião de galinha é um modelo experimental de referência, bem conhecido e estabelecido no meio científico e amplamente utilizado em estudos sobre os mecanismos morfológicos e moleculares do desenvolvimento embrionário (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; RASHIDI; SOTTILE, 2009). Mesmo sendo introduzido inicialmente como um sistema para a elucidação da biologia do desenvolvimento geral, hoje, o embrião de galinha também é utilizado para a testagem de agentes químicos relacionados aos processos de embriotoxicidade, teratogenicidade e toxicidade sistêmica, incluindo seus aspectos imunopatológicos e de vias

metabólicas (BJØRNSTAD *et al.*, 2015; SMITH; FLENTKE; GARIC, 2012).

Várias características do embrião de galinha o tornam um modelo animal de interesse para os cientistas. Além de existir uma extensa literatura sobre suas características, os embriões são fáceis de manipular, têm um tamanho conveniente e um curto tempo de incubação (21 dias), sendo acessíveis durante todo o período de desenvolvimento, e possuem baixo custo em comparação aos modelos mamíferos (DOHLE *et al.*, 2009; YALCIN *et al.*, 2010).

A escolha do embrião de galinha como modelo experimental também se baseia na uniformidade ontogênica substancial de todos os vertebrados, característica do primeiro estágio do desenvolvimento fetal (DAVEY; TICKLE, 2007). Além disso, ele é filogeneticamente mais próximo dos mamíferos do que, por exemplo, o peixe-zebra e os nematoides (BJØRNSTAD *et al.*, 2015). Desse modo, esse modelo se apresenta como um recurso cada vez mais popular na pesquisa biomédica.

2.4 Membrana corioalantoide (CAM)

2.4.1 Estrutura e desenvolvimento embrionário

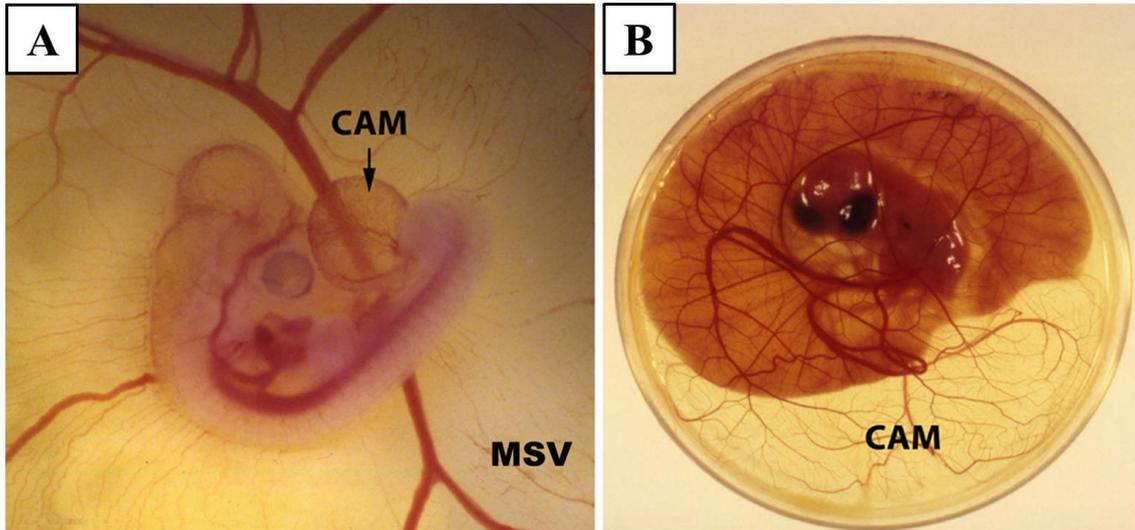
O ovo amniótico é uma estrutura complexa, química e fisicamente, reunindo em seu interior substâncias essenciais para o desenvolvimento do embrião. Seus componentes estruturais básicos são: casca, albumina (clara), vitelo (gema) e anexos extraembrionários (GILBERT, 1988). Após ser fecundado, o ovo precisa ser incubado e passar pelo processo de clivagem e formação dos folhetos germinativos para que, no proceder da formação embrionária, ocorra a modelação do embrião, assim como o surgimento das estruturas extraembrionárias (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001).

Durante a embriogênese, o ovo apresenta quatro membranas extraembrionárias: saco vitelino, âmnio, córion e alantoide, que circundam o embrião, mediando as trocas entre ele e o ambiente e proporcionando um meio aquoso ideal para o seu desenvolvimento dentro da casca. No caso das aves, após alguns dias de incubação, o alantoide começa a se estender a partir do intestino posterior endodérmico e se funde com o córion para criar a membrana corioalantoide (CAM), processo este dirigido pelo rápido aumento do volume da cavidade alantoica, o que promove a união dessas estruturas (RIBATTI *et al.*, 2001).

A formação da CAM ocorre em torno do 3º ou 4º dia do desenvolvimento embrionário, crescendo progressivamente até aderir à membrana interna da casca do ovo e envolver totalmente o embrião e demais estruturas embrionárias no 10º dia. Apenas mais

tardamente, no 13º dia de incubação, ocorre a completa diferenciação e definição das camadas teciduais que compõem a CAM (Figura 2) (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; SPURLIN; LWIGALE, 2013).

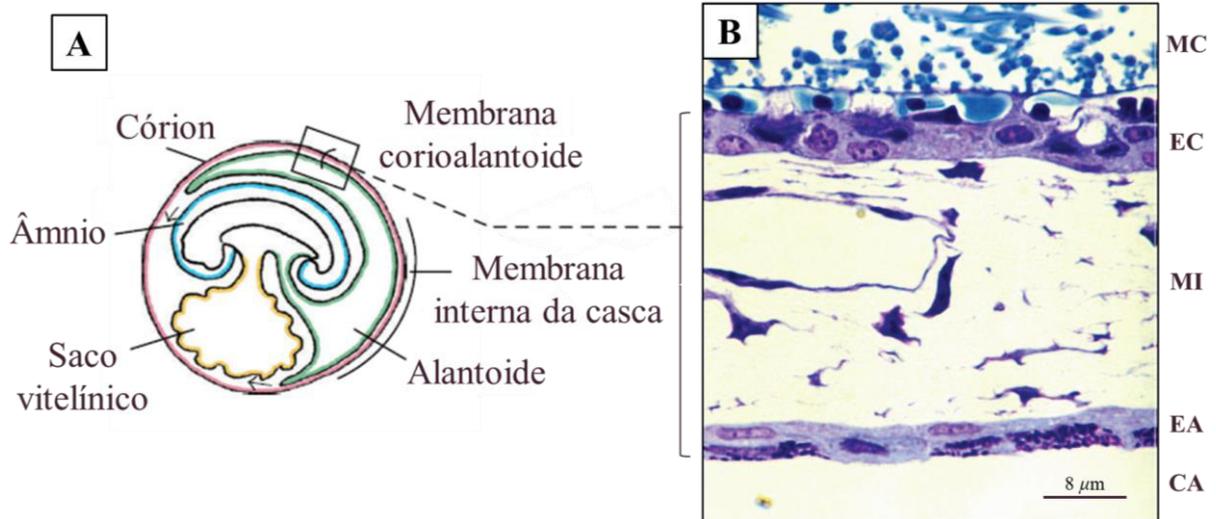
Figura 2 – Embrião de galinha e estruturas extraembrionárias associadas.



(A) Embrião no 4º dia após a fertilização, com destaque para a membrana corioalantoide (CAM) altamente vascularizada, que se expande a partir do intestino posterior endodérmico, e a membrana do saco vitelino (MSV) em segundo plano; (B) Embrião no 12º dia de incubação, apresentando crescimento significativo da CAM, que agora excede a área coberta pela gema. A MSV também está presente, mas se encontra sob o embrião e associada apenas à gema. Fonte: Nowak-Sliwinska, Segura e Iruela-Arispe (2014).

Histologicamente, a CAM consiste em três camadas derivadas de tecidos embrionários distintos: o epitélio coriônico ectodérmico, que está em contato direto com a membrana interna da casca; a mesoderme intermediária, rica em vasos sanguíneos e células estromais; e o epitélio alantoico endodérmico, que reveste a cavidade alantoica (Figura 3). De início avascular, a CAM adquire complexidade à medida que ganha rapidamente uma rica e extensa rede vascular, conectada à circulação embrionária por duas artérias e uma veia alantoica. É dentro da camada mesenquimal intermediária onde residem os vasos sanguíneos e linfáticos, intimamente associados às células epiteliais coriônicas que limitam a superfície da CAM com as membranas da casca do ovo e, portanto, o ambiente externo (GABRIELLI; ACCILI, 2010; MAKSIMOV; KOROSTYSHEVSKAYA; KURGANOV, 2006).

Figura 3 – Representação esquemática da organização das estruturas extraembrionárias no ovo de galinha e os epitélios que revestem a estrutura da CAM.



(A) Esquema representativo das estruturas extraembrionárias no ovo de galinha; (B) Fotomicrografia destacando os epitélios que compõem a CAM e limitam a camada central de mesênquima vascularizada, onde: MC) membrana interna da casca; EC) epitélio coriônico; MI) mesênquima intermediário; EA) epitélio alantoico; CA) cavidade alantoica. Coloração com azul de toluidina. Fonte: Adaptado de Gabrielli e Accili (2010).

A vasculatura da CAM sofre constantes remodelamentos e adaptações, de maneira que seja possível atender às crescentes necessidades metabólicas do embrião. De acordo com Schlatter *et al.* (1997), o desenvolvimento dessa membrana passa por três fases específicas para a formação da rede vascular. Durante a etapa inicial, múltiplos brotos capilares invadem o mesênquima e se agrupam, originando um plexo capilar primitivo. Na segunda fase, este plexo começa a ser substituído e remodelado, havendo brotamento e proliferação dos vasos pré-existentes. Já durante a fase tardia, a microvasculatura se amplia progressivamente até formar uma intrincada rede vascular constituída por diversas conexões intercapilares (RIBATTI, 2016).

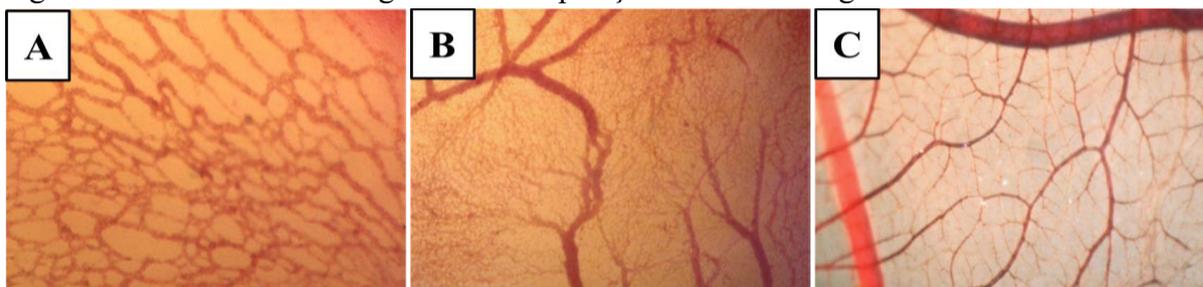
No ovo de galinha, durante as horas iniciais pós-fertilização, os primeiros vasos sanguíneos começam a se desenvolver, dando início ao processo de vasculogênese. Nesse período, os angioblastos, células precursoras do endotélio provenientes da parede mesodérmica do saco vitelino, começam a se diferenciar em ilhotas sanguíneas e se fundir, formando plexos capilares primitivos (Figura 4A). No 8º dia, a rede vascular ainda é imatura e restrita a pequenos capilares na camada mesenquimal, localizada logo abaixo das células epiteliais coriônicas (MELKONIAN *et al.*, 2002).

Em seguida, ocorre o início do processo de angiogênese, em que novos vasos sanguíneos são formados pela proliferação de células endoteliais, causando o alongamento dos vasos pré-existentes. A partir do 10º dia de incubação (Figura 4C), com o crescimento gradual do sistema vascular da CAM, que começa a se aproximar da superfície externa do córion, ocorre

a ramificação e remodelagem da rede capilar primária, em que os vasos de maior calibre dão origem a um sistema mais ramificado, formando rapidamente uma estrutura cada vez mais complexa, acompanhando, assim, o crescimento e a forma do embrião (BUSCHMANN; SCHAPPER, 1999). Durante esse período, ocorre um rápido aumento da quantidade de vasos mesodérmicos, que agora se diferenciam em arteríolas e vênulas, acompanhadas por um par de vasos linfáticos interconectados (CIMPEAN *et al.*, 2008).

Após o 14º dia, os capilares finalmente se posicionam em contato direto com o ectoderma coriônico e formam um plexo vascular amadurecido e intimamente associado à membrana interna da casca, o qual caracteriza a aparência altamente vascularizada da CAM (RIBATTI, 2017). Depois disso, no 18º dia de incubação, o sistema vascular atinge seu arranjo final, pouco antes do ovo chocar (AUSPRUNK; KNIGHTON; FOLKMAN, 1974; RIBATTI, 2017).

Figura 4 – Desenvolvimento gradual da disposição dos vasos sanguíneos na CAM.



(A) Plexo vascular primitivo, no 3º dia pós-fertilização; (B) Remodelação, crescimento e ramificação vascular durante o 7º dia de incubação; (C) Estruturas vasculares e vasos sanguíneos totalmente diferenciados observados a partir do 10º dia do desenvolvimento embrionário. Fonte: Adaptado de Nowak-Sliwinska, Segura e Iruela-Arispe (2014).

Vários fatores estão envolvidos na indução da vascularização da CAM, que inclui mecanismos de adesão, proliferação e diferenciação das células endoteliais e sua interação com as células mesodérmicas. Esse processo é articulado pela atuação de mediadores químicos, principalmente os fatores de crescimento FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico-2) e VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular-A) (BAUM *et al.*, 2010; RIBATTI, 2016; SCHLATTER *et al.*, 1997). Além disso, a matriz extracelular da CAM também modifica sua composição durante o desenvolvimento embrionário, produzindo uma maior quantidade de proteínas estruturais, como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, e de glicosaminoglicanos, o que favorece o processo de angiogênese que ocorre no espaço entre o epitélio coriônico e os vasos sanguíneos (CORDEIRO; HINCKE, 2016; RIBATTI *et al.*, 1998).

2.4.2 Funções fisiológicas

A CAM desempenha diversas funções cruciais para o desenvolvimento embrionário das aves. É o local onde ocorrem trocas gasosas, reabsorção de água, regulação e equilíbrio de eletrólitos no embrião. Todas essas funções são realizadas por seu epitélio, que, por meio de sua diferenciação estrutural e molecular, se torna um tecido transportador de moléculas altamente especializado (GABRIELLI; ACCILI, 2010).

Logo nos estágios embrionários iniciais, a membrana já começa a se tornar um órgão respiratório, realizando trocas gasosas com o ambiente através da sua complexa rede de capilares na área vascular mesodérmica (RIBATTI, 2016; SILVA *et al.*, 2014). Com a progressão da vasculogênese e o posicionamento do alantoide próximo à superfície porosa da casca do ovo, o qual permite um maior contato entre o embrião e o ar do meio externo, a função respiratória da CAM se estabelece completamente (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014). Mais tarde, com o amadurecimento do embrião, a membrana e sua rede de vasos sanguíneos associados se degeneram e a atividade respiratória é gradualmente assumida pelos pulmões (MAKSIMOV; KOROSTYSHEVSKAYA; KURGANOV, 2006).

Além do intercâmbio respiratório de oxigênio e gás carbônico, a CAM está envolvida na reabsorção de água e eletrólitos (sódio e cloreto) a partir do seu epitélio alantoico. Como a cavidade alantoica é o local de armazenamento de resíduos urinários que são excretados pelo embrião, principalmente ureia e ácido úrico, a CAM serve como reservatório dos produtos residuais e potencialmente tóxicos que serão posteriormente excretados, atuando como um filtro seletivamente permeável (GABRIELLI *et al.*, 2003; GABRIELLI; ACCILI, 2010).

Já o epitélio coriônico da CAM representa a primeira barreira celular entre a casca do ovo e a circulação embrionária; portanto, ele compreende a região onde alguns dos principais processos fisiológicos de transporte iônico transepitelial ocorrem. Nessa perspectiva, a CAM também assume um papel essencial para o balanço ácido-básico do organismo, regulando o pH intracelular e a secreção de ácido e contribuindo com a homeostase do embrião como um todo (GABRIELLI; ACCILI, 2010).

Por fim, a membrana ainda é responsável pela mobilização de cálcio (Ca^{2+}) a partir da casca do ovo. Durante o desenvolvimento embrionário, o Ca^{2+} que se encontra na casca deve ser reabsorvido e transferido para o embrião a fim de promover a mineralização e formação óssea (CORDEIRO; HINCKE, 2016; TUAN *et al.*, 1986). Por meio dos mecanismos de regulação iônica, ocorre a geração de gradientes elétricos que servem como força motriz para o transporte e reabsorção de cálcio através da CAM (GABRIELLI; ACCILI, 2010).

2.5 Ensaio da membrana corioalantoide

A membrana corioalantoide do embrião de galinha tem servido como uma plataforma de estudos *in vivo* por mais de 100 anos, se tornando um modelo de interesse para a pesquisa científica por causa de sua composição e função, bem como a complexidade de sua densa rede capilar. Com a rápida expansão de seu sistema vascular e sua fácil manipulação, hoje, a CAM é amplamente utilizada como um instrumento para estudos sobre diversos processos biológicos, principalmente angiogênese e efeitos vasculares (RIBATTI, 2016; YUAN *et al.*, 2014). Essa membrana, com sua estrutura altamente vascularizada, é capaz de simular sistemas *in vivo* mais complexos, induzindo respostas semelhantes aos ensaios baseados em células e em animais (LOKMAN *et al.*, 2012).

O primeiro relato do uso dessa membrana em experimentos é de 1911, quando Murphy e Rous demonstraram que a CAM pode servir como modelo xenográfico para o estudo de tumores (MURPHY; ROUS, 1912). A partir de 1930, a CAM começou a ser explorada pela primeira vez para o cultivo de vírus e bactérias, como forma de investigar seus mecanismos de infecção e desenvolver vacinas (GOODPASTURE; WOODRUFF; BUDDINGH, 1931; MOORE, 1942). A aplicação desse modelo em questões relacionadas a respostas vasculares só ocorreu após muitos anos, mas rapidamente se expandiu e ganhou reconhecimento no meio científico. Um dos primeiros estudos que adotaram o modelo CAM neste campo foi realizado por Leighton e colaboradores (1985), que perceberam que a membrana também pode ser utilizada para análises toxicológicas como método de substituição aos testes tradicionais de irritação ocular que utilizam a córnea de coelho.

Assim, ao longo das décadas, o interesse pelo estudo da CAM de embriões de galinha motivou o desenvolvimento de trabalhos em diversos campos de pesquisa, na tentativa de relacionar as diferentes funções vasculares da CAM e de identificar componentes moleculares e mecanismos pelos quais essas funções são realizadas, principalmente as relacionadas ao processo de angiogênese (NARBAITZ, 1995). Desde então, tem sido observada uma série de estudos que aplicam esse modelo na pesquisa biomédica.

Na literatura, o uso da membrana corioalantoide em pesquisa geralmente é referido como “ensaio CAM” ou “modelo CAM”, sendo considerado um sistema organotípico. Esses tipos de ensaio geralmente são utilizados como etapa intermediária entre as análises *in vitro* e os testes pré-clínicos com modelos *in vivo* mamíferos (BAIGUERA; MACCHIARINI; RIBATTI, 2012; KANCZLER *et al.*, 2017), o que reforça a ideia de que esse modelo representa uma alternativa potencial para testes com animais de laboratório.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão bibliográfica sobre o uso do ensaio da membrana corioalantoide (CAM) como modelo alternativo à experimentação animal.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar um recorte comparativo do ensaio CAM com os modelos *in vivo* comumente utilizados em ensaios pré-clínicos, mostrando sua eficiência para a elucidação de variados processos fisiológicos, como angiogênese e efeitos vasculares;
- Descrever protocolos distintos do ensaio CAM, discutindo suas vantagens e limitações;
- Analisar possíveis aplicações científicas da técnica da CAM, a fim de buscar diferentes métodos para a utilização do modelo em delineamentos experimentais;
- Discorrer sobre o cenário atual de trabalhos relativos ao uso do ensaio CAM, com o intuito de investigar o desenvolvimento de tais estudos a nível nacional e internacional.

4 METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão narrativa de literatura, de caráter descritivo e bibliográfico, que se propõe a analisar e descrever sobre o tema a partir dos estudos elaborados por outros autores, sob ponto de vista teórico ou conceitual. É constituída por uma análise ampla da literatura científica na interpretação e análise crítica do autor, sem estabelecer uma metodologia rigorosa e replicável em nível de reprodução de dados e respostas quantitativas para questões específicas (VOSGERAU; ROMANOWSK, 2014). No entanto, é fundamental para a aquisição e atualização do conhecimento sobre determinadas temáticas, evidenciando novas ideias, métodos e subtemas que têm recebido maior ou menor ênfase na literatura selecionada (ROTHER *et al.*, 2007).

O processo de coleta do material foi realizado de forma não sistemática no período de junho a setembro de 2020. Foi realizado um levantamento bibliográfico em periódicos nas bases de dados científicas *Scielo* e *Pubmed*. Para traçar um direcionamento nas buscas, estas foram realizadas a partir da combinação dos seguintes termos, em inglês e português: “membrana corioalantoide”, “modelo CAM”, “ensaio CAM”, “métodos alternativos”. O banco de dados foi sendo complementado com materiais indicados e referenciados na literatura, destacando aqueles que responderam aos objetivos propostos por este estudo. Por fim, foram selecionados materiais publicados entre os anos de 1990-2020, que foram lidos na íntegra, categorizados e analisados criticamente.

A partir disso, foi realizada uma descrição detalhada sobre as características metodológicas do ensaio CAM, apresentando protocolos de cultivo distintos, bem como as vantagens e limitações deste sistema experimental, comparando-o com outros modelos *in vivo* comumente utilizados em pesquisas. Além disso, foram revisadas algumas das aplicações mais relevantes deste método, identificando trabalhos disponíveis na literatura como base para sua descrição e exemplificando as diferentes linhas de pesquisa e métodos utilizados em cada um. Por fim, foi feito um esboço sobre as principais contribuições científicas e as perspectivas do uso e validação deste modelo no cenário nacional e internacional nos últimos anos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Metodologia experimental

Diversas variações na metodologia que utiliza a CAM como modelo experimental estão disponíveis na literatura, porém todas envolvem basicamente a aplicação de algum material ou substância em sua superfície ou diretamente na vasculatura. O tipo de experimento a ser realizado direciona a escolha do protocolo, que depende de alguns fatores, como o método de cultivo dos embriões, o cronograma experimental, a forma de administração do produto testado e o método de análise das respostas vasculares (NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018).

O ensaio CAM pode ser realizado com ovos de qualquer raça de galinha que estejam livres de contaminação de patógenos que possam afetar o embrião. Em geral, a limpeza superficial com etanol 70% ou água destilada é eficaz em eliminar resíduos de sujeira e microrganismos que estejam aderidos à casca (EJAZ *et al.*, 2006; TOMCZYK *et al.*, 2018). Entretanto, como apontado por Kunz e colaboradores, uma alta taxa de mortalidade é observada com o uso excessivo de desinfetantes, devido à permeabilidade da casca do ovo, então sua aplicação deve ser controlada. A viabilidade dos embriões pode ser examinada ao aproximar o ovo de uma fonte de luz – como a casca do ovo é semitransparente, identifica-se a posição do embrião e os vasos sanguíneos da CAM – ou ao abrir a casca e visualizar o sistema circulatório funcional na CAM (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; DÜNKER; JENDROSSEK, 2019).

A princípio, os ovos embrionados, preparados de acordo com Hamburger e Hamilton (1951), são colocados em uma incubadora e mantidos sob umidade constante de 60-70% a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. O tempo total de incubação do embrião de galinha é 21 dias, que corresponde a 46 estágios, de acordo com o sistema Hamburger-Hamilton (HH). Porém, na maioria dos estudos, a classificação da idade da CAM é referente ao número de dias de incubação durante o desenvolvimento embrionário (BJØRNSTAD *et al.*, 2015). Esse período pode variar de acordo com a natureza do procedimento, porém, a maioria dos protocolos que utilizam a CAM são limitados a estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, antes que períodos críticos do processo de organogênese ocorram, os quais podem causar diferentes respostas fisiológicas ou vasculares (SPURLIN; LWIGALE, 2013). A fase exponencial do crescimento vascular da CAM ocorre entre os dias 7 a 11 de incubação, portanto, este é o momento ideal para a aplicação de substâncias ou enxertos com o intuito de avaliar seus efeitos associados à vasoatividade e angiogênese (AVRAM *et al.*, 2017; NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018).

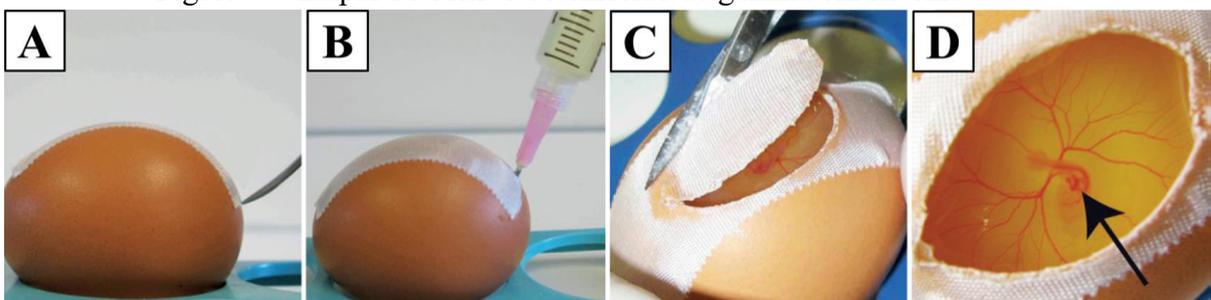
Além do tempo de incubação, os protocolos CAM também variam em outros parâmetros, como o método de cultivo dos embriões. As abordagens mais comumente empregadas para o ensaio CAM são os sistemas *in ovo* (dentro da casca do ovo) e *ex ovo* (embrião cultivado em um recipiente), cada um com suas vantagens e limitações.

5.1.1 Método *in ovo*

Considerada a metodologia mais clássica para ensaios biológicos associados à atividade vascular da CAM, esta técnica consiste em expor o interior do ovo, fazendo uma abertura na casca através da qual os vasos sanguíneos da CAM podem ser acessados *in situ*, e colocando um enxerto, implante ou substância sobre a membrana (TUFAN; SATIROGLU-TUFAN, 2005).

Neste método, os ovos de galinha são colocados em uma incubadora assim que a embriogênese começa, permanecendo sob rotação para prevenir a aderência do embrião nas membranas da casca. É ideal que se altere a posição dos ovos pelo menos três vezes ao dia, ou, se possível, utilizar rotadores automáticos para promover um movimento lento e constante dos ovos (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014). Geralmente no 3º dia de incubação, uma abertura é feita na casca do ovo ao redor da câmara de ar e a membrana interna é extraída para expor a CAM subjacente (Figura 5). Uma pequena quantidade de albumina também pode ser removida para permitir o crescimento ideal da CAM. A abertura é selada e os ovos continuam sendo incubados até o dia do experimento, que pode variar dependendo do propósito do estudo. Durante o ensaio, exames periódicos da área da CAM escolhida para o tratamento são realizados, que pode ser colhida posteriormente para análises bioquímicas e histológicas (NOWAK SLIWINSKA *et al.*, 2018; RIBATTI, 2018).

Figura 5 – Etapas de cultivo do embrião de galinha em sistema *in ovo*.



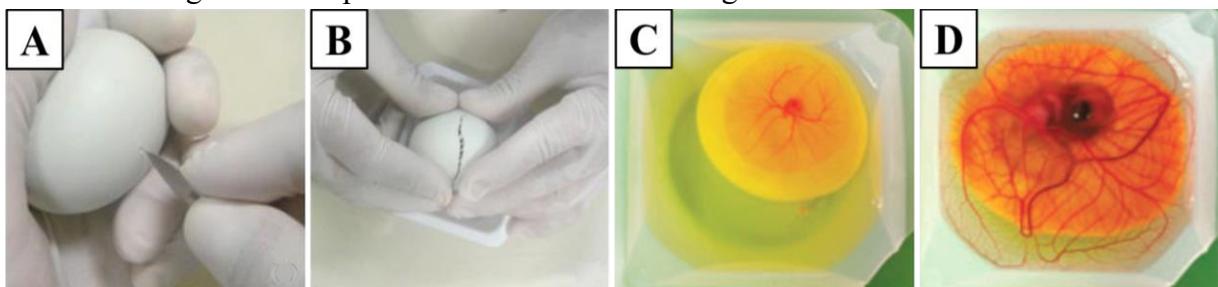
(A) Pequena abertura criada na extremidade do ovo acima da câmara de ar, durante o 3º dia de incubação; (B) Aspiração de albumina; (C) Alargamento da abertura na área delimitada pela fita adesiva para evitar que fragmentos da casca caiam sobre a membrana; (D) Viabilidade dos embriões e da CAM é identificada pelos vasos sanguíneos evidentes e o coração funcional (seta). Fonte: Adaptado de Aleksandrowicz e Herr (2015).

Com a técnica *in ovo*, é possível manter um ambiente fisiológico mais bem preservado, assim como permitir o desenvolvimento do embrião a longo prazo dentro do ovo, promovendo uma alta viabilidade durante todo o período de incubação, sem a necessidade do suporte de meios de cultura artificiais específicos ou requisitos especiais para as instalações de armazenamento (KALIRAI *et al.*, 2015). É também a metodologia encontrada na grande maioria dos artigos publicados, sendo o protocolo de escolha para trabalhos relacionados ao estudo da angiogênese, crescimento e metástase de tumores e transplante de enxertos (PRADO *et al.*, 2019; RIBATTI, 2016). Porém, neste sistema, a área da CAM disponível para manipulação é limitada e o registro das alterações induzidas durante o ensaio é mais difícil.

5.1.2 Método *ex ovo*

O modelo *ex ovo* do ensaio CAM foi relatado pela primeira vez por Auerbach *et al.* (1974) e consiste no cultivo do embrião e suas estruturas extraembrionárias fora do ambiente interno da casca. Na preparação do ensaio, ocorre transferência dos conteúdos do ovo nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário para um recipiente estéril, como uma placa de Petri ou uma barca de pesagem, de forma que seja possível o crescimento da CAM sobre sua superfície (Figura 6). Em seguida, o embrião é novamente incubado e, então, podem ser executadas as mesmas técnicas da metodologia *in ovo* já citada anteriormente (NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018). Todos os procedimentos devem ser realizados em um ambiente limpo, com instrumentos e materiais esterilizados (RIBATTI, 2018).

Figura 6 – Etapas de cultivo do embrião de galinha em sistema *ex ovo*.



(A) No 3º dia de desenvolvimento embrionário, o ovo é aberto com auxílio de uma lâmina de bisturi; (B) Embrião e suas estruturas extraembrionárias são transferidos cuidadosamente para barcas de pesagem de polipropileno estéreis; (C) Verifica-se a CAM em formação ao redor do embrião logo após a transferência; (D) Extensa rede vascular da CAM no 9º dia de incubação. Fonte: Adaptado de Egoshi *et al.* (2015) e Merckx *et al.* (2020).

Essa técnica possui algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais *in ovo*, pois ela facilita a testagem e manipulação de um maior número de amostras e possibilita uma

melhora na visibilidade, visto que uma área mais ampla da CAM pode ser exposta e ficar acessível para análises (RIBATTI, 2016; NAIK; BRAHMA; DIXIT, 2018). Tais benefícios têm tornado o modelo de cultivo *ex ovo* mais popular entre os pesquisadores nos últimos anos.

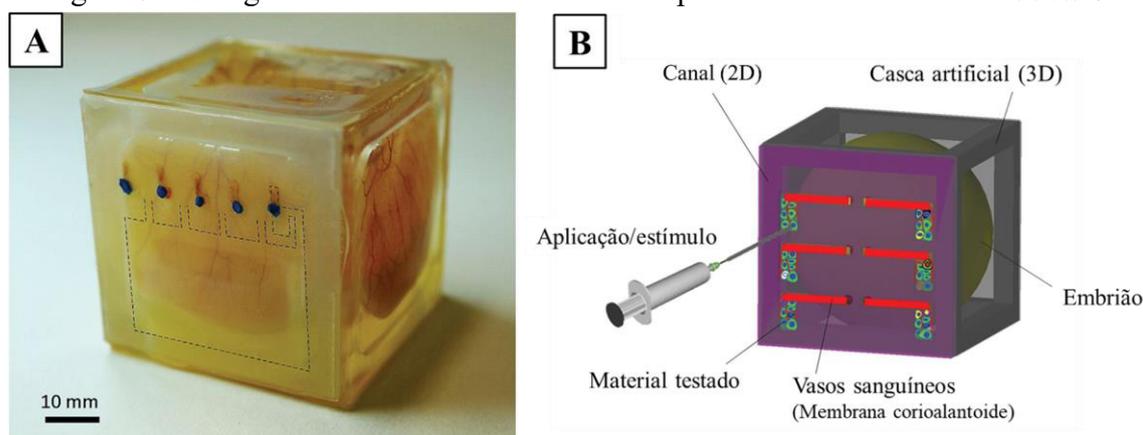
Por outro lado, a maior exposição da CAM em sistemas abertos é a causa de algumas das principais desvantagens desse método, relacionadas, principalmente, ao alto risco de contaminação e à baixa sobrevivência do embrião durante o processo. É necessário um controle mais rígido sobre o ambiente de incubação, caso contrário, pode haver um declínio da viabilidade dos embriões explantados (AUERBACH *et al.*, 1974; DOHLE *et al.*, 2009). Além disso, a transferência só é bem-sucedida quando não há danos a qualquer uma das estruturas embrionárias, particularmente o saco vitelino, que é extremamente propenso a se romper durante a abertura da casca (ONO, 2000). Assim, o período em que o embrião é retirado do ovo é crítico para sua sobrevivência, sendo ideal após 60-72 horas de incubação, uma vez que, neste estágio, o saco vitelino ainda não está totalmente aderido à CAM (DOHLE *et al.*, 2009).

5.1.3 Plataformas 3D artificiais

Um dos modelos mais recentes que utilizam a CAM como ferramenta elucidativa para estudos sobre angiogênese foi descrito por Huang e colaboradores (2017). Neste trabalho, os autores elaboraram uma técnica que projeta a formação e organização dos vasos sanguíneos da CAM em escala microscópica, construindo uma plataforma tridimensional para o cultivo *in vitro* do embrião: um ovo artificial em formato de cubo (Figura 7). As laterais da casca do ovo são constituídas por seis membranas de silicone, contendo em sua superfície canais de 70 a 500 µm de largura interligados a câmaras microfluídicas internas, que delimitam áreas estabelecidas para a indução e direcionamento de vasos sanguíneos sobre as membranas da casca.

Nessa perspectiva, esse método de cultivo apresenta um grande potencial na pesquisa biomédica, podendo ser capaz de auxiliar de forma significativa estudos da dinâmica dos vasos sanguíneos da CAM, já que ele permite controlar sua distribuição e direção de crescimento. Uma vez que o fluxo sanguíneo esteja funcional, microcâmaras podem ser construídas dentro de sua estrutura com o propósito de cultivar células ou tecidos implantados, por exemplo. Como a superfície do ovo é transparente, também é possível fazer a aplicação e triagem de substâncias em cada uma das câmaras separadamente, bem como a observação de efeitos vasculares na CAM com o auxílio de um microscópio (HUANG *et al.*, 2017; NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018).

Figura 7 – Design do ovo artificial desenvolvido para o cultivo do embrião *in vitro*.



(A) Embrião cultivado dentro da casca de ovo artificial, com área delimitada representando a câmara interna; (B) Modelo esquemático da estrutura do ovo artificial. Fonte: Adaptado de Huang *et al.* (2017).

5.2 Vantagens e limitações

A membrana corioalantoide oferece múltiplas vantagens sobre outros modelos *in vivo* empregados no campo de pesquisa em angiogênese e biologia vascular. De forma geral, o modelo CAM se mostra como uma alternativa de fácil acessibilidade, simplicidade técnica e alta reprodutibilidade, que permite a triagem de um grande número de amostras com bastante praticidade (TUFAN; SATIROGLU-TUFAN, 2005).

Uma das vantagens mais características da CAM é seu rápido crescimento vascular, que ocorre em um curto espaço de tempo, entre os dias 3 e 10 do desenvolvimento embrionário. Este estímulo angiogênico pode produzir uma riqueza de informações relacionadas às vias de desenvolvimento da CAM, o que possibilita sua aplicação em estudos sobre diversos processos fisiológicos e patológicos, por meio da testagem de citocinas, hormônios ou fármacos, ou mesmo pelo transplante de tecidos, células ou materiais isolados na membrana (MERCKX *et al.*, 2020; RIBATTI, 2017).

Técnicas como essas são aplicadas em diversas linhas de pesquisa e setores industriais, principalmente na área farmacêutica. Levando em consideração o quão laboriosa e dispendiosa é a preparação de testes convencionais *in vivo*, modelos como a CAM podem facilitar e agilizar as análises laboratoriais de forma significativa. Além disso, a relação custo-benefício do modelo também contribui para seus benefícios, já que o gasto com um ovo embrionado é quase 100 vezes menor do que com, por exemplo, um rato de linhagem comum (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014).

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, o sistema imunológico do embrião de galinha não está totalmente desenvolvido (FRIEND *et al.*, 1990;

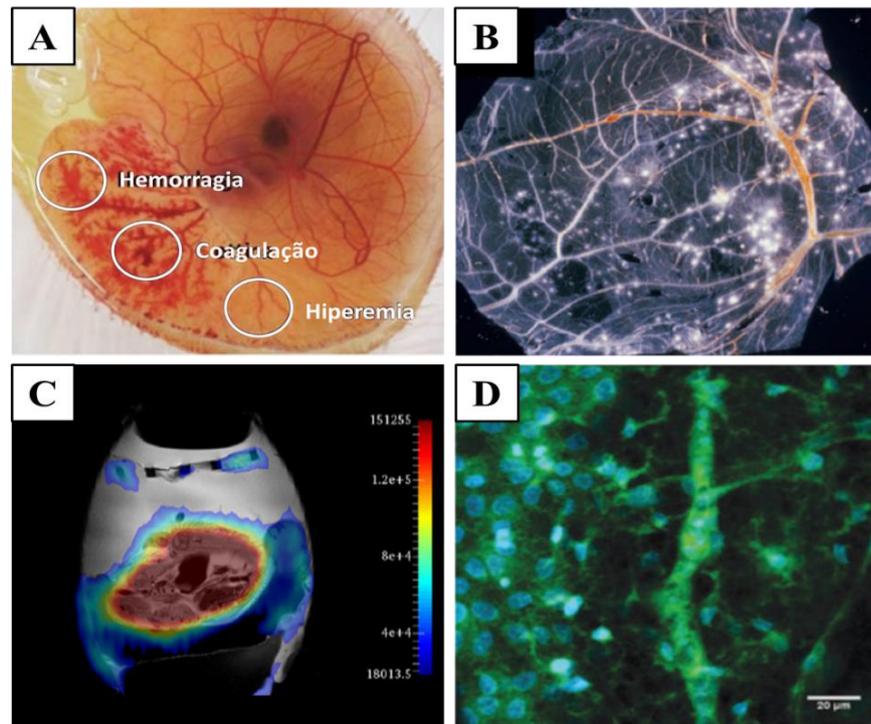
VARGAS *et al.*, 2007). Estudos indicam a produção gradual de linfócitos T e B começa a partir do 11º dia de embriogênese, mas estes não se diferenciam totalmente até o 18º dia (VARGAS *et al.*, 2007). Conseqüentemente, o embrião de galinha não é capaz de desempenhar funções imunes mediadas por linfócitos T e B até o 11-12º dia de incubação, porém, ainda pode desencadear respostas por meio da infiltração de monócitos, macrófagos e heterófilos (células análogas aos neutrófilos) (SYS *et al.*, 2012; RIBATTI, 2016).

Dessa forma, por se tratar de um sistema parcialmente imunodeficiente e altamente vascularizado, a CAM se mostra como um modelo xenográfico ideal para receber células ou tecidos de origens diferentes, sem causar respostas imunes acentuadas que prejudiquem o sucesso dos transplantes (RIBATTI, 2016). Além disso, a CAM promove uma rápida vascularização e desenvolvimento dos enxertos, permitindo observar e analisar as mudanças em sua microcirculação de forma minuciosa (MORENO-JIMÉNEZ *et al.*, 2018; KANCZLER *et al.*, 2017).

Baseando-se em países cujos aspectos éticos são mundialmente reconhecidos, o embrião de galinha não é considerado um animal vivo até o 17º dia de seu desenvolvimento embrionário, o que faz com que a aprovação deste modelo por comitês de ética para experimentação animal não seja um requisito em vários locais, acelerando, assim, as etapas dos estudos pré-clínicos (RIBATTI, 2016). Ademais, sistemas vasculares extraembrionários, como a CAM, não possuem inervação e geralmente o período de incubação do embrião é encerrado antes que seus centros nervosos associados à percepção da dor se diferenciem totalmente (VICTORELLI *et al.*, 2020). Portanto, este método pode ajudar a reduzir o sofrimento de animais utilizados em experimentos, pois seu uso como modelo alternativo não entra em conflito com obrigações éticas na maior parte do mundo, especialmente aquelas relacionadas às leis de proteção animal.

Além das vantagens éticas, o ensaio CAM também oferece outros benefícios em comparação aos modelos convencionais, como sua grande acessibilidade e fácil manipulação, que contribuem com a análise e quantificação dos resultados (Figura 8). Para descrever as respostas vasculares induzidas por determinado tratamento na CAM, diversos padrões indicadores podem ser utilizados, dentre eles: análises macroscópicas de efeitos vasculares – como hiperemia, hemorragia, lise, oclusão e coagulação de vasos sanguíneos –, técnicas histológicas e imuno-histoquímicas e métodos para quantificar a expressão de RNA e proteínas (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014; MERCXK *et al.*, 2020).

Figura 8 – Diferentes métodos para investigar a indução de efeitos vasculares na CAM.



(A) Avaliação macroscópica; (B) Microscopia de campo escuro; (C) Tomografia por emissão de pósitrons; (D) Microscopia de fluorescência. Fonte: Adaptado de Wannaphatchaiyong *et al.* (2019); Nowak-Sliwinska, Segura e Iruela-Arispe (2014); Winter *et al.* (2020); e Merckx *et al.* (2020).

A facilidade do monitoramento *in vivo* em tempo real, principalmente no cultivo *ex ovo*, é outro ponto positivo deste modelo, o qual tem atraído a atenção de cada vez mais pesquisadores. Vários trabalhos demonstram a ampla aplicabilidade de técnicas de imagem (Figura 8), que variam desde a microscopia tradicional até técnicas mais avançadas, como tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET) e ressonância magnética (MRI) (MERCXK *et al.*, 2020; NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018; WINTER *et al.*, 2020). Além disso, devido à transparência das camadas superficiais da CAM, praticamente qualquer comprimento de onda na faixa de luz visível do espectro eletromagnético pode ser utilizado para aplicação de microscopia por fluorescência (JEFFERIES *et al.*, 2017; NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014)

Em contrapartida, como qualquer outro modelo experimental, os ensaios CAM também apresentam limitações, que podem ou não comprometer sua utilização em larga escala e criar problemas durante a análise dos resultados. Assim, embora vários métodos tenham sido descritos para quantificar processos de neovascularização durante os ensaios, a distinção entre capilares recém-formados e preexistentes ainda é um desafio para os cientistas, uma vez que a CAM possui uma rede vascular bem desenvolvida, que cresce de forma acelerada (TUFAN;

SATIROGLU-TUFAN, 2005; VARGAS *et al.*, 2007). Assim, o estágio de desenvolvimento da CAM no momento do ensaio e a duração da intervenção desempenham um papel crítico quando se trata da avaliação das respostas angiogênicas. Esta deve ser realizada preferencialmente em um período durante o qual os efeitos vasculares induzidos podem ser distinguidos do processo fisiológico natural. Em geral, o intervalo do dia 9 ao dia 14 de incubação é o mais utilizado em estudos relatados na literatura (TUFAN; SATIROGLU-TUFAN, 2005).

Vale ressaltar que o desenvolvimento embrionário envolve alterações significativas na matriz extracelular ou mesmo no grau de diferenciação dos vasos e proliferação de células endoteliais (GABRIELLI; ACCILLI, 2010). Portanto, é necessária a padronização de protocolos específicos para obtenção dos parâmetros desejados para análise, sempre percebendo que os resultados devem ser analisados de acordo com o contexto da montagem experimental. Além disso, como as mudanças fisiológicas e morfológicas ocorrem rapidamente, o sistema permite apenas um curto período de observação pós-tratamento, geralmente até, no máximo, 96 horas (TUFAN; SATIROGLU-TUFAN, 2005). Para contornar essa desvantagem, pode-se realizar registros fotográficos sequenciais para documentar a formação de novos vasos (RIBATTI, 2018). Ejaz e colaboradores (2006) também propuseram um modelo para a quantificação mais precisa dos efeitos vasculares na CAM. A técnica consiste em um sistema de sondagem que quantifica diferentes parâmetros na microarquitetura vascular da membrana.

Uma limitação importante do modelo CAM é a possibilidade de ocorrerem reações inflamatórias inespecíficas, caso os experimentos se prolonguem por muito tempo. Tais reações provocam respostas angiogênicas e imunes indesejadas, que podem prejudicar a leitura dos resultados ou impossibilitar o transplante de enxertos e biomateriais na membrana (KNIGHTON; FIEGEL; PHILLIPS, 1991). Geralmente, esse problema pode ser evitado, ou pelo menos minimizado, ao limitar o período de incubação e dos experimentos até, no máximo, 15 dias, estágio em que o sistema imunológico da CAM ainda se encontra relativamente imaturo (LEENE; DUYZINGS; VAN STEEG, 1973; RIBATTI, 2016).

No que diz respeito às principais problemáticas descritas na literatura relacionadas à substituição de modelos *in vivo* já bem estabelecidos, destaca-se o fato de que algumas metodologias alternativas podem tanto subestimar como superestimar os resultados obtidos *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Embora a CAM simule a fisiologia de sistemas mais complexos, deve-se ter cuidado ao utilizá-la para adaptar certas metodologias ou interpretar resultados, já que se trata de um modelo não-mamífero, relativamente distante de humanos do ponto de vista evolutivo. Em certos casos, respostas metabólicas totalmente distintas podem ser encontradas, em comparação com outros modelos *in vivo* (NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018). Outro

problema é o pequeno número de reagentes disponíveis comercialmente para espécies aviárias, como anticorpos, citocinas e primers, que geralmente não são compatíveis com tecidos embrionários da galinha (RIBATTI, 2016). Isso é considerado uma limitação do modelo, mas também um desafio para encontrar formas metodológicas alternativas de utilizar o ensaio CAM.

Outra desvantagem é que alguns ensaios não são muito eficazes para o estudo de substâncias viscosas, aderentes ou insolúveis em água, pois estas prejudicam e obscurecem a visualização da membrana ou dificultam os procedimentos de lavagem e remoção após sua aplicação (ABDELKADER *et al.*, 2015; LIEBSCH, SPIELMANN, 2002; MCNAMEE *et al.*, 2011). A CAM também é extremamente sensível a fatores ambientais, como contaminações, queratinização, mudanças no pH, osmolaridade e tensão de oxigênio, que prejudicam o crescimento do embrião e podem ser responsáveis por eventuais respostas angiogênicas falso-positivas, conforme mencionado acima (AUERBACH *et al.*, 2000; NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014).

Apesar de suas limitações, não há dúvidas de que os ensaios CAM continuam a ser uma ferramenta importante na elucidação de vários mecanismos fisiológicos. O fato de não necessitar de procedimentos de aprovação por comitês de ética em alguns países, associado à sua relativa simplicidade, bem como seu baixo custo, tornaram-no um modelo eficaz para vários estudos pré-clínicos.

5.3 Aplicações do ensaio CAM

Ao longo dos anos, a CAM foi se estabelecendo como um modelo experimental adequado para a pesquisa pré-clínica, pois sua estrutura vascular é análoga às das espécies mamíferas e a resposta em estudos toxicológicos se assemelha à de outros modelos *in vivo* (KNIGHT *et al.*, 2019; KUE *et al.*, 2015). Isso também se justifica pela vantagem de ser um sistema mais simples em comparação com outros modelos *in vivo* comumente utilizados na prática pré-clínica, além de apresentar melhor desempenho do que os testes *in vitro* (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014). Em virtude dessas características, ela tem sido objeto de estudo em uma ampla gama de linhas de pesquisa, o que tem atraído cada vez mais especialistas de áreas como bioengenharia, oncologia, morfologia, bioquímica, biologia molecular, toxicologia, imunologia e farmacologia.

Visto que a CAM possui uma rede capilar muito densa e de rápido crescimento, ela pode ser utilizada em investigações sobre os mecanismos que levam ao desenvolvimento dos vasos sanguíneos e à angiogênese, assim como sua ativação ou inibição em resposta a diferentes

fatores (RIBATTI *et al.*, 2001). Dessa forma, o ensaio CAM tem sido amplamente utilizado para estudar os processos envolvidos no crescimento e metástase tumoral, análises toxicológicas, biocompatibilidade de materiais, transplante de órgãos, reparo de tecidos e desenvolvimento de medicamentos e vacinas (KAIN *et al.*, 2014; PRADO *et al.*, 2019; RIBATTI, 2016).

Como é possível perceber, o ensaio CAM tem sido aplicado em uma diversidade de áreas da pesquisa básica e aplicada. Muitos estudos bibliográficos excelentes já abordaram essas aplicações, demonstrando que cada uma exige o uso de protocolos específicos, o que auxilia pesquisadores não familiarizados com a técnica a esclarecer como ela pode ajudar a responder diferentes questões científicas.

5.3.1 Moléculas pró e antiangiogênicas

A angiogênese é um processo fisiológico fundamental que apresenta fortes implicações na homeostase dos tecidos. Modelos experimentais que ajudem a identificar como a angiogênese é regulada são imprescindíveis para responder questões biológicas. Muitos já foram descritos na literatura, como os ensaios com microbolsa corneana, *plugs* de Matrigel, implantes de matriz esponjosa, mesentério de roedores e *zebrafish* (NORRBY, 2006). Levando em consideração a complexidade e dinâmica das reações angiogênicas e as grandes variações na fisiologia dos tecidos, não é possível selecionar apenas um único modelo para qualquer tipo de estudo, já que cada um possui pontos positivos e negativos. Por exemplo, alguns são mais utilizados para triagem de moléculas candidatas a alvos terapêuticos, enquanto outros são mais eficazes em estudos sobre dosagem, reações moleculares e efeitos sinérgicos de múltiplos agentes no processo de angiogênese (NORRBY, 2006; PRADO *et al.*, 2019).

Devido ao seu rápido crescimento vascular, a CAM representa um ótimo modelo para o estudo da angiogênese, já que diferentes padrões vasculares desse tecido ocorrem durante o desenvolvimento embrionário. A atividade proangiogênica ou antiangiogênica de diferentes moléculas, em especial, tem sido amplamente explorada pelo campo da pesquisa farmacêutica, uma vez que várias patologias estão associadas a anomalias do processo de angiogênese, como cânceres, infecções, isquemias, distúrbios inflamatórios e imunológicos (CARMELIET, 2003; DERYUGINA; QUIGLEY, 2008).

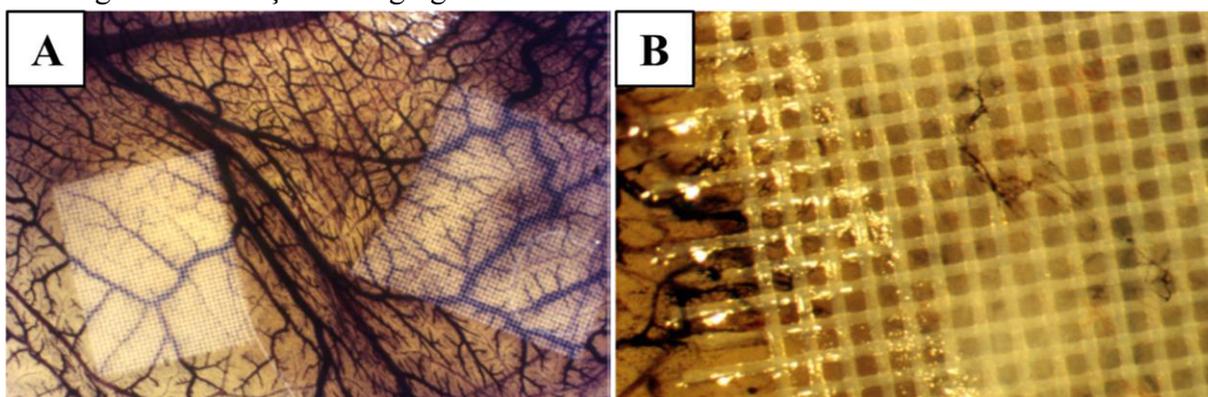
Até então, uma grande variedade de compostos capazes de estimular ou inibir o processo de angiogênese na CAM já foram reportados. Estes incluem fatores de crescimento (RIBATTI *et al.*, 2001), hormônios (GAGLIARDI; COLLINS, 1993), compostos naturais

bioativos (AVRAM *et al.*, 2017), agentes antineoplásicos (PEREIRA-LOPES *et al.*, 2010), moléculas gasosas (PIPILI-SYNETOS *et al.*, 2000), compostos organometálicos (NAZAROV *et al.*, 2013), substâncias angiogênicas (REUWER *et al.*, 2012), antibióticos (HU, 1998), anticorpos (VAN BEIJNUM *et al.*, 2013) e pequenas moléculas sintéticas (RIBATTI, 2012).

A eficácia de tais compostos pode ser investigada através de um conjunto de técnicas qualitativas e quantitativas, geralmente baseadas na avaliação de parâmetros associados à morfologia e densidade de vasos sanguíneos, como número, diâmetro, permeabilidade, pontos de ramificação e alterações no fluxo (NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018; RIBATTI, 2010). Em estudos de inibição angiogênica, duas abordagens diferentes podem ser utilizadas: uma avalia a inibição da angiogênese basal e outra examina o efeito inibitório de um estímulo previamente aplicado à CAM, geralmente induzido por citocinas proangiogênicas bem estabelecidas, como FGF-2 ou VEGF (RIBATTI, 2010; VARGAS *et al.*, 2007).

Reações vasculares causadas por substâncias angiogênicas podem ser reconhecidas em cerca de 72 a 96 horas após o tratamento, quando se observa um aumento do diâmetro e do número de vasos da CAM. Em compensação, quando um composto angiostático é testado, ocorre oclusão dos vasos, que se tornam menos densos e podem desaparecer eventualmente. O desenvolvimento de uma área avascular (zona de inibição) no local do tratamento é considerado um indicativo de atividade antiangiogênica (RIBATTI, 2010).

Figura 9 – Indução de angiogênese utilizando uma matriz avascular no ensaio CAM.



(A) Matrizes de colágeno compostas por fatores de crescimento na superfície da CAM. A matriz esquerda contém, além de FGF-2, um fator antiangiogênico (trombospondina), já a direita contém FGF-2 e VEGF; (B) Vaso invadindo a matriz previamente avascular. Fonte: Adaptado de Nowak-Sliwinska, Segura e Iruela-Arispe (2014).

Há uma variedade de métodos descritos na literatura para a administração de moléculas com propriedades pró ou antiangiogênicas no ensaio CAM. O material geralmente é aplicado em pequenos discos filtrantes sobre a membrana (RIBATTI, 2016). Respostas vasculares também podem ser avaliadas através da quantificação do número de vasos que

crecem, contra a gravidade, sobre matrizes poliméricas contendo os fatores angiogênicos (VICTORELLI *et al.*, 2020), como demonstrado na Figura 9. Além disso, tecnologias de imagem vêm sendo utilizadas para facilitar a análise e permitir uma melhor visualização dos eventos de perfusão vascular e vascularização, algumas delas sendo capazes de marcar seletivamente os vasos em desenvolvimento, permitindo o reconhecimento de estruturas vasculares a nível microscópico (LEONG *et al.*, 2010; LEWIS *et al.*, 2006).

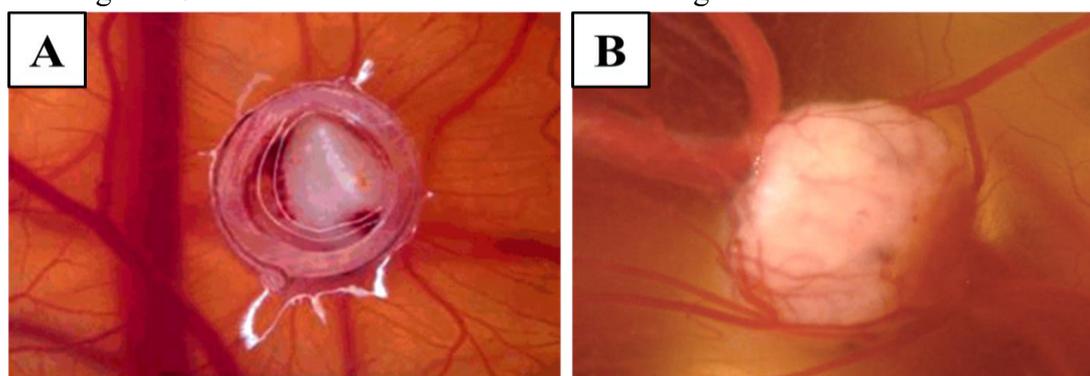
5.3.2 Crescimento de tumores e metástase

Dos inúmeros estudos que utilizam a CAM como modelo experimental, os que envolvem a biologia de tumores estão entre os mais documentados. De fato, durante as últimas três décadas, vários trabalhos têm demonstrado o uso bem-sucedido dessa técnica na pesquisa sobre câncer e metástase (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014). Desde que Rous e Murphy realizaram os primeiros experimentos que induziram a formação de um sarcoma de galinha na vasculatura da CAM (MURPHY; ROUS, 1912), o ensaio tem sido usado para investigar questões relacionadas ao crescimento, angiogênese, proliferação e migração de tumores, além dos mecanismos moleculares envolvidos nesses processos.

A CAM, por ser altamente vascularizada, serve como um sistema receptor de enxertos de células tumorais, que são capazes de estimular a formação de novos vasos sanguíneos, obtendo seu suprimento nutritivo. Enquanto isso, o embrião atua como um hospedeiro naturalmente imunodeficiente, capaz de sustentar tumores de diferentes origens sem provocar reações imunes acentuadas (LOKMAN *et al.*, 2012). Isso permite que os tumores se desenvolvam de uma maneira semelhante aos seus hospedeiros naturais, se proliferando, invadindo outros locais e provocando metástase nos órgãos embrionários (RIBATTI, 2014).

Quando células cancerosas são usadas, pequenas amostras podem ser inoculadas sobre discos implantados na CAM, de modo que a suspensão celular fique concentrada em uma determinada área (Figura 10A). Já quando se utiliza fragmentos de tumor, estes podem ser transplantados diretamente sobre a membrana (Figura 10B) (TAMANOI, 2019). Tais protocolos são vantajosos devido ao tempo muito curto que leva para os tumores crescerem e sofrerem metástase. Em outros modelos animais, o desenvolvimento tumoral pode demorar até 6 semanas, ao passo que, na CAM, os tumores rapidamente se tornam visíveis entre 2 e 5 dias e sua metástase ocorre por volta de 10 dias após o transplante (DÜNKER; JENDROSSEK, 2019; RIBATTI, 2014).

Figura 10 – Cultivo de células e tumores cancerígenos enxertados na CAM.



(A) Suspensão de células de tumor pancreático inoculadas em disco implantado na CAM; (B) Carcinoma ovariano em crescimento na vasculatura da CAM. Fonte: Adaptado de Ciolofan *et al.* (2017) e Nowak-Sliwinska, Segura e Iruela-Arispe (2014).

Esse rápido desenvolvimento se deve principalmente à rica estrutura vascular da CAM, que desempenha um papel fundamental na sua interação com o tumor e, conseqüentemente, na formação da própria vasculatura tumoral, induzindo seu crescimento. Ademais, a membrana é composta por uma matriz extracelular que mimetiza o ambiente fisiológico das células cancerígenas. Estas células, ao secretarem fatores de estímulos angiogênicos, direcionam a multiplicação de vasos sanguíneos e promovem a manutenção do microambiente tumoral (AVRAM *et al.*, 2017; LOKMAN *et al.*, 2012).

Além dos processos de crescimento e neovascularização tumoral, o estudo da metástase espontânea, que ocorre após a invasão das células cancerosas na vasculatura da CAM, também pode proporcionar uma maior compreensão sobre os mecanismos da progressão do câncer e do potencial metastático de certas linhagens celulares ou fragmentos de tumores primários (MAACHA; SAULE, 2018; SCHNEIDER-STOCK; RIBATTI, 2020). Além disso, na tentativa de encontrar novos meios para o tratamento do câncer, os enxertos tumorais da CAM podem ser usados para a testagem de diferentes agentes quimioterápicos capazes de reduzir ou inibir as vias envolvidas nessas neoplasias malignas, principalmente as relacionadas à ativação de citocinas pró-inflamatórias e à angiogênese excessiva (AVRAM *et al.*, 2017; CIOLOFAN *et al.*, 2017; ÖZCETIN; AIGNER; BAKOWSKY, 2013).

Evidências substanciais mostram que o desenvolvimento de tumores por processos inflamatórios locais e angiogênicos pode ser conduzido por células e uma variedade de mediadores, como citocinas, quimiocinas e enzimas, que desempenham um papel substancial na manutenção do microambiente e da progressão do câncer (COUSSENS; WERB, 2002). Recentemente, Yang *et al.* (2017) atestaram, através do ensaio CAM, que células-tronco mesenquimais da medula óssea, provenientes do microambiente tumoral de um câncer de

próstata, induzem a expressão e secreção de fatores angiogênicos e promovem a formação de vasos sanguíneos quando estimuladas pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ . Ribatti *et al.* (2006) demonstraram o efeito oposto, inibindo a angiogênese induzida por neuroblastoma humano, por meio da liberação de IFN- γ por células tumorais transfectadas.

As linhagens de células cancerosas mais comuns testadas no modelo CAM incluem carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (GRONAU *et al.*, 2006), câncer colorretal (SUBAUSTE *et al.*, 2009), câncer renal (FERICIAN *et al.*, 2015), osteossarcomas (BALKE *et al.*, 2010), neuroblastomas (SWADI *et al.*, 2018), câncer de mama (GAUTAM *et al.*, 2016; YOUSEFNIA *et al.*, 2019), carcinoma ovariano (LOCKMAN *et al.*, 2012; VU *et al.*, 2018), melanoma ocular (KALIRAI *et al.*, 2015) e carcinoma hepatocelular (HAN *et al.*, 2016).

O comportamento de diferentes células e tecidos tumorais enxertados na CAM pode ser comparado e avaliado em relação a suas características histológicas, viabilidade após retransplantes e efeitos no embrião de galinha. As amostras tumorais podem ser removidas da CAM a qualquer momento e analisadas de diversas formas, como em métodos de imunomarcção ou perfil de expressão gênica (NASCIMENTO-GONÇALVES *et al.*, 2020; NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, 2018). Nanopartículas virais também podem ser usadas para visualizar vasos recém-formados de tumores em expansão (LEONG *et al.*, 2010).

Mais recentemente, o interesse pela CAM tem sido renovado devido ao avanço da Medicina de Precisão na terapia do câncer. Ela permite testar a eficácia de tratamentos contra diferentes tipos de câncer de forma personalizada para cada paciente. Dessa forma, criou-se um sistema em que amostras tumorais derivadas de pacientes são reproduzidas na CAM, chamado de PDcE (*Patient-derived chicken egg tumor model*) (KOMATSU *et al.*, 2019). Os tumores enxertados se desenvolvem como seus originais e podem ser selecionados para diversas opções terapêuticas. Vários PDcEs já foram estabelecidos nos últimos anos, incluindo alguns carcinomas, osteossarcomas, papilomas e glioblastomas (BALČIŪNIENĖ *et al.*, 2009; SYS *et al.*, 2012; ULOZA *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2015). Além disso, alguns tumores mais difíceis de serem aplicados em modelos *in vivo*, como o câncer medular de tireoide, podem ser transplantados na CAM com maior eficácia (KOMATSU *et al.*, 2019; TAMANOI, 2019).

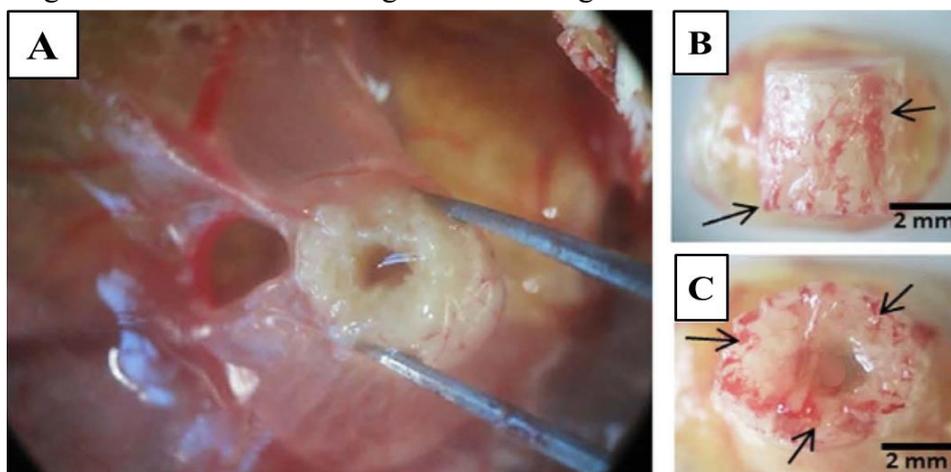
5.3.3 Engenharia de tecidos e transplantes

Além de enxertos tumorais, outras frações de tecidos e órgãos alogênicos ou xenogênicos podem ser transplantados para a CAM a fim de induzir seu crescimento, remodelação e vascularização. Esses efeitos surgem por meio da interação mútua entre o

enxerto tecidual e os componentes da CAM. A construção do tecido resultante expressa fortes semelhanças com sua morfologia natural e fornece oportunidades para estudar processos fisiológicos na regeneração e remodelação de tecidos *ex vivo* (KANCZLER *et al.*, 2017; MERCKX *et al.*, 2020). Ao contrário dos implantes subcutâneos em modelos murinos, o ensaio CAM é minimamente invasivo para o embrião de galinha e, portanto, é considerado um modelo de refinamento para pesquisa nessa área (KUE *et al.*, 2015).

A formação de anastomoses periféricas entre os vasos do enxerto e da CAM é o mecanismo mais comum envolvido na revascularização e reperfusão do tecido transplantado (AUSPRUNK; KNIGHTON; FOLKMAN, 1975). A CAM pode fornecer nutrientes e fatores de crescimento ao enxerto, bem como recrutar células-tronco derivadas de outras partes do embrião em desenvolvimento (RIBATTI, 2017). Por ter um suprimento de sangue contínuo, o tecido enxertado mantém-se viável enquanto o embrião de galinha permanecer vivo. Porém, comparando-se com modelos murinos de implantes subcutâneos, esse período de incubação na CAM é considerado curto (MORENO-JIMÉNEZ *et al.*, 2017). Alternativamente, Moreno-Jiménez e colaboradores (2017) exploraram o potencial de uma técnica que prolonga o período de cultivo, chamado “sistema duplo da membrana corioalantoide”, que consiste em colher o tecido enxertado e retransplantá-lo novamente em outra CAM de um embrião recém-incubado.

Figura 11 – Osso humano regenerado e integrado à vasculatura da CAM.



(A) Cilindro ósseo extraído de fêmur humano no 7º dia pós-implantação na CAM; (B-C) Avaliação macroscópica do implante, com destaque para os vasos sanguíneos da CAM infiltrados no tecido ósseo (setas). Fonte: Adaptado de Moreno-Jiménez *et al.* (2016).

Vários tecidos já foram utilizados como aloenxertos ou xenoenxertos e transplantados com sucesso na CAM, como, por exemplo, fígado (CHIBA; YUI; HIRANO, 2010), osso (Figura 11) (MORENO-JIMÉNEZ *et al.*, 2016), endométrio (MAAS *et al.*, 1999), glândula adrenal, cerebelo (BERTOSI *et al.*, 1999) e pele (KUNZI-RAPP; RÜCK;

KAUFMANN, 1999; SLODOWNIK *et al.*, 2009). No caso de enxertos de pele, a CAM pode ser usada para estudar o processo de reparo tecidual de feridas, como demonstrado por Carre e colaboradores (2012). Esse modelo foi capaz de reproduzir de forma precisa todas as fases de cicatrização da pele, incluindo proliferação de fibroblastos, angiogênese, formação de infiltrados inflamatórios, deposição de matriz extracelular e reepitelização, resultando na formação da cicatriz (RIBATTI *et al.*, 1996). Em contraste com os modelos de cultivo de pele *in vitro* organotípicos, a CAM consegue manter a pele em um estado mais naturalmente fisiológico, ou seja, obtendo um suprimento contínuo de nutrientes através de vasos sanguíneos (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014).

A análise da biocompatibilidade de materiais de origem natural ou sintética que serão implantados em sistemas biológicos é outra potencial aplicação do ensaio CAM relacionada à engenharia de tecidos. Matrizes podem ser implantadas na membrana e fornecer uma plataforma para a construção e crescimento de um novo tecido (MORENO-JIMÉNEZ *et al.*, 2017). A CAM também tem sido usada na pesquisa de células-tronco, em que vários tipos de matrizes extracelulares ou *scaffolds* de polímeros sintéticos são utilizados no intuito de estabelecer suportes para a regeneração e diferenciação de tecidos de acordo com a forma desejada (LING *et al.*, 2014). O uso combinado de células-tronco e biomateriais implantados na CAM parece ser uma nova tendência da Medicina Regenerativa e, em breve, esse modelo pode se tornar ainda mais notável em relação a outros sistemas, principalmente devido às propriedades neovasculares da CAM.

Vários parâmetros, como infiltração celular, incorporação tecidual e processos angiogênicos e inflamatórios induzidos por *scaffolds* e diversos dispositivos médicos com diferentes propriedades químicas e físicas, podem ser avaliados (MERCKX *et al.*, 2020). Vários estudos já demonstraram que o embrião de galinha é capaz de induzir uma resposta imune primitiva, destacando o potencial do ensaio CAM como uma ferramenta para avaliar a biocompatibilidade de implantes (VALDES; KREUTZER; MOUSSY, 2002). A reação inflamatória induzida no embrião é semelhante àquela que ocorre em mamíferos, que consiste em uma resposta aguda inicial que progressivamente evolui para uma inflamação crônica com formação de tecido fibroso (RIBATTI; ANNESE; TAMMA, 2020; VALDES; KREUTZER; MOUSSY, 2002). A capacidade de neovascularização da CAM pode ser explorada para a para aumentar a biocompatibilidade, funcionalidade e integração de qualquer dispositivo médico implantado (VARGAS *et al.*, 2007). Para evitar maiores chances de rejeição de implantes, a nova geração de biomateriais vem sendo planejada para construir sistemas que promovem a liberação controlada de fatores de crescimento, a fim de promover uma maior

biocompatibilidade (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014).

5.3.4 Produção de medicamentos

O ensaio CAM representa um excelente sistema para o estudo e triagem de múltiplas formulações com potencial terapêutico, sendo capaz predizer sua atividade farmacológica nos sistemas *in vivo*. O modelo mostra-se especialmente útil para analisar os perfis farmacocinéticos – especialmente a absorção – de preparações farmacêuticas, que, de outro modo, não poderiam ser obtidos estritamente por meio de ensaios *in vitro*, o que mostra que ele tem servido como uma ferramenta valiosa para triagens pré-clínicas (BJØRNSTAD *et al.*, 2015; WILSON; STECK, 2000).

Cientistas da área fazem constantes esforços para produzir novos sistemas capazes de controlar a taxa e o local de liberação de medicamentos, a fim de sustentar a duração de sua ação terapêutica (VARGAS *et al.*, 2007; VICTORELLI *et al.*, 2020). A ampla variedade de sistemas de liberação de fármacos utilizados para o modelo CAM tem despertado o interesse da indústria farmacêutica, que pode utilizá-lo como teste complementar para o desenvolvimento de novos medicamentos de uso clínico.

A administração tópica de fármacos sobre a CAM pode atingir rapidamente a circulação sistêmica após a absorção pela membrana. Esta via é a mais comumente usada, devido à ampla acessibilidade da superfície da CAM. Com sistemas de liberação controlada, é possível estudar mecanismos de ação, farmacocinética e biodistribuição no embrião como um todo, através de sua aplicação intravenosa na CAM. Diferentes abordagens para elucidar estes parâmetros têm sido utilizadas, variando desde amostragens de sangue, biossensores ou angiografias (VARGAS *et al.*, 2007). A toxicidade dos fármacos e seus transportadores pode ser avaliada tanto em termos de mortalidade embrionária quanto pela indução de respostas fisiológicas, como inflamação e neovascularização, evidentes pela presença de granulomas e vascularização acentuada no local de aplicação do tratamento (ÖZTÜRK *et al.*, 2020; RIBATTI, 2017). Além disso, terapias anticancerígenas e marcadores diagnósticos também podem ser aplicados em tumores enxertados na CAM (SWADI *et al.*, 2018; VICTORELLI *et al.*, 2020).

Várias formulações e sistemas de liberação de fármacos que utilizam o modelo da CAM do embrião de galinha já foram investigados e descritos na literatura. Esses agentes podem ser administrados de diversas formas, como conjugados de drogas, micro ou nanopartículas, ou como parte de *scaffolds* (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-

ARISPE, 2014). Entre os sistemas mais promissores testados por meio deste modelo, pode-se destacar as nanoemulsões (PUND; BORADE; RASVE, 2014), nanomicelas (MANDRACCHIA *et al.*, 2016), lipossomas (PEGAZ *et al.*, 2006), dendrímeros (JAIN; GUPTA; JAIN, 2014), nanopartículas (ÖZTÜRK *et al.*, 2020), microesferas (BURT *et al.*, 1995), hidrogéis (ALEEM *et al.*, 2019; DA-LOZZO *et al.*, 2013), entre outros.

5.3.5 Estudos toxicológicos

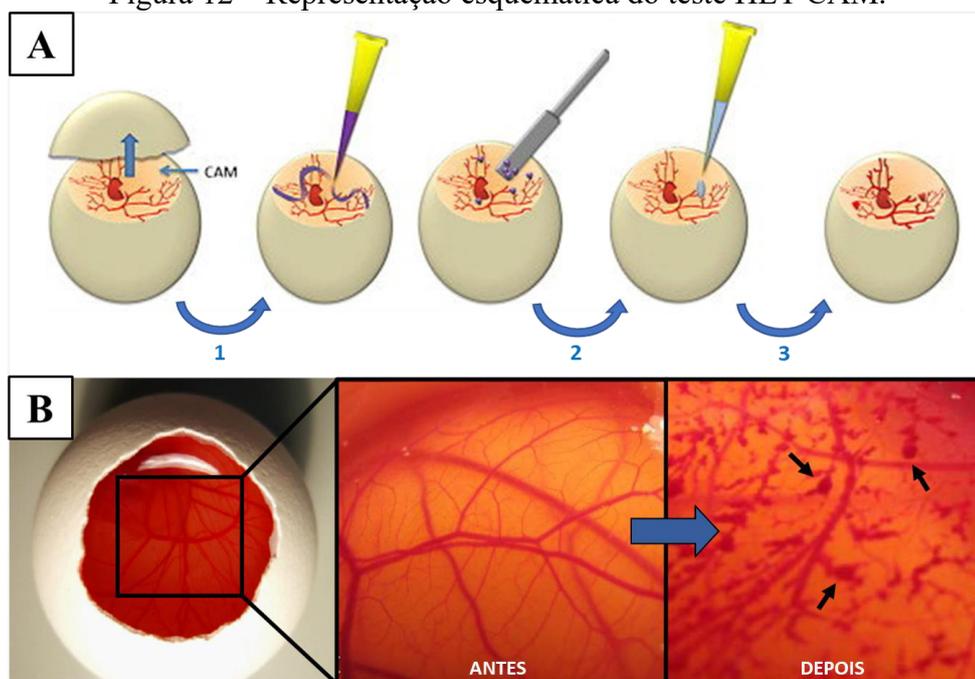
Uma vez que a maioria dos produtos lançados no mercado se destina principalmente à autoadministração, visando oferecer o máximo conforto tanto no momento da aplicação quanto durante o uso, a avaliação de efeitos adversos, como irritação local, é particularmente importante. Desse modo, novos fármacos, compostos bioativos e substâncias químicas de forma geral também podem ser avaliados quanto à sua toxicidade por meio do ensaio CAM. O método mais comumente utilizado para esta finalidade é o teste do ovo embrionado de galinha, ou HET-CAM (*Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane*), uma adaptação da metodologia tradicional *in ovo*, em que toda a incubação é feita com sistema fechado e, apenas no dia do experimento, a abertura é feita na casca do ovo. Esse teste foi originalmente desenvolvido por Luepke (1985), que estabeleceu as bases para o amplo emprego da técnica de CAM em estudos toxicológicos (ESKES *et al.*, 2005).

O objetivo do HET-CAM é avaliar os potenciais danos vasculares de um determinado produto, líquido ou sólido, aplicado sobre a superfície da CAM. Durante o ensaio, os ovos são abertos no 10º dia de incubação e a membrana é exposta e tratada com a substância em estudo durante 5 minutos, tempo necessário para que se examine visualmente possíveis alterações vasculares, tais como, hemorragia, lise e coagulação de vasos sanguíneos (Figura 12) (ICCVAM, 2010; LEIGHTON; NASSAUER; TCHAO, 1985). Após o monitoramento desses parâmetros, obtém-se uma escala que considera cada fenômeno registrado, a fim de classificar o efeito de irritação do composto, variando entre não-irritante, irritante leve, moderado e severo (OLIVEIRA *et al.*, 2012; SPIELMANN, 1995).

O método é prático, rápido e possui alta sensibilidade, além de levar em consideração um amplo espectro de formulações e abordar estímulos vasculares locais, características que o destacam entre os ensaios de toxicidade existentes atualmente (BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2016). Apesar disso, ele vem sendo criticado devido ao seu caráter qualitativo e falta de objetividade na interpretação dos resultados (ESKES *et al.*, 2005). Foi nesse contexto que o ensaio CAM-TBS (*Chorionallantoic Membrane - Trypan Blue Staining*) surgiu,

introduzido por Hagino *et al.* (1991) como uma modificação do HET-CAM. Este método fornece uma leitura mais precisa e quantitativa dos fenômenos vasculares observados, utilizando o corante azul de tripan absorvido pela membrana como um indicador das lesões vasculares (LAGARTO *et al.* 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Figura 12 – Representação esquemática do teste HET-CAM.



(A) Sequência de procedimentos durante o HET-CAM: 1) abertura da casca do ovo e aplicação tópica da substância, líquida ou sólida, sobre a membrana; 2) lavagem; 3) observação de danos vasculares. (B) Avaliação macroscópica da CAM, antes e após tratamento com a substância, quanto a sinais de hemorragia, coagulação e/ou lise de vasos, em destaque nas setas pretas. Fonte: Adaptado de McKenzie *et al.* (2015) e Wilson, Ahearn e Hopkinson (2015).

Atualmente, o HET-CAM é um dos métodos sugeridos pelo ECVAM e ICCVAM para substituir o controverso teste de irritação ocular de Draize, realizado em coelhos (CANCIAN *et al.*, 2014). Sabendo que a CAM tem uma estrutura tissular complexa, com rica vasculatura e respostas inflamatórias semelhante a tecidos mucosos, como a conjuntiva humana, este método foi proposto como forma alternativa de prever o grau de irritação ou corrosão ocular de diversas substâncias químicas, cosméticos, produtos de uso doméstico, industrial e agrícola, formulações oftálmicas e medicamentos de uso tópico de forma geral (MCKENZIE *et al.*, 2015; SCHRAGE *et al.*, 2010; VINARDELL; MITJANS, 2008).

Além da toxicidade ocular, o modelo CAM também é adequado para avaliar aspectos relacionados à fototoxicidade (SAHU *et al.*, 2014), carcinogenicidade (GIROLAMO; ELIA; ERREDE, 2006), teratogenicidade (JI *et al.*, 2002), irritabilidade e corrosividade cutânea (MARQUARDT *et al.*, 2010; SCHEEL *et al.*, 2011) e propriedades inflamatórias (BENDER *et*

al., 2011; ÖZTÜRK; KIYAN, 2020). Ademais, uma correlação significativa foi estabelecida entre os valores de DL₅₀ obtidos no ensaio CAM e em modelos de roedores, sugerindo que estudos como estes podem ser beneficiados com a técnica (KUE *et al.*, 2015).

Além disso, triagens de extratos vegetais e óleos essenciais (MANSUR *et al.*, 2016; HASELGRÜBLER *et al.*, 2018), pesticidas (KISHORE *et al.*, 2008; JIRA *et al.*, 2012), toxinas e venenos (KNIGHT *et al.*, 2019; SOMWONGIN; CHANTAWANNAKUL; CHAIYANA, 2018), antissépticos (HARNOSS *et al.*, 2019), colírios (FERNÁNDEZ-FERREIRO *et al.*, 2014), adjuvantes de vacinas (BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2016) e formulações farmacêuticas (LORENZO-VEIGA *et al.*, 2019; SAW; HENG; LIEW, 2008) também já foram relatadas por meio da técnica de HET-CAM.

Um setor onde o modelo CAM foi implementado de forma mais concreta em estudos toxicológicos é a indústria cosmética, que tem utilizado o ensaio HET-CAM como forma de avaliação e classificação de propriedades irritativas de seus produtos (CHORILLI *et al.*, 2009; DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017; COELHO *et al.*, 2019). Em estudos realizados por associações como *Cosmetics Europe* e *Japanese Cosmetic Industry Association*, constituídas por empresas e representantes da indústria na Europa e Japão, já foram testados vários tipos formulações e ingredientes cosméticos, frequentemente presentes em produtos como hidratantes, sabonetes, xampus, maquiagens, protetores solares, entre outros (ESKES *et al.*, 2005; STEILING *et al.*, 1999). Dessa forma, fabricantes podem utilizar este ensaio no controle de qualidade e segurança de diversos produtos presentes no mercado, submetendo-os a processos de triagem com este teste, ao invés de utilizar modelos mamíferos.

Visto como um dos métodos mais utilizados para a elucidação do potencial irritativo de substâncias com diferentes propriedades físico-químicas, o HET-CAM e suas demais modificações representam uma nova abordagem experimental para estudos sobre toxicidade aguda. Desde que ele foi considerado um possível candidato a método alternativo para substituição do teste de Draize, este modelo tem sido extensivamente utilizado para este propósito (ICCVAM, 2010; PRADO *et al.*, 2019).

5.4 Aspectos éticos

Conforme foi dito anteriormente, na maioria dos países, o embrião de galinha é isento de classificação como espécie protegida até o seu 17º de incubação e, portanto, a aprovação por comitês de ética para executar experimentos com a CAM não é um requisito obrigatório (KANCZLER *et al.*, 2017). Porém, dependendo do caso, o período máximo de

incubação durante os ensaios pode variar e ser limitado a determinados dias, a fim de cumprir a legislação relativa à proteção de animais utilizados para fins científicos de cada país. Nos Estados Unidos, por exemplo, o *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) estabeleceu que embriões de galinha com menos de 2 semanas de desenvolvimento são considerados incapazes de sentir estímulos nociceptivos e, por isso, podem ser utilizados em experimentos sem qualquer restrição ética ou necessidade de aprovação prévia (RIBATTI, 2017). Já a legislação brasileira não possui, até o momento, nenhuma menção a aspectos éticos relacionados aos ensaios com a CAM, então, dependendo do caso, pode ser necessário o processo de aprovação por comitês de ética nacionais.

O estágio exato em que a capacidade nociceptiva do embrião de galinha está suficientemente desenvolvida para justificar preocupações éticas ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, há consenso entre os cientistas de que os embriões aviários desenvolvem a nocicepção de forma lenta e gradual, a partir do 7º dia de incubação (ROSENBRUCH, 1997). No 13º dia, o tubo neural do embrião está diferenciado em um cérebro funcional e, pouco antes de sua eclosão, a partir do 17º dia, o animal já se encontra totalmente consciente (IACUC, 2019). Em vista disso, experimentos com embriões de galinha só podem ser considerados métodos alternativos quando uma atenção especial é dada no refinamento desta técnica. Mesmo que os ensaios sejam realizados em estruturas extraembrionárias, como a CAM, que não são inervadas, o animal deve ser sacrificado por um método humanizado ao final do experimento.

Apesar de tudo, em contraste com estudos em modelos mamíferos, o ensaio CAM, de forma geral, não levanta questões éticas e legais preocupantes, caso os experimentos estiverem em conformidade com as diretrizes éticas de manipulação e eutanásia de embriões aviários (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; AVMA, 2020). Muitas abordagens podem ser realizadas para a eutanásia de embriões de galinha após o ensaio CAM. O procedimento mais frequentemente utilizado é o congelamento dos ovos embrionados, porém, outros métodos já foram aplicados, como o rompimento da membrana e seus vasos sanguíneos, a administração intravenosa de anestésicos e a fixação *in ovo* com paraformaldeído (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; MCKENZIE *et al.*, 2015). Geralmente, há um consenso entre cientistas de que embriões que atinjam mais de 80% do tempo de incubação (~17 dias) devem ser sacrificados por métodos semelhantes aos de neonatos aviários, através de overdose anestésica, decapitação ou inalação de dióxido de carbono (CO₂). Ovos em estágios menos avançados de embriogênese podem ser sacrificados por exposição ao CO₂, resfriamento prolongado a 4°C ou congelamento a -20°C (AVMA, 2020).

5.5 Perspectivas futuras

5.5.1 Processo de validação no Brasil e no mundo

A maioria dos métodos alternativos passam por extensos procedimentos formais de validação e aceitação regulatória para serem empregados no meio científico de forma mais abrangente. Porém, um dos problemas do modelo CAM é o grande número de diferentes protocolos experimentais disponíveis na literatura e a complexidade de certas metodologias, o que gera uma falta de padronização e dificulta sua reprodutibilidade laboratorial, impactando negativamente seu uso em maior escala (ESKES *et al.*, 2005). A harmonização desses protocolos talvez permitiria a validação de um maior número de ensaios realizados com a CAM, aumentando assim sua aplicação em diversas áreas, como pesquisa básica, avaliação de toxicidade para diferentes finalidades, controle de qualidade, entre outras.

A necessidade de estudos rigorosos e eficazes é fundamental para que produtos seguros sejam lançados no mercado. De acordo com o *Food and Drug Administration*, estudos pré-clínicos sobre atividade angiogênica e toxicidade de medicamentos, cosméticos e substâncias químicas em geral podem ser avaliados em diferentes modelos experimentais, dentre eles, a CAM de embriões de galinha e a córnea de coelhos, representados pelo ensaio HET-CAM e pelo teste de irritação ocular de Draize, respectivamente (FDA, 2001). Embora o teste de Draize ainda seja o modelo convencional para estudos de toxicidade e irritação ocular, ele tem sofrido muitas críticas nos últimos anos devido ao seu caráter altamente controverso, já que os animais podem sofrer muita dor durante o teste (LEE; HWANG; LIM, 2017). Desse modo, o modelo CAM se mostra uma alternativa atraente para tal problemática, pois, além de não causar sofrimento animal desnecessário, diversos estudos já demonstraram que existe uma grande correlação entre os efeitos induzidos na CAM e na córnea de coelhos, o que comprova sua eficácia como modelo organotípico para predição de propriedades de irritação ocular de produtos (KISHORE *et al.*, 2008; NÓBREGA *et al.*, 2008).

Atualmente, dentre as diversas metodologias que utilizam a CAM como modelo experimental, o HET-CAM é o que possui maior potencial para ser aceito internacionalmente pelos órgãos de validação de métodos de pesquisa alternativos, devido à sua ampla aplicabilidade e implementação em estudos de toxicidade e irritabilidade cutânea e ocular, principalmente na área de cosméticos. De fato, o HET-CAM já foi submetido a diversos estudos de validação por agências regulatórias reconhecidas mundialmente, como ICCVAM e ECVAM, e é um método bem aceito em países como França, Alemanha, Reino Unido e Holanda para a

identificação de corrosivos oculares e produtos irritantes (ABDELKADER *et al.*, 2015; CANCIAN *et al.*, 2014; ICCVAM, 2010). Dessa forma, dependendo do contexto regulatório de cada país, este ensaio pode ser considerado um substituto para o teste de Draize para a elucidação da toxicidade de substâncias químicas (OECD, 2019).

Apesar de ser comumente aplicado em análises laboratoriais rotineiras e avaliações da segurança de formulações e produtos, o HET-CAM ainda não é recomendado para rotulagem e classificação de substâncias potencialmente tóxicas, uma vez que ainda não foi normalizado internacionalmente como uma alternativa absoluta ao teste de Draize e existem algumas diferenças nos sistemas de classificação em vários países e regiões (ESKES *et al.*, 2005; SCHEEL *et al.*, 2011). Além disso, como o processo de irritação ocular, dérmica ou de mucosas é bastante complexo e envolve diversos mecanismos celulares, morfológicos e moleculares, apenas este ensaio não é suficiente para uma completa elucidação. O ideal é incluir estratégias que utilizem um conjunto de métodos *in vitro* que forneçam informações complementares e necessárias na investigação dos riscos de toxicidade e irritabilidade de uma determinada substância (SCOTT *et al.*, 2010).

Recentemente, em 2015, o início do processo de validação do HET-CAM no Brasil foi proposto, por meio de uma iniciativa do BraCVAM em colaboração com o RENAMA e o CONCEA, se tornando o primeiro estudo para fins regulatórios de um método alternativo realizado no país, que conta com a participação de diversos laboratórios brasileiros e com parcerias de instituições científicas internacionais (ÁVILA; VALADARES, 2019). O objetivo principal, além de validar o uso do HET-CAM no país, é promover o treinamento dos órgãos regulatórios, servindo como ponto de partida para ampliação da visibilidade do BraCVAM no cenário internacional e para a participação mais ativa do Brasil nos processos de validação de métodos alternativos, o que pode potencializar sua colaboração científica neste campo (PRESGRAVE *et al.*, 2016).

Apesar de ainda não ser validado no país, o HET-CAM já é um método aceito e sugerido pela ANVISA para fornecer informações a respeito do potencial de irritação ocular de produtos cosméticos, de forma complementar a outros métodos *in vitro* bem estabelecidos, como testes de opacidade e permeabilidade vascular (BCOP) e de citotoxicidade (NRU, MTT, RBC), que avaliam diferentes parâmetros para confirmação do efeito irritante e agregam subsídios para garantir a segurança desses produtos (ANVISA, 2012).

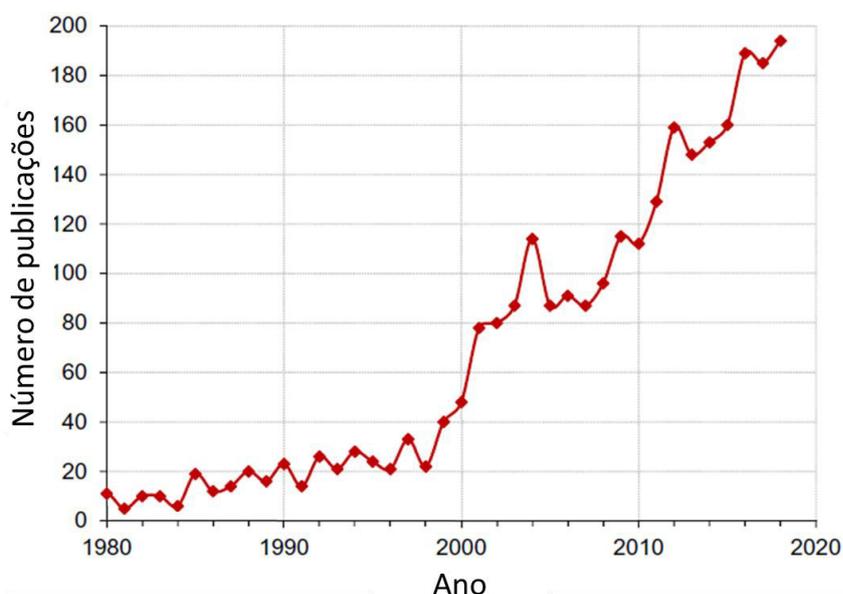
O ensaio HET-CAM, uma vez validado, poderá, então, ser regulamentado e empregado rotineiramente em laboratórios, pode representar uma economia de até cerca de 70% para o país, uma vez que o uso dispendioso com animais não seria mais necessário (ÁVILA;

VALADARES, 2019; PRESGRAVE *et al.*, 2016). Dito isso, fica claro que o processo de validação de qualquer método alternativo para a avaliação da segurança de substâncias e produtos pode funcionar como um fator de desenvolvimento científico e tecnológico, além de competitividade para as indústrias cosméticas e farmacêuticas.

5.5.2 Tendência crescente no número de estudos publicados

Como apontado por Tamanoi *et al.* (2019), tem-se visto um aumento considerável no número de publicações científicas envolvendo o uso da técnica CAM ao longo dos anos, principalmente nas últimas duas décadas (Gráfico 1). Prado e colaboradores (2019) também perceberam essa tendência, verificando que os artigos referentes a este tópico são geralmente publicados em revistas e áreas de conhecimento relevantes para a comunicação científica.

Gráfico 1 – Número de artigos publicados entre os anos de 1980 e 2018 relacionados aos ensaios com a membrana corioalantoide.



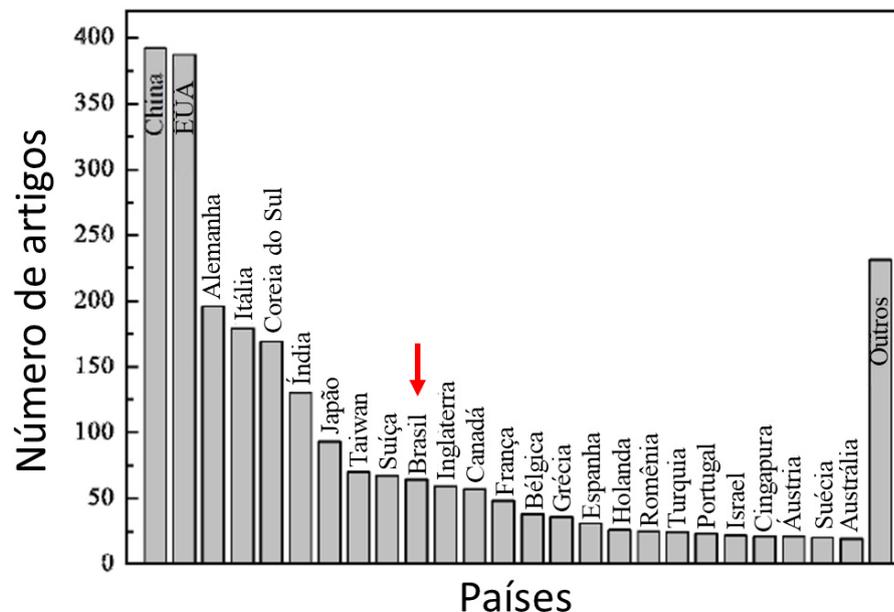
Fonte: Tamanoi *et al.* (2019).

Estas constatações estão intrinsecamente relacionadas ao fato de que a CAM apresenta inúmeras vantagens em relação aos outros modelos *in vivo*, como já discutido anteriormente. O crescente interesse pela busca de novas metodologias que minimizem o uso de animais em experimentos também destaca este modelo em relação aos demais. Embora o ensaio CAM seja uma abordagem clássica, que não necessita de muita infraestrutura e suporte financeiro para ser realizada, ele é um método bem aceito pela comunidade científica de forma geral. Ele também tem ganhado atenção pois nenhuma dor é acometida aos embriões, o que

reduz as preocupações éticas ao empregar diferentes protocolos (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014).

De acordo com o Gráfico 2, que apresenta uma análise da utilização do ensaio CAM em âmbito mundial, a maioria dos artigos referentes ao modelo são publicados principalmente por países como Estados Unidos e China. Previsivelmente, isso reflete o fato de a produção científica das nações estar, em parte, relacionada às características socioeconômicas de cada país, o que demonstra a influência do financiamento da pesquisa na produção científica. Em contrapartida, o Brasil tem se destacado nesse quesito, encontrando-se entre os 25 países com maior número de publicações, além ser um dos que apresentam maior quantidade de parcerias internacionais envolvendo a aplicação da CAM em pesquisa (PRADO *et al.*, 2019).

Gráfico 2 – Número de publicações relativas ao ensaio CAM por país.



A seta vermelha destaca a posição do Brasil como um dos 25 países com maior número de publicações relacionadas ao ensaio CAM. Fonte: Prado *et al.* (2019).

Conforme observado por Prado *et al.* (2019), embora redes de colaboração internacional não sejam comuns em estudos que usam esse tipo de modelo, as poucas que existem podem incentivar mais pesquisadores a participar de maneira mais ativa na pesquisa dessa área como forma de aumentar a produtividade e promover uma melhor aplicação dos recursos financeiros. De fato, a colaboração científica internacional só tem aumentado em volume e importância ao longo dos anos (LEE; BOZEMAN, 2005), o que promove uma maior diversificação e ampliação das áreas de conhecimento onde as pesquisas relacionadas à CAM podem ser aplicadas.

O crescente número de artigos relacionados a este assunto que são submetidos por pesquisadores brasileiros mostra que o Brasil está ciente da importância do princípio dos 3Rs, e que métodos alternativos como este representam, além dos aspectos éticos, uma forma de incentivo para o desenvolvimento científico e inovação tecnológica no país. A partir dessas observações, é possível acreditar que, nos próximos anos, o uso do ensaio CAM no Brasil e no mundo crescerá ainda mais, já que o debate sobre o uso de métodos alternativos aos testes em animais está se fortalecendo e ganhando ênfase na comunidade científica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta revisão, demonstrou-se que o ensaio da membrana corioalantoide (CAM) de embriões de galinha apresenta inúmeras vantagens em comparação a outros modelos *in vivo* comumente utilizados em pesquisas. Os benefícios dessa técnica em termos de baixo custo, simplicidade técnica, alta reprodutibilidade e mínimas preocupações éticas a tornam um ótimo modelo experimental alternativo para aplicação em diversas áreas no âmbito científico.

A partir do que foi exposto, o modelo CAM já foi utilizado com eficácia para analisar diferentes respostas vasculares e explorar questões relacionadas à morfogênese e fisiologia de vasos sanguíneos. Dependendo do propósito do estudo, pode-se aplicar abordagens *in ovo* ou *ex ovo* para o cultivo dos embriões. A composição vascularizada do tecido e a fácil acessibilidade da CAM para manipulações experimentais permitem que este modelo *in vivo* seja bastante eficaz em triagens pré-clínicas e estudos sobre funções vasculares e angiogênese. O uso do ensaio CAM no estudo desses processos fisiológicos foi evidenciado por diversos trabalhos descritos na literatura, especialmente nas áreas de bioengenharia, biologia de transplantes, pesquisas sobre câncer, toxicologia e farmacologia, comprovando sua versatilidade como modelo experimental.

Apesar do grande volume de informações proporcionadas por testes *in vitro*, a experimentação *in vivo* ainda oferece um valor preditivo mais confiável na avaliação das respostas fisiológicas. Porém, os ensaios *in vivo*, principalmente com modelos mamíferos, geralmente são dispendiosos e requerem profissionais capacitados e aprovações por comitês de ética, limitando assim o número de testes que podem ser realizados prontamente. Nessa perspectiva, a CAM representa uma ferramenta atraente e valiosa tanto em termos de economia quanto de praticidade. Além disso, ao contrário de outros modelos *in vivo*, o ensaio CAM é minimamente invasivo e não causa dor ou desconforto para o embrião de galinha, sendo considerado, portanto, um modelo de refinamento para a pesquisa animal.

O modelo CAM ainda possui algumas limitações e talvez não seja capaz de substituir por si só os testes *in vivo* convencionais. Por outro lado, ele pode contribuir significativamente para a redução do número de animais necessários, bem como limitar o sofrimento destes durante experimentos científicos, já que é amplamente utilizado como modelo alternativo para diversos tipos de estudos. Não obstante, é importante que a experimentação com embriões de galinha também seja metodicamente refinada, de modo a reduzir o número de embriões usados por meio de um planejamento experimental adequado.

Frente às mudanças atuais de incentivo ao uso de modelos alternativos e o constante

desenvolvimento de novas metodologias para a experimentação animal, o mundo tem avançado bastante neste aspecto, e de forma bastante progressiva, como exemplificado pela inclusão do método HET-CAM no arsenal de alternativas inovadoras ao teste de Draize para avaliação da irritação ocular de substâncias. Apesar de não ter sido adotado formalmente em todo o mundo, o HET-CAM já passou por extensos estudos de validação, tem sido bastante utilizado em países de referência tecnocientífica e é um dos métodos alternativos mais promissores para obter aceitação regulatória internacional de acordo com os critérios de compêndios oficiais.

Nas últimas duas décadas, houve um interesse crescente por este modelo, como ficou evidente pelo aumento dramático do número de publicações a seu respeito. Embora seja uma técnica simples e elaborada há mais de um século, o ensaio CAM ainda é muito utilizado em pesquisas de vários países com avançada infraestrutura tecnocientífica, como Estados Unidos e China. Possivelmente seu emprego no Brasil se ampliará cada vez mais, principalmente devido à popularização desse modelo em estudos pré-clínicos nas áreas farmacêuticas e cosméticas, bem como a participação mais ativa do país nos processos de validação de métodos alternativos e sua colaboração na produção científica internacional.

Diante deste cenário, o principal desafio dos setores industriais, laboratórios independentes e centros de validação que apresentam interesse no ensaio CAM é desenvolver estratégias que estimulem ainda mais a produção científica associada a esta técnica e que comprovem sua eficácia e confiabilidade. Isso poderá ser construído com base na otimização das metodologias disponíveis e a promoção do investimento em pesquisas inovadoras por parte de órgãos públicos e privados. Ainda há muito trabalho a ser feito, o que exigirá grande esforço da comunidade científica. Além disso, espera-se que as informações apresentadas nesta revisão também possam viabilizar o embasamento e o aprimoramento de futuras pesquisas e auxiliar pesquisadores interessados no ensaio CAM a identificar se este método específico é adequado para o propósito de seus estudos científicos.

Por fim, considerando a temática discutida neste estudo, a CAM, de forma geral, se mostra um excelente modelo preditivo para estudos pré-clínicos, podendo atuar como ensaio complementar aos testes *in vitro*, avaliando os parâmetros necessários antes de prosseguir para experimentos com modelos *in vivo*. Dito isto, o ensaio CAM é merecidamente uma técnica importante, grandes contribuições para o conhecimento científico resultaram de seu uso e, sem dúvida, continuará a ser um método alternativo bastante eficaz na pesquisa básica e aplicada.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o ensaio CAM representa uma ferramenta promissora para estudos investigativos sobre angiogênese e atividade vascular, combinando as vantagens dos sistemas complexos *in vivo* com a simplicidade e praticidade dos ensaios *in vitro* e servindo como modelo aplicável em diversas áreas da pesquisa básica e aplicada. Além disso, é uma técnica bem aceita pela comunidade científica, exigindo mínimas preocupações éticas, o que evidencia seu potencial como método experimental alternativo ao uso de animais em pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, H.; PIERSCIONEK, B.; CAREW, M.; WU, Z.; ALANY, R. G. Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals. **British Medical Bulletin**, v. 113, n. 1, p. 59-71, 2015.
- ABREU, C. L. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Metodologias Alternativas à Experimentação Animal: Aplicação no Controle da Qualidade de Produtos sujeitos à Ação da Vigilância Sanitária. **Revista CFMV**, n. 45, p. 15-23, 2008.
- ADLER, S.; BASKETTER, D.; CRETON, S.; PELKONEN, O.; VAN BENTHEM, J.; ZUANG, V.; ANDERSEN, K. E.; ANGERS-LOUSTAU, A.; APTULA, A.; BAL-PRICE, A.; BENFENATI, E.; BERNAUER, U.; BESSEMS, J.; BOIS, F. Y.; BOOBIS, A.; BRANDON, E.; BREMER, S.; BROSHARD, T.; CASATI, S.; COECKE, S.; CORVI, R.; CRONIN, M.; DASTON, G.; DEKANT, W.; FELTER, S.; GRIGNARD, E.; GUNDERT-REMY, U.; HEINONEN, T.; KIMBER, I.; KLEINJANS, J.; KOMULAINEN, H.; KREILING, R.; KREYSA, J.; LEITE, S. B.; LOIZOU, G.; MAXWELL, G.; MAZZATORTA, P.; MUNN, S.; PFUHLER, S.; PHRAKONKHAM, P.; PIERSMA, A.; POTH, A.; PRIETO, P.; REPETTO, G.; ROGIERS, V.; SCHOETERS, G.; SCHWARZ, M.; SERAFIMOVA, R.; TÄHTI, H.; TESTAI, E.; VAN DELFT, J.; VAN LOVEREN, H.; VINKEN, M.; WORTH, A.; ZALDIVAR, J. M. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 5, p. 367-485, 2011.
- ALEEM, A. R.; SHAHZADI, L.; TEHSEEN, S.; ALVI, F.; CHAUDHRY, A. A.; UR REHMAN, I.; YAR, M. Amino acids loaded chitosan/collagen based new membranes stimulate angiogenesis in chorioallantoic membrane assay. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 401-406, 2019.
- ALEKSANDROWICZ, E.; HERR, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 32, n. 2, p. 143-147, 2015.
- ALVES, M. J. M., COLLI, W. Experimentação com animais: Uma polêmica sobre o trabalho científico. **Ciência Hoje**, v. 39, n. 231, p. 25-29, 2006.
- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, supl. 1, p. e20170238, 2019.
- ANDRADE, L. S.; SILVA, H. D. F.; NEVES, T. S.; SOARES, W. F. S.; GOMES, A. P.; JÁCOME, M. Q. D. Experiências científicas com animais: problema ou solução? **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 7, n. 3, p. 378-389, 2019.
- ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012. 71 p.
- AUERBACH, R.; AKHTAR, N.; LEWIS, R. L.; SHINNERS, B. L. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 19, n. 1-2, p. 167-172, 2000.
- AUSPRUNK, D. H.; KNIGHTON, D. R.; FOLKMAN, J. Vascularization of normal and

neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. **The American Journal of Pathology**, v. 79, n. 3, p. 597, 1975.

AUSPRUNK, D. H.; KNIGHTON, D. R.; FOLKMAN, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. **Developmental Biology**, v. 38, n. 2, p. 237-248, 1974.

ÁVILA, R. I.; VALADARES, M. C. Brazil moves toward the replacement of animal experimentation. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 47, n. 2, p. 71-81, 2019.

AVMA. **Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition**. American Veterinary Medical Association, 2020. Disponível em: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2020.

AVRAM, S.; GHIULAI, R.; PAVEL, I. Z.; MIOC, M.; BABUTA, R.; VOICU, M.; CORICOVAC, D.; DANCIU, C.; DEHELEAN C.; SOICA, C. Phytocompounds Targeting Cancer Angiogenesis Using the Chorioallantoic Membrane Assay. *In*: BADRIA, F. A. (ed.). **Natural Products and Cancer Drug Discovery**. InTechOpen, 2017. cap. 3, p. 45-66.

BAIGUERA, S.; MACCHIARINI, P.; RIBATTI, D. Chorioallantoic membrane for *in vivo* investigation of tissue-engineered construct biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 5, p. 1425-1434, 2012.

BALČIŪNIENĖ, N.; TAMAŠAUSKAS, A.; VALANČIŪTĖ, A.; DELTUVA, V.; VAITIEKAITIS, G.; GUDINAVIČIENĖ, I.; WEIS, J.; GRAF VON KEYSERLINGK, D. Histology of human glioblastoma transplanted on chicken chorioallantoic membrane. **Medicina**, v. 45, n. 2, p. 123, 2009.

BALKE, M.; NEUMANN, A.; KERSTING, C.; AGELOPOULOS, K.; GEBERT, C.; GOSHEGER, G.; BUERGER, H.; HAGEDORN, M. Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 58, 2010.

BALLS, M.; COMBES, R. Animal experimentation and alternatives: revealed preferences. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 45, n. 1, p. 1-3, 2017.

BATISTA-DUHARTE, A.; JORGE MURILLO, G.; PÉREZ, U. M.; TUR, E. N.; PORTUONDO, D. F.; MARTÍNEZ, B. T.; TÉLLEZ-MARTÍNEZ, D.; BETANCOURT, J. E.; PÉREZ, O. The hen's egg test on chorioallantoic membrane: an alternative assay for the assessment of the irritating effect of vaccine adjuvants. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 627-633, 2016.

BAUM, O.; SUTER, F.; GERBER, B.; TSCHANZ, S.A.; BUERGY, R.; BLANK, F.; HLUSHCHUK, R.; DJONOV, V. VEGF-A promotes intussusceptive angiogenesis in the developing chicken chorioallantoic membrane. **Microcirculation**, v. 17, n. 6, p. 447-457, 2010.

BENDER, C.; PARTECKE, L. I.; KINDEL, E.; DÖRING, F.; LADEMANN, J.; HEIDECKE, C. D.; KRAMER, A.; HÜBNER, N. O. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. **Toxicology in Vitro**, v.

25, n. 2, p. 530-537, 2011.

BERTOSSI, M.; VIRGINTINO, D.; COLTEY, P.; ERREDE, M.; MANCINI, L.; RONCALI, L. Angiogenesis and endothelium phenotype expression in embryonic adrenal gland and cerebellum grafted onto chorioallantoic membrane. **Angiogenesis**, v. 3, n. 4, p. 305-315, 1999.

BJØRNSTAD, S.; AUSTDAL, L. P. E.; ROALD, B.; GLOVER, J. C.; PAULSEN, R. E. Cracking the egg: potential of the developing chicken as a model system for nonclinical safety studies of pharmaceuticals. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 355, n. 3, p. 386-396, 2015.

BOTTINI, A. A.; ALEPEE, N.; PHILLIPS, B.; GRIBALDO, L.; DE SILVA, O.; HARTUNG, T.; HENDRIKSEN, C.; KUIL, J.; PAZOS, P.; RHEIN, C.; SCHIFFELERS, M. J.; STOKES, W.; THEOBALD, A.; VIDAL, J.M.; VAN DE SANDT, H.; BREIER, S.; SINTES, J. R.; BLAAUBOER, B. Optimisation of the post-validation process: The report and recommendations of ECVAM Workshop 67. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 36, n. 3, p. 353-366, 2008.

BRASIL. Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF: República Federativa do Brasil, 16 jul. 2009.

BURT, H. M.; JACKSON, J. K.; BAINS, S. K.; LIGGINS, R. T.; OKTABA, A. M. C.; ARSENAULT, A. L.; HUNTER, W. L. Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid). **Cancer Letters**, v. 88, n. 1, p. 73-79, 1995.

BUSCHMANN, I.; SCHAPER, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. **Physiology**, v. 14, n. 3, p. 121-125, 1999.

CANCIAN, M. D. L.; LEONARDI, M. S.; MOSCA, M. M.; GUERRA, L. O.; HENGELTRAUB, S. F.; LEONARDI, G. R. Safety assessment of cosmetic products, with emphasis on the ocular area: regulatory aspects and validation processes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 667-676, 2014.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 653-660, 2003.

CARRE, A. L.; LARSON, B. J.; KNOWLES, J. A.; KAWAI, K.; LONGAKER, M. T.; LORENZ, H. P. Fetal mouse skin heals scarlessly in a chick chorioallantoic membrane model system. **Annals of Plastic Surgery**, v. 69, n. 1, p. 85-90, 2012.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L. C.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CAZEDEY, E. C. L.; CARVALHO, F. C.; FIORENTINO, F. A. M.; GREMIÃO, M. P. D.; SALGADO, H. R. N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 759-766, 2009.

CHIBA, A.; YUI, C.; HIRANO, S. Liver reconstruction on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. **Archives of Histology and Cytology**, v. 73, n. 1, p. 45-53, 2010.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 19-30, 2009.

CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D.; RAICA, M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. **Angiogenesis**, v. 11, p. 311-319, 2008.

CIOLOFAN, A.; CREȚU, O. M.; MOGOANTĂ, S. Ș.; CIUCĂ, E. M. The tyrosine kinase inhibitors effects on metastatic tumor graft in the chick chorioallantoic membrane assay. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 58, n. 4, p. 1257-1262, 2017.

COELHO, C. C.; GRENHO, L.; GOMES, P. S.; QUADROS, P. A.; FERNANDES, M. H. Nano-hydroxyapatite in oral care cosmetics: Characterization and cytotoxicity assessment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

CONCEA. **Normativas do CONCEA**: Produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. 3. ed. Brasília: MCTIC, 2016. *E-book*. Disponível em: <https://www.ceua.ufv.br/wp-content/uploads/2018/08/NORMATIVAS-DO-CONCEA-3%C2%AA-EDI%C3%87%C3%83O2.pdf>. Acesso em: 10 set. 2020.

CORDEIRO, C. M. M.; HINCKE, M. T. Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 11-25, 2016.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CRUZ, S. M.; ANGELIS, L. H. Alternativas aos testes de segurança de cosméticos em animais. **Pós em Revista do Centro Universitário Newton Paiva**, v. 5, p. 195-202, 2012.

DA-LOZZO, E. J.; MOLEDO, R. C. A.; FARACO, C. D.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; BRESOLIN, T. M. B.; SILVEIRA, J. L. M. Curcumin/xanthan-galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 279-284, 2013.

DANESHIAN, M.; BUSQUET, F.; HARTUNG, T.; LEIST, M. Animal use for science in Europe. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 32, n. 4, p. 261-274, 2015.

DAVEY, M. G.; TICKLE, C. The chicken as a model for embryonic development. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, n. 1-4, p. 231-239, 2007.

DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. **Toxicology in Vitro**, v. 45, p. 393-396, 2017.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules. **Methods in Enzymology**, v. 444, p. 21-41, 2008.

DOHLE, D. S.; PASA, S. D.; GUSTMANN, S.; LAUB, M.; WISSLER, J. H.; JENNISSEN, H. P.; DÜNKER, N. Chick *ex ovo* culture and *ex ovo* CAM assay: how it really works. **Journal of Visualized Experiments**, n. 33, p. e1620, 2009.

DÜNKER, N.; JENDROSSEK, V. Implementation of the Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Radiation Biology and Experimental Radiation Oncology Research. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1499, 2019.

EGOSHI, C. T.; ZERBINI, D.; UTUMI, P. H.; STUELP-CAMPELO, P. M.; ZISCHLER, L. C. M.; MORENO-AMARAL, A. N.; ELIFIO-ESPOSITO, S. Quantificação da angiogênese induzida por tumor em membrana corioalantóica de embrião de galinha. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 303-310, 2015.

EJAZ, S.; CHEKAROVA, I.; ASHRAF, M.; LIM, C. W. A novel 3-D model of chick chorioallantoic membrane for ameliorated studies in angiogenesis. **Cancer Investigation**, v. 24, n. 6, p. 567-575, 2006.

ESKES, C.; BESSOU, S.; BRUNER, L.; CURREN, R.; HARBELL, J.; JONES, P.; KREILING, R.; LIEBSCH, M.; MCNAMEE, P.; PAPE, W.; PRINSEN M. K.; SEIDLE, T.; VANPARYS, P.; WORTH, A.; ZUANG, V. Eye irritation. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 1, p. 47-81, 2005.

FDA. WOUND HEALING CLINICAL FOCUS GROUP. Guidance for industry: Chronic cutaneous ulcer and burn wounds-developing products for treatment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 4, p. 258-268, 2001.

FERICIAN, O.; CIMPEAN, A. M.; AVRAM, S.; RAICA, M. Endostatin effects on tumor cells and vascular network of human renal cell carcinoma implanted on chick embryo chorioallantoic membrane. **Anticancer Research**, v. 35, n. 12, p. 6521-6528, 2015.

FERNANDES, M. R.; PEDROSO, A. R. Experimentação animal: um olhar sobre ética, bem-estar e métodos alternativos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 11, p. 923-928, 2017.

FERNÁNDEZ-FERREIRO, A.; GONZÁLEZ, M. B.; GIL, M. M.; BLANCO, J. M.; LAMAS, M. D.; OTERO, F. E. Analysis of ocular toxicity of fluconazole and voriconazole eyedrops using HET-CAM. **Farmacia Hospitalaria**, v. 38, n. 4, p. 300-304, 2014.

FRIEND, J. V.; CREVEL, R. W. R.; WILLIAMS, T. C.; PARISH, W. E. Immaturity of the inflammatory response of the chick chorioallantoic membrane. **Toxicology in Vitro**, v. 4, n. 4-5, p. 324-326, 1990.

GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-12, 2010.

GABRIELLI, M. G.; MATERAZZI, G.; BONDI, A. M.; MENGHI, G. Developmental expression of glycocomponents in the chick chorioallantoic membrane. **Anatomy and Embryology**, v. 207, n. 1, p. 63-71, 2003.

GAGLIARDI, A.; COLLINS, D. C. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. **Cancer Research**, v. 53, n. 3, p. 533-535, 1993.

GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 416 p.

GILBERT, A. B. Aves domésticas. *In*: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. cap 21, p. 488-514.

GIROLAMO, F.; ELIA, G.; ERREDE, M.; VIRGINTINO, D.; CANTATORE, S.; LORUSSO, L.; RONCALI, L.; BERTOSSI, M.; AMBROSI, L. *In vivo* assessment of epichlorohydrin effects: the chorioallantoic membrane model. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 1, p. BR21-BR27, 2005.

GOODPASTURE, E. W.; WOODRUFF, A. M.; BUDDINGH, G. J. The cultivation of vaccinia and other viruses in the chorioallantoic membrane of chick embryos. **Science**, v. 74, n. 1919, p. 371-372, 1931.

GRONAU, S.; THESS, B.; RIECHELMANN, H.; FISCHER, Y.; SCHMITT, A.; SCHMITT, M. An autologous system for culturing head and neck squamous cell carcinomas for the assessment of cellular therapies on the chorioallantoic membrane. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck**, v. 263, p. 308–312, 2006.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217-224, 2016.

HAGINO, S.; ITAGAKI, H.; KATO S.; KOBAYASHI, T.; TANAKA, M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. **Toxicology in Vitro**, v. 5, n. 4, p. 301-304, 1991.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HAN, S.Y.; HAN, H.B.; TIAN, X.Y.; SUN, H.; XUE, D.; ZHAO, C.; JIANG, S.T.; HE, X.R.; ZHENG, W.X.; WANG, J.; PANG, L.N.; LI, X.H.; LI, P.P. MicroRNA-33a-3p suppresses cell migration and invasion by directly targeting PBX3 in human hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42461–42473, 2016.

HARNOSS, J. C.; ELRUB, Q. M. A.; JUNG, J. O.; KOBURGER, T.; ASSADIAN, O.; DISSEMOND, J.; BAGUHL, R.; PAPKE, R.; KRAMER, A. Irritative potency of selected wound antiseptics in the hen's egg test on chorioallantoic membrane to predict their compatibility to wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 27, n. 2, p. 183-189, 2019.

HARTUNG, T. Opinion versus evidence for the need to move away from animal testing. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 34, n. 2, p. 193-200, 2017.

HASELGRÜBLER, R.; STADLBAUER, V.; STÜBL, F.; SCHWARZINGER, B.; RUDZIONYTE, I.; HIMMELSBACH, M.; IKEN, M.; WEGHUBER, J. Insulin Mimetic Properties of Extracts Prepared from *Bellis perennis*. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2605, 2018.

HOLDEN, C. Cosmetics firms drop Draize test. **Science**, v. 245, n. 4914, p. 125-125, 1989.

HU, G. Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 17, p. 9791-9795, 1998.

HUANG, W.; ITAYAMA, M.; ARAI, F.; FURUKAWA, K.S.; USHIDA, T.; KAWAHARA, T. An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on chicken chorioallantoic membrane. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175595, 2017.

IACUC. **The Use of Chicken/Avian Embryos**. Institutional Animal Care and Use Committee Policies and Procedures, University of Louisville, 2019. Disponível em: <https://louisville.edu/research/iacuc/policy-files/UseofChickenAvianEmbryos>. Acesso em: 26 out. 2020.

ICCVAM. Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. *In: ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current validation status of *in vitro* test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products*. NIH Publication No. 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010. ap. B3, p. 30–38.

JAIN, K.; GUPTA, U.; JAIN, N. K. Dendronized nanoconjugates of lysine and folate for treatment of cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 3, p. 500-509, 2014.

JEFFERIES, B.; LENZE, F.; SATHE, A.; TRUONG, N.; ANTON, M.; EISENHART-ROTHE, R.; NAWROTH, R.; MAYER-KUCKUK, P. Non-invasive imaging of engineered human tumors in the living chicken embryo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

JI, L.; MELKONIAN, G.; RIVELES, K.; TALBOT, P. Identification of pyridine compounds in cigarette smoke solution that inhibit growth of the chick chorioallantoic membrane. **Toxicological Sciences**, v. 69, n. 1, p. 217-225, 2002.

JIRA, D.; JANOUSEK, S.; PIKULA, J.; VITULA, F.; KEJLOVA, K. Toxicity hazard of organophosphate insecticide malathion identified by *in vitro* methods. **Neuroendocrinology Letters**, v. 33, supl. 3, p. 53-59, 2012.

KAIN, K. H.; MILLER, J. W.; JONES-PARIS, C. R.; THOMASON, R. T.; LEWIS, J. D.; BADER, D. M.; BARNETT, J. V.; ZIJLSTRA, A. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 2, p. 216-228, 2014.

KALIRAI, H.; SHAHIDIPOUR, H.; COUPLAND, S.E.; LUYTEN, G. Use of the Chick Embryo Model in Uveal Melanoma. **Ocular Oncology and Pathology**, v. 1, n. 3, p. 133-140, 2015.

KANCZLER, J. M.; MORENO, I.; HULSART-BILLSTRÖM, G.; INGLIS, S.; OREFFO, R. O. C. Bridging the Gap: Organotypic and Chorioallantoic Membrane Models in Biomaterials and Tissue Engineering Research. *In: DUCHEYNE, P. (ed.). Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier, 2017. p. 267-286.

- KEHINDE, E. O. They see a rat, we seek a cure for diseases: the current status of animal experimentation in medical practice. **Medical Principles and Practice**, v. 22, supl. 1, p. 52-61, 2013.
- KISHORE, A. S.; SUREKHA, P. A.; SEKHAR, P. V. R.; SRINIVAS, A.; MURTHY, P. B. Hen egg chorioallantoic membrane bioassay: an *in vitro* alternative to draize eye irritation test for pesticide screening. **International Journal of Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 449-453, 2008.
- KNIGHT, R. B.; DVORCAKOVA, S.; LUPTAKOVA, L.; VDOVIAKOVA, K.; PETRILLA, V.; PETROVOVA, E. Evaluation of vasoactivity after haemotoxic snake venom administration. **Toxicon**, v. 158, p. 69-76, 2019.
- KNIGHTON, D. R.; FIEGEL, V. D.; PHILLIPS, G. D. The assay of angiogenesis. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 365, p. 291, 1991.
- KNOP, L. B.; MARIA, D. A. Métodos substitutivos e a experimentação animal: um enfoque inovador. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 2, n. 4, p. 101-114, 2016.
- KOMATSU, A.; MATSUMOTO, K.; SAITO, T.; MUTO, M.; TAMANOI, F. Patient derived chicken egg tumor model (PDcE model): current status and critical issues. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 440, 2019.
- KUE, C. S.; TAN, K. Y.; LAM, M. L.; LEE, H. B. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. **Experimental Animals**, p. 14-0059, 2015.
- KUNZ, P.; SCHENKER, A.; SÄHR, H.; LEHNER, B.; FELLEBERG, J. Optimization of the chicken chorioallantoic membrane assay as reliable *in vivo* model for the analysis of osteosarcoma. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215312, 2019.
- KUNZI-RAPP, K.; RÜCK, A.; KAUFMANN, R. Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term *in vivo* system for human skin. **Archives of Dermatological Research**, v. 291, n. 5, p. 290-295, 1999.
- LAGARTO, A.; VEGA, R.; GUERRA, I.; GONZÁLEZ, R. *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 5, p. 699-702, 2006.
- LEE, M.; HWANG, J. H.; LIM, K. M. Alternatives to *in vivo* Draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. **Toxicological Research**, v. 33, n. 3, p. 191-203, 2017.
- LEE, S.; BOZEMAN, B. The impact of research collaboration on scientific productivity. **Social Studies of Science**, v. 35, n. 5, p. 673-702, 2005.
- LEENE, W.; DUYZINGS, M. J. M.; VAN STEEG, C. Lymphoid stem cell identification in the developing thymus and bursa of Fabricius of the chick. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 136, n. 4, p. 521-533, 1973.

LEIGHTON, J.; NASSAUER, J.; TCHAO, R. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 293-298, 1985.

LEONG, H. S.; STEINMETZ, N. F.; ABLACK, A.; DESTITO, G.; ZIJLSTRA, A.; STUHLMANN, H.; MANCHESTER, M.; LEWIS, J. D. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles. **Nature Protocols**, v. 5, n. 8, p. 1406-1417, 2010.

LEWIS, J. D.; DESTITO, G.; ZIJLSTRA, A.; GONZALEZ, M. J.; QUIGLEY, J. P.; MANCHESTER, M.; STUHLMANN, H. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. **Nature Medicine**, v. 12, n. 3, p. 354-360, 2006.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 127-134, 2002.

LING, T. Y.; LIU, Y. L.; HUANG, Y. K.; GU, S. Y.; CHEN, H. K.; HO, C. C.; TSAO, P. N.; TUNG, Y. C.; CHEN, H. W.; CHENG, C. H.; LIN K. H.; LIN, F. H. Differentiation of lung stem/progenitor cells into alveolar pneumocytes and induction of angiogenesis within a 3D gelatin–Microbubble scaffold. **Biomaterials**, v. 35, n. 22, p. 5660-5669, 2014.

LIRA, M. G. S.; CANTANHÊDE, L. G.; MIRANDA, G. S.; NETA, R. N. F. C. Bioética e uso de animais invertebrados em pesquisa: uma abordagem histórico-legislativa. **Investigação**, v. 15, n. 1, p. 143-149, 2016.

LOKMAN, N. A.; ELDER, A. S.; RICCIARDELLI, C.; OEHLER, M. K. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9959-9970, 2012.

LORENZO-VEIGA, B.; SIGURDSSON, H. H.; LOFTSSON, T.; & ALVAREZ-LORENZO, C. Cyclodextrin–Amphiphilic Copolymer Supramolecular Assemblies for the Ocular Delivery of Natamycin. **Nanomaterials**, v. 9, n. 5, p. 745, 2019.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

MAACHA, S.; SAULE, S. Evaluation of tumor cell invasiveness *in vivo*: the chick chorioallantoic membrane assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 1749, p. 71-77, 2018.

MAAS, J. W.; LE NOBLE, F. A.; DUNSELMAN, G. A.; DE GOEIJ, A. F.; BOUDIER, H. A. S.; EVERS, J. L. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to investigate the angiogenic properties of human endometrium. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 48, n. 2, p. 108-112, 1999.

MAKSIMOV, V. F.; KOROSTYSHEVSKAYA, I. M.; KURGANOV, S. A. Functional morphology of chorioallantoic vascular network in chicken. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 142, n. 3, p. 367-371, 2006.

MANDRACCHIA, D.; TRIPODO, G.; TRAPANI, A.; RUGGIERI, S.; ANNESE, T.; CHLAPANIDAS, T.; TRAPANI, G.; RIBATTI, D. Inulin based micelles loaded with

curcumin or celecoxib with effective anti-angiogenic activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 141-146, 2016.

MANSUR, M. C. P. P. R.; LEITÃO, S. G.; CERQUEIRA-COUTINHO, C., VERMELHO, A. B., SILVA, R. S., PRESGRAVE, O. A. F., LEITÃO, A. A. C.; LEITÃO, G. G.; RICCI-JÚNIOR, R.; SANTOS, E. P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 251-258, 2016.

MARQUARDT, C.; MATUSCHEK, C.; BÖLKE, E.; GERBER, P. A.; PEIPER, M.; SEYDLITZ-KURZBACH, J. V.; BUHREN, B. A.; VAN GRIENSVEN, M.; BUDACH W.; HASSAN, M.; KUKOVA, G; MOTA, R.; HÖFER, D.; ORTH, K.; FLEISCHMANN, W. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). **European Journal of Medical Research**, v. 15, n. 5, p. 204, 2010.

MCKENZIE, B.; KAY, G.; MATTHEWS, K. H.; KNOTT, R. M.; CAIRNS, D. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, p. 1-8, 2015.

MCNAMEE, P.; HIBATALLAH, J.; COSTABEL-FARKAS, M.; GOEBEL, C.; ARAKI, D.; DUFOUR, E.; HEWITT, N. J.; JONES, P.; KIRST, A.; LE VARLET, B.; MACFARLANE, M.; MARREC-FAIRLEY, M.; ROWLAND, J.; SCHELLAUF, F.; SCHEEL, J. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 197-209, 2009.

MEIGS, L.; SMIRNOVA, L.; ROVIDA, C.; LEIST, M.; HARTUNG, T. Animal testing and its alternatives - the most important omics is economics. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 35, n. 3, p. 275-305, 2018.

MELKONIAN, G.; MUNOZ, N.; CHUNG, J.; TONG, C.; MARR, R.; TALBOT, P. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. **Journal of Experimental Zoology**, v. 292, n. 3, p. 241-254, 2002.

MERCKX, G.; TAY, H.; LO MONACO, M.; VAN ZANDVOORT, M.; DE SPIEGELAERE, W.; LAMBRICHTS, I.; BRONCKAERS, A. Chorioallantoic membrane assay as model for angiogenesis in tissue engineering: Focus on stem cells. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, p. 1-21, 2020.

MOORE, M. The chorioallantoic membrane of chick embryos and its response to inoculation with some mycobacteria. **The American Journal of Pathology**, v. 18, n. 5, p. 827, 1942.

MORENO-JIMÉNEZ, I.; HULSART-BILLSTROM, G.; LANHAM, S. A.; JANECZEK, A. A.; KONTOULI, N.; KANCZLER, J. M.; EVANS, N. D.; OREFFO, R. O. C. The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

MORENO-JIMÉNEZ, I.; KANCZLER, J. M.; HULSART-BILLSTROM, G.; INGLIS, S.; OREFFO, R. O. The chorioallantoic membrane assay for biomaterial testing in tissue

engineering: a short-term *in vivo* preclinical model. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 23, n. 12, p. 938-952, 2017.

MORENO-JIMÉNEZ, I.; LANHAM, S. A.; KANCZLER, J. M.; HULSART-BILLSTROM, G.; EVANS, N. D.; OREFFO, R. O. Remodelling of human bone on the chorioallantoic membrane of the chicken egg: *De novo* bone formation and resorption. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 8, p. 1877-1890, 2018.

MURPHY, J. B.; ROUS, P. The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 15, n. 2, p. 119-132, 1912.

NAIK, M.; BRAHMA, P.; DIXIT, M. A Cost-Effective and Efficient Chick Ex-Ovo CAM Assay Protocol to Assess Angiogenesis. **Methods and Protocols**, v. 1, n. 2, p. 19, 2018.

NARBAITZ, R.; BASTANI, B.; GALVIN, N. J.; KAPAL, V. K.; LEVINE, D. Z. Ultrastructural and immunocytochemical evidence for the presence of polarised plasma membrane H⁺-ATPase in two specialised cell types in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Journal of Anatomy**, v. 186, n. 2, p. 245-252, 1995.

NASCIMENTO-GONÇALVES, E.; FERREIRA, R.; OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, B. J. A. An overview of current alternative models for use in the context of prostate cancer research. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 48, n. 2, p. 58-69, 2020.

NAZAROV, A. A.; BAQUIÉ, M.; NOWAK-SLIWINSKA, P.; ZAVA, O.; VAN BEIJNUM, J. R.; GROESSL, M.; CHISHOLM, D. M.; AHMADI, Z.; MCINDOE, J. S.; GRIFFIOEN, A. W.; VAN DEN BERGH, H.; DYSON, P. J. Synthesis and characterization of a new class of anti-angiogenic agents based on ruthenium clusters. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2013.

NÓBREGA, A. M.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. F.; DELGADO, I. F. Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos Métodos HET-CAM e RBC. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 6, n. 2, p. 103-120, 2008.

NORRBY, K. *In vivo* models of angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 588-612, 2006.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; ALITALO, K.; ALLEN, E.; ANISIMOV, A.; APLIN, A. C.; AUERBACH, R.; AUGUSTIN, H. G.; BATES, D. O.; VAN BEIJNUM, J. R.; BENDER, R. H. F.; BERGERS, G.; BIKFALVI, A.; BISCHOFF, J.; BÖCK, B. C.; BROOKS, P. C.; BUSSOLINO, F.; CAKIR, B.; CARMELIET, P.; CASTRANOVA, D.; CIMPEAN, A. M.; CLEAVER, O.; COUKOS, G.; DAVIS, G. E.; DE PALMA, M.; DIMBERG, A.; DINGS, R. P. M.; DJONOV, V.; DUDLEY, A. C.; DUFTON, N. P.; FENDT, S. M.; FERRARA, N.; FRUTTIGER, M.; FUKUMURA, D.; GHESQUIÈRE, B.; GONG, Y.; GRIFFIN, R. J.; HARRIS, A. L.; HUGHES, C. C. W.; HULTGREN, N. W.; IRUELA-ARISPE, M. L.; IRVING, M.; JAIN, R. K.; KALLURI, R.; KALUCKA, J.; KERBEL, R. S.; KITAJEWSKI, J.; KLAASSEN, I.; KLEINMANN, H. K.; KOOLWIJK, P.; KUCZYNSKI, E.; KWAK, B. R.; MARIEN, K.; MELERO-MARTIN, J. M.; MUNN, L. L.; NICOSIA, R. F.; NOEL, A.; NURRO, J.; OLSSON, A. K.; PETROVA, T. V.; PIETRAS, K.; PILI, R.; POLLARD, J. W.; POST, M. J.; QUAX, P. H. A.; RABINOVICH, G. A.; RAICA, M.; RANDI, A. M.; RIBATTI, D.; RUEGG, C.; SCHLINGEMANN, R. O.; SCHULTE-MERKER, S.; SMITH, L. E. H.;

SONG, J. W.; STACKER, S. A. STALIN, J.; STRATMAN, A. N.; VAN DE VELDE, M.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; VERMEULEN, P. B.; WALTENBERGER, J.; WEINSTEIN, B. M.; XIN, H.; YETKIN-ARIK, B.; YLA-HERTTUALA, S.; YODER, M. C.; GRIFFIOEN, A. W. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. **Angiogenesis**, v. 21, n. 3, p. 425-532, 2018.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, n. 4, p. 779-804, 2014.

OECD. Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation (Second Edition). *In: OECD Series on Testing and Assessment*, n. 263, 2019. *E-book*. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO\(2017\)15/REV1%20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2017)15/REV1%20&doclanguage=en). Acesso em: 26 set. 2020.

OLIVEIRA, A. G. L. D.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. D. F.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 153-159, 2012.

ONO, T. *Ex ovo* culture of avian embryos. *In: WALKER, J.M.; TUAN, R.S.; LO, C.W. (ed.). Developmental Biology Protocols*. Humana Press, 2000. p. 39-46.

ÖZCETIN, A.; AIGNER, A.; BAKOWSKY, U. A chorioallantoic membrane model for the determination of anti-angiogenic effects of imatinib. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 711-715, 2013.

ÖZTÜRK, A. A.; KIYAN, H. T. Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using *in vivo* HET-CAM assay. **Microvascular Research**, v. 128, p. 103961, 2020.

ÖZTÜRK, A. A.; NAMLI, İ.; GÜLEÇ, K.; KIYAN, H. T. Diclofenac sodium loaded PLGA nanoparticles for inflammatory diseases with high anti-inflammatory properties at low dose: Formulation, characterization and *in vivo* HET-CAM analysis. **Microvascular Research**, v. 130, p. 103991, 2020.

PARODI, A. L. Ethical issue in animal experimentation. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine**, v. 193, n. 8, p. 1737-1745, 2009.

PEGAZ, B.; DEBEFVE, E.; BALLINI, J. P.; WAGNIÈRES, G.; SPANIOL, S.; ALBRECHT, V.; SCHEGLMANN, D. V.; NIFANTIEV, N. E.; VAN DEN BERGH, H.; KONAN-KOUAKOU, Y. N. Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1-2, p. 134-140, 2006.

PEREIRA-LOPES, J. E. F.; BARBOSA, M. R.; STELLA, C. N.; SANTOS, W. A.; PEREIRA, E. M.; NOGUEIRA-NETO, J.; AUGUSTO, E. M.; SILVA, L. V.; SMAILI, S. S.; GOMES, L. F. *In vivo* anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic

activity of methyl jasmonate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 443-449, 2010.

PIPILI-SYNETOS, E.; KRITIKOU, S.; PAPADIMITRIOU, E.; ATHANASSIADOU, A.; FLORDELLIS, C.; MARAGOUDAKIS, M. E. Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 207-213, 2000.

PRADO, A. D. L.; BAILÃO, E. F. L. C.; NABOUT, J. C.; RABACHINI, T.; MELO-REIS, P. R.; GONÇALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M. The chick embryo chorioallantoic membrane assay as a model for the study of angiogenesis. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 4, p. 1262-1275, 2019.

PRESGRAVE, O.; MOURA, W.; CALDEIRA, C.; PEREIRA, E.; BÔAS, M. H. V.; ESKES, C. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the Process of Validation in Brazil. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 44, n. 1, p. 85-90, 2016.

PUND, S.; BORADE, G.; RASVE, G. Improvement of anti-inflammatory and anti-angiogenic activity of berberine by novel rapid dissolving nanoemulsifying technique. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 307-314, 2014.

RASHIDI, H.; SOTTILE, V. The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. **Bioessays**, v. 31, n. 4, p. 459-465, 2009.

REUWER, A. Q.; NOWAK-SLIWINSKA, P.; MANS, L. A.; VAN DER LOOS, C. M.; VON DER THÜSEN, J. H.; TWICKLER, M. T. B.; SPEK, C. A.; GOFFIN, V.; GRIFFIOEN, A. W.; BORENSZTAJN, K. S. Functional consequences of prolactin signalling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology?. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 2035-2048, 2012.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* assay to study antiangiogenesis. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 3, p. 482-513, 2010.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. **Experimental Cell Research**, v. 328, n. 2, p. 314-324, 2014.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of Development**, v. 141, p. 70-77, 2016.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 97-101, 2017.

RIBATTI, D. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *In*: RIBATTI, D. (ed.). **In vivo Models to Study Angiogenesis**. Academic Press, 2018. cap. 1, p. 1-23.

RIBATTI, D.; ANNESE, T.; TAMMA, R. The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials. **Microvascular Research**, v. 131, p. 104026, 2020.

RIBATTI, D.; BERTOSSI, M.; NICO, B.; VACCA, A.; RIA, R.; RIVA, A.; RONCALI, L.; PRESTA, M. Role of basic fibroblast growth factor in the formation of the capillary plexus in

the chick embryo chorioallantoic membrane. An *in situ* hybridization, immunohistochemical and ultrastructural study. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 30, n. 1, p. 127-136, 1998.

RIBATTI, D.; NICO, B.; PEZZOLO, A.; VACCA, A.; MEAZZA, R.; CINTI, R.; CARLINI, B.; PARODI, F.; PISTOIA, V.; CORRIAS, M. V. Angiogenesis in a human neuroblastoma xenograft model: mechanisms and inhibition by tumour-derived interferon- γ . **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 12, p. 1845-1852, 2006.

RIBATTI, D.; NICO, B.; VACCA, A.; RONCALI, L.; BURRI, P.H.; DJONOV, V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 4, p. 317-324, 2001.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; RANIERI, G.; SORINO, S.; RONCALI, L. The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* wound healing model. **Pathology - Research and Practice**, v. 192, n. 10, p. 1068-1076, 1996.

ROSENBRUCH, M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 14, n. 3, p. 111-113, 1997.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. 5-6, 2007.

SAHU, R. K.; SINGH, B.; SARAF, S. A.; KAITHWAS, G.; KISHOR, K. Photochemical toxicity of drugs intended for ocular use. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 157-167, 2014.

SCHEEL, J.; HEPPENHEIMER, A.; LEHRINGER, E.; KREUTZ, J.; POTH, A.; AMMANN, H.; REISINGER, K.; BANDUHN, N. Classification and labeling of industrial products with extreme pH by making use of *in vitro* methods for the assessment of skin and eye irritation and corrosion in a weight of evidence approach. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1435-1447, 2011.

SCHLATTER, P.; KONIG, M.F.; KARLSSON, L.M.; BURRI, P.H. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. **Microvascular Research**, v. 54, n. 1, p. 65-73, 1997.

SCHNEIDER-STOCK, R.; RIBATTI D. The CAM Assay as an Alternative *In vivo* Model for Drug Testing. *In*: BARRETT, J. E. (ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer Nature, 2020. p. 1-21.

SCHRAGE, A.; GAMER, A. O.; VAN RAVENZWAAY, B.; LANDSIEDEL, R. Experience with the HET-CAM method in the routine testing of a broad variety of chemicals and formulations. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 38, n. 1, p. 39-52, 2010.

SCOTT, L.; ESKEES, C.; HOFFMANN, S.; ADRIAENS, E.; ALEPÉE, N.; BUFO, M.; CLOTHIER, R.; FACCHINI, D.; FALLER, C.; GUEST, R.; HARBELL, J.; HARTUNG, T.; KAMP, H.; LE VARLET, B.; MELONI, M.; MCNAMEE, P.; OSBORNE, R.; PAPE, W.; PFANNENBECKER, U.; PRINSEN, M.; SEAMAN, C.; SPIELMANN, H.; STOKES, W.; TROUBA, K.; VAN DEN BERGHE, C.; VAN GOETHEM, F.; VASSALLO, M.;

VINARDELL, P.; ZUANG, V. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using bottom-up and top-down approaches. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2010.

SILVA, M. M. S.; ALMEIDA, T. H. S.; COSTA, E. V. L.; SILVA, J. E. S.; NOGUEIRA, R. A. Crescimento vascular em membrana do saco vitelínico e desenvolvimento embrionário de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) expostas a campo magnético de baixa frequência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1003-1009, 2014.

SLODOWNIK, D.; GRINBERG, I.; SPIRA, R. M.; SKORNIK, Y.; GOLDSTEIN, R. S. The human skin/chick chorioallantoic membrane model accurately predicts the potency of cosmetic allergens. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 409-413, 2009.

SMITH, S. M.; FLENTKE, G. R.; GARIC, A. Avian models in teratology and developmental toxicology. In: HARRIS C.; HANSEN J. (ed.). **Developmental Toxicology - Methods in Molecular Biology**. Humana Press, 2012. vol 889, p. 85-103.

SOMWONGIN, S.; CHANTAWANNAKUL, P.; CHAIYANA, W. Antioxidant activity and irritation property of venoms from *Apis* species. **Toxicon**, v. 145, p. 32-39, 2018.

SPIELMANN, H. HET-CAM Test. In: O'HARE, S.; ATTERWILL, C. K. **In vitro Toxicity Testing Protocols**. Humana Press, 1995. cap. 22, p. 199-204.

SPURLIN III, J.; LWIGALE, P. A technique to increase accessibility to late-stage chick embryos for *in ovo* manipulations. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 2, p. 148-154, 2013.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; SILVA, O. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375-384, 1999.

STERN, C. D. The chick: a great model system becomes even greater. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, 2005.

STRICKLAND, J.; ZANG, Q.; KLEINSTREUER, N.; PARIS, M.; LEHMANN, D. M.; CHOKSI, N.; MATHESON, J.; JACOBS, A.; LOWIT, A.; ALLEN, D.; CASEY, W. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 9, p. 1150-1162, 2016.

SUBAUSTE, M. C.; KUPRIYANOVA, T. A.; CONN, E. M.; ARDI, V. C.; JAMES, P.; DERYUGINA, E. I. Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 26, n. 8, p. 1033, 2009.

SWADI, R.; MATHER, G.; PIZER, B. L.; LOSTY, P. D.; SEE, V.; MOSS, D. Optimising the chick chorioallantoic membrane xenograft model of neuroblastoma for drug delivery. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

SYS, G.; BOCKSTAL, M.; FORSYTH, R.; BALKE, M.; POFFYN, B.; UYTENDAELE, D.; BRACKLE, M.; DE WEVER, O. Tumor grafts derived from sarcoma patients retain tumor morphology, viability, and invasion potential and indicate disease outcomes in the

chick chorioallantoic membrane model. **Cancer Letters**, v. 326, n. 1, p. 69-78, 2012.

TAMANOI, F. Recent excitements in the study of the CAM assay. *In*: TAMANOI, F. (ed.). **The Enzymes**. Academic Press, 2019. cap. 1, v. 46, p. 1-9.

TAYLOR, K.; ALVAREZ, L. R. An estimate of the number of animals used for scientific purposes worldwide in 2015. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 47, n. 5-6, p. 196-213, 2019.

TOMCZYK, Ł.; STEPIEŃ, Ł.; URBANIAK, M.; SZABLEWSKI, T.; CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, R.; STUPER-SZABLEWSKA, K. Characterisation of the mycobiota on the shell surface of table eggs acquired from different egg-laying hen breeding systems. **Toxins**, v. 10, n. 7, p. 293, 2018.

TUAN, R.S.; CARSON, M.J.; JOZEFIAK, J.A.; KNOWLES, K.A.; SHOTWELL, B.A. Calcium-transport function of the chick embryonic chorioallantoic membrane. I. *In vivo* and *in vitro* characterization. **Journal of Cell Science**, v. 82, n. 1, p. 73-84, 1986.

TUFAN, A. C.; SATIROGLU-TUFAN, N. L. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. **Current Cancer Drug Targets**, v. 5, n. 4, p. 249-266, 2005.

ULOZA, V.; KUZMINIENE, A.; PALUBINSKIENE, J.; BALNYTE, I.; ULOZIENE, I.; VALANCIUTE, A. Model of human recurrent respiratory papilloma on chicken embryo chorioallantoic membrane for tumor angiogenesis research. **Histology and Histopathology**, v. 32, n. 7, p. 699-710, 2017.

VALDES, T. I.; KREUTZER, D.; MOUSSY, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel *in vivo* model for the testing of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 2, p. 273-282, 2002.

VAN BEIJNUM, J. R.; NOWAK-SLIWINSKA, P.; VAN DEN BOEZEM, E.; HAUTVAST, P.; BUURMAN, W. A.; GRIFFIOEN, A. W. Tumor angiogenesis is enforced by autocrine regulation of high-mobility group box 1. **Oncogene**, v. 32, n. 3, p. 363-374, 2013.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1162-1176, 2007.

VICTORELLI, F. D.; CARDOSO, V. M. O.; FERREIRA, N. N.; CALIXTO, G. M. F.; FONTANA, C. R.; BALTAZAR, F.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Chick embryo chorioallantoic membrane as a suitable *in vivo* model to evaluate drug delivery systems for cancer treatment: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 153, p. 273-284, 2020.

VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 1, p. 46-59, 2008.

VOSGERAU, D. S. R.; ROMANOWSKI, J. P. Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. **Revista Diálogo Educacional**, v. 14, n. 41, p. 165-189, 2014.

VU, B. T., SHAHIN, S. A., CROISSANT, J., FATIEIEV, Y., MATSUMOTO, K., DOAN, T. L. H., YIK, T.; SIMARGI, S.; CONTERAS, A.; RATLIFF, L.; JIMENEZ, C. M.; RAEHM, L.; KHASHAB, N.; DURAND, J. O.; GLACKIN, C.; TAMANOI, F. Chick chorioallantoic membrane assay as an *in vivo* model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

WALTERS, L. Campaign to stop animal test requirement. **Stuff**, 2015. Disponível em: <https://www.stuff.co.nz/environment/68834079/campaign-to-stop-animal-test-requirement>. Acesso em: 30 set. 2020.

WANNAPHATCHAIYONG, S.; HENG, P. W. S.; SUKSAEREE, J.; BOONME, P.; PICHAYAKORN, W. Lidocaine loaded gelatin/gelatinized tapioca starch films for buccal delivery and the irritancy evaluation using chick chorioallantoic membrane. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 8, p. 1085-1095, 2019.

WILHELMUS, K. R. The Draize eye test. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 6, p. 493-515, 2001.

WILSON, S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, v. 327, p. 32-46, 2015.

WILSON, T. D.; STECK, W. F. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 10, p. 867-872, 2000.

WINTER, G.; KOCH, A. B.; LÖFFLER, J.; LINDÉN, M.; SOLBACH, C.; ABAEI, A.; LI, H.; GLATTING, G.; BEER, A. J.; RASCHE, V. Multi-Modal PET and MR Imaging in the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Model for Initial *in vivo* Testing of Target-Specific Radioligands. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1248, 2020.

XIAO, X.; ZHOU, X.; MING, H.; ZHANG, J.; HUANG, G.; ZHANG, Z.; LI, P. Chick chorioallantoic membrane assay: a 3D animal model for study of human nasopharyngeal carcinoma. **PloS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130935, 2015.

YALCIN, H. C.; SHEKHAR, A.; RANE, A. A.; BUTCHER, J. T. An ex-ovo chicken embryo culture system suitable for imaging and microsurgery applications. **JoVE-Journal of Visualized Experiments**, n. 44, p. e2154, 2010.

YANG, K. Q.; LIU, Y.; HUANG, Q. H.; MO, N.; ZHANG, Q. Y.; MENG, Q. G.; CHENG, J. W. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by inflammatory cytokines produce angiogenetic factors and promote prostate cancer growth. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 878, 2017.

YOUSEFNIA, S.; GHAEDI, K.; SEYED FOROOTAN, F.; NASR ESFAHANI, M. H. Characterization of the stemness potency of mammospheres isolated from the breast cancer cell lines. **Tumor Biology**, v. 41, n. 8, p. 1010428319869101, 2019.

YUAN, Y. J.; XU, K.; WU, W.; LUO, Q.; YU, J. L. Application of the chick embryo chorioallantoic membrane in neurosurgery disease. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 12, p. 1275, 2014.