

ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA ($AgNO_3$) REVESTIDAS COM PECTINA SOBRE A ANGIOGÊNESE INDUZIDA PELAS CÉLULAS DO TUMOR DE EHRlich EM MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

Analysis of the effect of treatment of silver nanoparticles ($AgNO_3$) with pectin-coated on ehrlich tumor cell-induced angiogenes in the chorioalantoid membrane model

Monique Malta Francese¹
Paulo Henrique Weckwerth²

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Sagrado Coração em Bauru-SP, Brasil.

² Professor Doutor do curso de Odontologia na Universidade do Sagrado Coração em Bauru-SP, Brasil.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

RESUMO

Avaliou-se a interferência das nanopartículas de prata sobre a angiogênese relacionada ao crescimento tumoral. A pesquisa científica foi

Recebido em: 14/12/2019
Aceito em: 29/04/2020

realizada através da incubação de 42 ovos embrionados de galinhas. Após 24 horas de incubação, esses mesmos ovos foram separados em seis grupos contendo sete ovos cada, para os tratamentos com: Grupo 1: Soro fisiológico; Grupo 2: Tumor de Ehrlich (TE); Grupo 3: Nanopartículas de prata; Grupo 4: Prednisolona; Grupo 5: Nanopartículas de prata e Tumor de Ehrlich; Grupo 6: Prednisolona e Tumor de Ehrlich. Após o tempo total de incubação, as membranas corioalantoideas (MCAs) foram removidas, e analisadas através do microscópio de luz e fotografadas. O grupo 1 apresentou um padrão normal de crescimento e foi utilizado como controle negativo; O grupo 2 apresentou um aumento na quantidade de vasos sanguíneos; o grupo 3 apresentou baixa interferência na angiogênese embrionária e não contribuiu para o desenvolvimento do tumor; O grupo 4 demonstrou diminuição no desenvolvimento de vasos sanguíneos; O grupo 5 indicou que as nanopartículas de prata, quando associadas ao TE, não favorece o desenvolvimento tumoral e o grupo 6 demonstrou que o fármaco prednisolona associado ao TE, se comporta como um excelente inibidor de neoangiogênese tumoral. Considera-se através da técnica realizada a possibilidade de utilizar nanopartículas de prata para o tratamento de células tumorais de Ehrlich, porém devem ser realizados testes confirmatórios para estudar a relação da substância descrita às células tumorais empregadas.

Palavras-chave: Angiogênese. MCA. Nanopartículas. Tumor.

ABSTRACT

The interference of silver nanoparticles on angiogenesis related to tumor growth was evaluated. Scientific research was carried out by incubating 42 embryonated chicken eggs. After 24 hours of incubation, these same eggs were separated into six groups containing seven eggs each, for treatments with: Group 1: Saline; Group 2: Ehrlich's tumor (ET); Group 3: Silver nanoparticles; Group 4: Prednisolone; Group 5: Silver nanoparticles and Ehrlich's Tumor; Group 6: Prednisolone and Ehrlich's Tumor. After the total incubation time, the chorioallantoid membranes (MCAs) were removed, and analyzed using a light microscope and photographed. Group 1 showed a normal growth pattern and was used as a negative control; Group 2 showed an increase in the amount of blood vessels; group 3 showed low interference in embryonic angiogenesis and did not contribute to the development of the tumor; Group 4 demonstrated a decrease in the development of blood vessels; Group

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

5 indicated that silver nanoparticles, when associated with TE, do not favor tumor development and group 6 demonstrated that the drug prednisolone associated with TE, behaves as an excellent inhibitor of tumor neoangiogenesis. Through the technique performed, the possibility of using silver nanoparticles for the treatment of Ehrlich tumor cells is considered, however, confirmatory tests should be performed to study the relationship of the substance described to the tumor cells employed.

Keywords: *Angiogenesis. MCA. Nanoparticles. Tumor.*

INTRODUÇÃO

A técnica de cultivo em membrana corioalantoidea de embriões de galinha (MCA) oferece diversas vantagens, das quais podemos citar a alta vascularização, alta taxa de reprodução, simplicidade, rapidez e baixo custo. A MCA é um órgão extra-embriônico que se desenvolve a partir do quarto dia de desenvolvimento (PRADO et al).

Apesar de antigo, esse modelo foi aprovado apenas em 2008 pelo comitê de ética e experimentos. A técnica permitiu a inoculação de células cancerígenas no ovo para estudo, após o mesmo já ter sido incubado. Se considerar o ciclo total de incubação para galinhas domésticas, totalizará 21 dias, tempo rápido quando comparado a outras técnicas que utilizam animais (LABNETWORK, 2015).

Dado o exposto, esse método apresenta a possibilidade de substituir os animais em testes experimentais e aprimorar as técnicas já existentes resultando em baixo custo, rapidez e boa simulação da fisiologia humana.

NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A nanotecnologia é definida como uma ciência, cuja habilidade consiste em manipular átomos e moléculas individualmente para produzir materiais nanoestruturados, micro-objetos, substâncias e produtos com aplicações no mundo real. Um nanômetro possui como símbolo as letras “nm” e corresponde a um milionésimo de milímetro e sendo assim, seu valor equivale a aproximadamente 1/80000 do diâmetro do cabelo humano (BASTOS, 2006). A prata metálica em forma das nanopartículas mostra-se como um potente agente antimicrobiano, uma vez que um dos problemas resultantes

do uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos foi o desenvolvimento da resistência bacteriana contra vários antibióticos. Sendo assim as nanopartículas vêm sendo utilizadas em uma ampla gama de produtos em todo o mundo, incluindo as nanopartículas de prata (AgNP) e outros compostos, como óxido nítrico (NO) e quitosana, promissores para o tratamento de feridas (AHAMED; ALSALHI; SIDDIQUI, 2010).

TUMOR DE EHRlich

Inicialmente, o tumor de Ehrlich foi descrito em 1905 por Paul Ehrlich como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Segundo Gobello (2001 citado por Gomes *et al.*, 2006, p. 172), o carcinoma inflamatório mamário é caracterizado por uma anaplasia, ou seja, um crescimento e desenvolvimento de determinada célula (podendo esta ser epitelial, glandular ou trofoblasto) de forma anormal, fazendo com que esta perca sua função, formato e, posteriormente, promova no local do desenvolvimento do carcinoma sintomas como o eritema, calor, dor nas mamas e rápido crescimento.

As taxas de incidência são maiores nos países desenvolvidos. As taxas de mortalidade variam entre diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas nos países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, o risco de morrer de câncer de mama, em geral, é menor em comparação com os países desenvolvidos (INCA, 2017). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2017), estima-se que no ano de 2018 foram datados cerca de 59.700 novos casos registrados. Os dados podem ser confirmados através da figura apresentada a seguir.

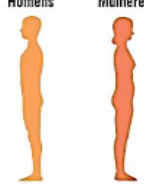
| Localização primária | Casos | % | | | Localização primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|---|--|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata | 68.220 | 31,7% |  | | Mama Feminina | 59.700 | 29,5% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 18.740 | 8,7% | | | Cólon e Reto | 18.980 | 9,4% |
| Cólon e Reto | 17.380 | 8,1% | | | Colo do Útero | 16.370 | 8,1% |
| Estômago | 13.540 | 6,3% | | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.530 | 6,2% |
| Cavidade Oral | 11.200 | 5,2% | | | Glândula Tireoide | 8.040 | 4,0% |
| Esôfago | 8.240 | 3,8% | | | Estômago | 7.750 | 3,8% |
| Bexiga | 6.690 | 3,1% | | | Corpo do Útero | 6.600 | 3,3% |
| Laringe | 6.390 | 3,0% | | | Ovário | 6.150 | 3,0% |
| Leucemias | 5.940 | 2,8% | | | Sistema Nervoso Central | 5.510 | 2,7% |
| Sistema Nervoso Central | 5.810 | 2,7% | | | Leucemias | 4.860 | 2,4% |

Figura 1 - Taxas brutas de incidência estimadas para 2018 por sexo.

Fonte: INCA (2017).

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

MEMBRANA CORIOALANTOIDEA COMO MODELO DE ESTUDO

A angiogênese consiste no crescimento de novos vasos de capilares preexistentes e vênulas pós-capilares e, por esse motivo, demonstra-se como um desenvolvimento embrionário crucial (STOCKMANN et al., 2014). A partir do quarto dia de desenvolvimento embrionário, é possível observar a membrana vascularizada (RIBATTI, 2008; PRADO *et al.*). A figura abaixo resulta de uma fotografia retirada da MCA de um ovo embrionado de 48 horas.

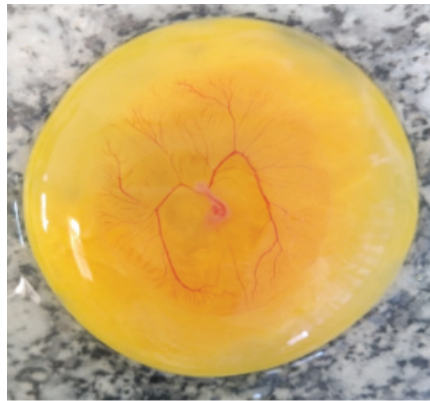


Figura 2 - Membrana corioalantoidea vascularizada presente no embrião de galinha em seu quarto dia de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

O processo de angiogênese se desenvolve em diversas etapas quando ocorre um estímulo no organismo. As células do endotélio do vaso-mãe recebem um estímulo pelas citocinas angiogênicas. A lâmina basal sofre degradação pela ação de proteases da matriz extra-celular, que são liberadas pelo endotélio. O estroma vesicular recebe essas células endoteliais que irão se proliferar e formar o brotamento capilar. A migração é direcionada para onde localiza-se os estímulos angiogênicos e, deste modo, o broto se expande, assumindo a forma tubular e uma nova lâmina basal é desenvolvida. As células tumorais serão desta forma, nutridas até adquirirem a capacidade de se desprender e migrar, inicialmente invadindo tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou (HORTA *et al.*, 2007). A figura abaixo, representa um esquema visual da angiogênese dividida didaticamente em quatro fases, citadas anteriormente.

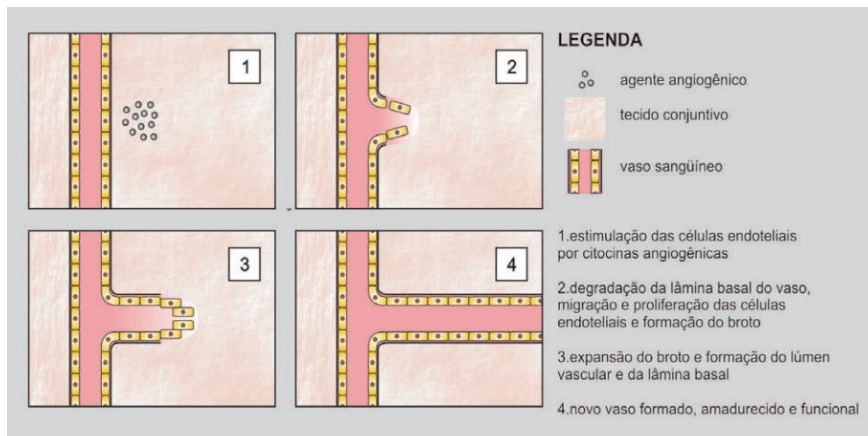


Figura 3 - Etapas da angiogênese tumoral.

Fonte: HORTA et al., (2007).

DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES DE “*GALLUS DOMESTICUS*”

Segundo WOLPERT (1998 apud SCHATZ, 2003) nas aves, como, por exemplo o *Gallus domesticus*, o processo de desenvolvimento do embrião só terá continuidade se os ovos que estiverem no ambiente natural (granja, fazenda e sítio) ou experimental (mantidos na incubadora) possuírem a sua disposição os fatores e condições necessárias de sua espécie para a desenvoltura dos embriões. Essas condições são variáveis dependendo de cada criador, e influenciam diretamente na saúde das aves geradas a partir desses ovos.

Nos ovos de galinha doméstica a gastrulação (processo em que as células embrionárias sofrem um rearranjo) inicia anterior a postura da ave e para que ocorra a continuidade do desenvolvimento embrionário, faz-se necessário que a incubação dos ovos seja feita numa temperatura de 38°C, em um ciclo de 21 dias (GILBERT, 2001 citado por SCHATZ, 2003).

No geral, em embriões de *Gallus domesticus*, entre 16 horas e 18 horas de incubação inicia-se a placa neural e mais tardiamente com 24 horas, as pregas neurais da região encefálica induz a fusão de suas extremidades, porém o desenvolvimento da estrutura denominada placa neural, não ocorre simultaneamente ao longo de todo eixo corporal, sendo necessário tempo para sua total difusão. Segundo JACOBSON, (1991 apud SCHATZ, 2003) a partir do quinto dia de desenvolvimento, são gerados os neuroblastos (precursores de neurônios) e glioblastos (precursores das células da glia), através das células epiteliais presentes na camada proliferativa.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

Em decorrência da neurogênese, ocorrerá mudanças tanto na extensão anterior, quanto na extensão posterior. Na extensão anterior ao tubo neural, ocorre uma organização dos neurônios em seis camadas, onde há interação com axônios em crescimento para a formação do circuito neuronal cerebral (HATTEN, 1999 citado por SCHATZ, 2003). Na extensão posterior, se originará a medula espinhal, estrutura esta que irá manter o padrão básico de três camadas, podendo ser considerada uma estrutura conservativa do sistema nervoso dos vertebrados (TANABE; JESSEL, 1996 citado por SCHATZ, 2003).

Deste modo, para que ocorra o processo de neurogênese, faz-se necessário a participação das células glia que serão proliferadas anterior a migração neural. Quando essa migração é iniciada, as células glia tornam-se inativas para garantir estrutura necessária para o deslocamento de neuroblastos. O ciclo total do desenvolvimento do embrião de galinha até seu nascimento, ocorre em 21 dias

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo realizado foi de natureza exploratória, através do levantamento da hipótese de que a angiogênese relacionada ao crescimento tumoral poderia ser afetada pelo tratamento com nanopartículas de prata. A estratégia adotada foi a pesquisa experimental. Foram utilizados 42 ovos fecundados de galinha.

Os dados da pesquisa foram analisados através de uma metodologia quantitativa, visando uma melhor compreensão dos dados obtidos através das imagens microscópicas, uso de tabelas comparativas entre os diferentes grupos a serem avaliados.

Células tumorais

Empregou-se as células tumorais do Tumor Ascítico de Ehrlich, obtidas através do laboratório de pâncreas endócrino localizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Bauru-SP. No dia previsto para o ensaio científico, foi recolhida uma alíquota de 500 μ L de fluido acético, no Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC), atual Centro Universitário Sagrado Coração – UNISAGRADO, através de punção peritoneal, utilizando-se uma seringa estéril contendo soro fisiológico.

Posteriormente realizou-se a contagem celular da solução, com o auxílio do microscópio óptico e câmara de Neubauer afim de se descobrir a concentração da alíquota. A contagem de células foi realizada manualmente através do contador de células, por duas pessoas

diferentes. Os valores obtidos individualmente foram somados para obter-se a média de células tumorais contidas. Após foi realizada uma diluição em solução salina fisiológica estéril para preparo de uma suspensão contendo 10^6 células tumorais por mL.

Após as células preparadas foram imediatamente inoculadas nos ovos embrionados (após 24 horas de incubação), já que essas células não sobrevivem muito tempo quando expostas fora do organismo vivo, impossibilitando seu armazenamento em local refrigerado. Preparo da diluição de Prednisolona

O fármaco anti-inflamatório utilizado como parâmetro inibitório da angiogênese denomina-se prednisolona. A caixa de comprimidos indicava 10 unidades do fármaco, (cada um deles continha 20 mg) e foi comprada na farmácia popular. O comprimido foi moído e diluído em soro fisiológico, onde adotou-se a diluição $4\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Formou-se uma solução supersaturada que necessitou permanecer sob agitação constante.

Preparo da solução de nanopartículas de AgNO_3 revestidas com pectina

Foi empregada a técnica descrita e utilizada por Melo *et al.*, (2012), respeitando os padrões de concentração do nanomaterial. Na síntese das nanopartículas revestidas com pectina, adicionou-se 4mL pectina cítrica a 0.5% a 100mL de água destilada e 12mL de uma solução 10^3 M do precursor (AgNO_3). A solução foi adicionada em um bécker vedado por papel alumínio e aquecida sob agitação magnética, sendo que a luz do ambiente manteve-se apagada até o final do processo afim de que a solução não sofresse reações fotoquímicas que pudessem interferir no aspecto do AgNO_3 . Ao atingir a temperatura de 80°C , 4 mL de uma solução de citrato de sódio 0.1 M foi adicionada.

A partir da adição da solução de citrato de sódio, tomou-se a cautela de manter o aquecimento e também a agitação magnética por mais 30 minutos. Durante este período, a solução, inicialmente incolor, passa a apresentar a cor levemente amarela e, ao final da síntese, amarelo mais escuro, porém com aspecto transparente.

Ao final do processo, a quantidade de água perdida durante o procedimento das nanopartículas foi compensada, assegurando as proporções necessárias entre as substâncias químicas e solvente.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AgNO_3) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

Modelo da Membrana Corioalantoidea

Foram empregados 42 ovos fertilizados de galinha da espécie *Gallus domesticus*, da raça Índio grande, adquiridos no sítio Shatoshi ito, localizado em Piratininga-SP.

No primeiro dia de procedimento, os ovos foram inicialmente limpos com auxílio de panos embebidos em álcool 70% e identificados. Seguido da limpeza e marcação, os ovos foram incubados na chocadeira a 37,5° C, a uma umidade em torno de 60 a 70% durante 24 horas. A acomodação dos ovos foi feita através de fileiras verticais com no máximo 5 ovos, facilitando a movimentação mecânica do equipamento, feita a cada 10 minutos.

No segundo dia de incubação, executou-se uma abertura de aproximadamente 0,3 cm de diâmetro com o auxílio de uma agulha de insulina 25x7 com seringa, na base maior de cada ovo. Com a exposição da MCA adicionou-se uma alíquota total de 100ul das soluções desejadas que serão descritas na tabela a seguir.

Tabela 1 - Controle de ações correspondentes ao dia e número do grupo de ovos embrionados.

| DATA | PROCEDIMENTO |
|-------|---|
| Dia 1 | Incubação dos 42 ovos Obs: O comportamento máximo da chocadeira utilizada é de 21 ovos, portanto foi necessário separar os grupos em dias diferentes. |
| Dia 2 | Alíquotas de 100ul em cada ovo: Grupo 1: Soro fisiológico (100ul) Grupo 2: Tumor de Ehrlich (100ul) Grupo 3: Nanopartículas de prata (100ul) Grupo 4: Prednisolona (100ul) Grupo 5: Nanopartículas de prata (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul) Grupo 6: Prednisolona (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul) |
| Dia 3 | Retirada da MCA dos ovos e fixação em formol. |
| Dia 4 | Retirada da MCA do formol e conservação em álcool. |
| Dia 5 | Fotografia da MCA para estudo. |

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

As soluções recebidas pelos ovos, foram inoculadas através da abertura realizada nos ovos e após o tratamento, essa abertura foi vedada com parafina líquida. Após os ovos retornaram a incubadora por mais 24 horas, para completar as 48 horas de desenvolvimento necessárias para o estudo de vascularização da membrana. Após o término da incubação, os ovos foram retirados um após o

outro da estufa para a remoção das MCAs. Antes de serem abertos, os ovos permaneceram em repouso em temperatura ambiente durante 10 minutos.

Os ovos foram quebrados e inseridos em uma placa petri contendo água. Cortou-se as laterais da gema com tesoura cirúrgica de 22 cm e deslocou-se a membrana com uma espátula de ponta reta. Após serem removidas, as membranas foram depositadas em placa petri contendo solução formol 37% onde permaneceram durante 24 horas e o conteúdo restante dos ovos foi descartado na pia. A solução formol foi utilizada como solução fixadora seguindo as orientações práticas de laboratório citadas por SILVEIRA, 2013. Durante sua fixação, as membranas apresentaram o aspecto contido na figura a seguir.

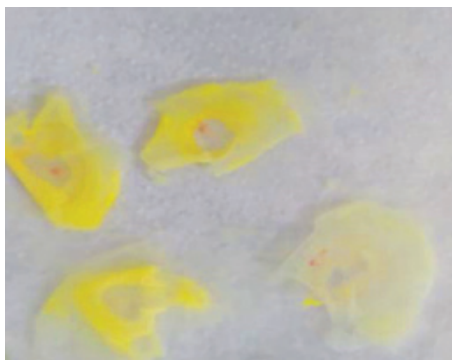


Figura 4 – Aspecto das membranas corioalantoidea removidas.

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Seguido a fixação, as membranas foram conservadas em álcool adicionados em frascos estéreis até a próxima etapa do procedimento. O tempo de conservação no álcool não ultrapassou 7 dias, evitando endurecimento da MCA. No dia previsto para análise, as membranas foram retiradas cuidadosamente dos frascos e adicionadas em um becker com água. Com um auxílio de pincel, as membranas foram inseridas em lâminas para microscopia 26x76 mm e distendidas para melhor visualização.

Obteve-se fotografias obtidas a partir da câmera do Smartphone Asus Zenfone 5 Selfie Pro, utilizando-se a lente do microscópio estereoscópio lupa binocular. As fotografias foram tratadas através do software Adobe Photoshop CS6 versão 13.0. Foram aplicadas as seguintes alterações nas imagens: Brilho/contraste, saturação, vibração e filtro de inversão.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vascularização da membrana corioalantoidea demonstrou interferência em relação ao desenvolvimento normal do grupo controle negativo, apresentando variações dependendo do tipo de tratamento recebido. Nas imagens de cada grupo, observa-se à direita a foto sem tratamento de imagem, e à esquerda a foto com tratamento imagem, acompanhada de traços vermelhos que delimitam o embrião e traços amarelos, indicando algumas das veias possíveis de serem identificadas. Nota-se que nem em todas as fotos as mesmas encontram-se nítidas.

Grupo 1: Soro fisiológico (100ul)

O grupo 1 é o grupo adotado como controle negativo do estudo. Empregou-se o mesmo como parâmetro de comparação onde relatou-se um padrão normal de produção de vasos sanguíneos. No total de 7 ovos incubados, executou-se a remoção da membrana corioalantoidea de 4 ovos. A imagem obtida abaixo, contém a fotografia de duas das membranas removidas.

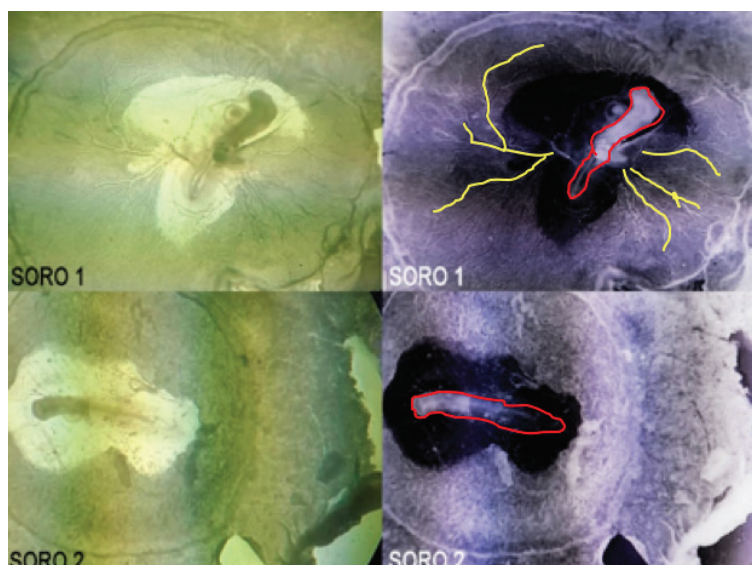


Figura 5 – Aspecto microscópico da MCA dos ovos controles pertencentes ao “Grupo 1: Soro fisiológico (100ul)”, após 48 horas de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Grupo 2: Tumor de Ehrlich (100ul)

O grupo 2 apresentou aceleração no desenvolvimento embrionário e quanto a produção de vasos sanguíneos, estes apresentaram

ramificações mais evidenciadas. No total de 7 ovos incubados, foi possível remover a membrana corioalantoidea de 3 ovos. A imagem contida abaixo contém a fotografia das três membranas removidas.

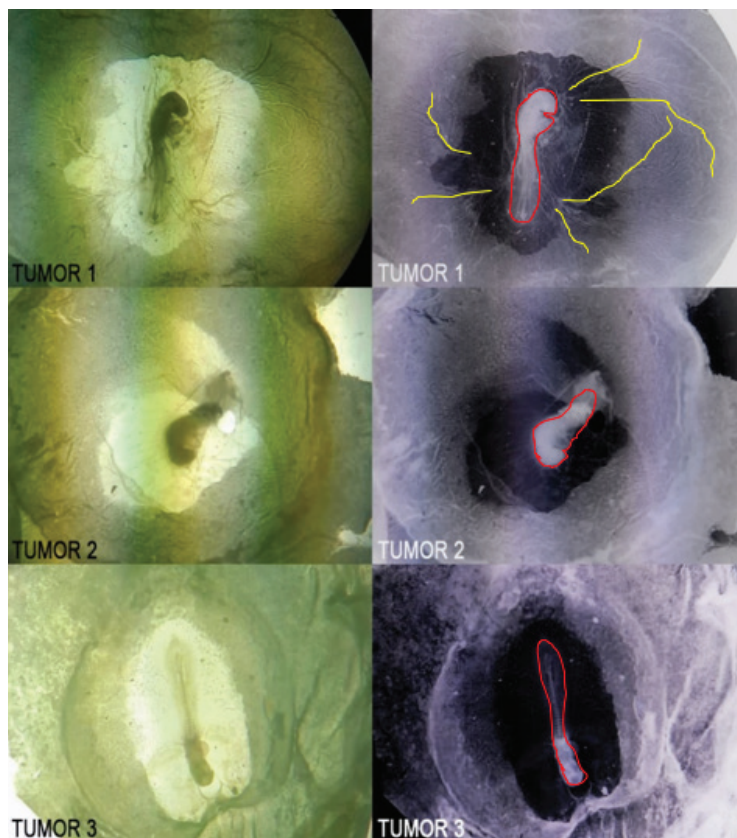


Figura 6 - Aspecto microscópico da MCA dos ovos referentes ao “Grupo 2: Tumor de Ehrlich (100ul)”, após 48 horas de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Grupo 3: Nanopartículas de prata (100ul)

O grupo 3 sugere leve interferência na produção de neovascularização embrionária. No total de 7 ovos incubados, foi possível remover a membrana corioalantoidea de 3 ovos. A imagem contida abaixo contém a fotografia de uma das membranas removidas.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

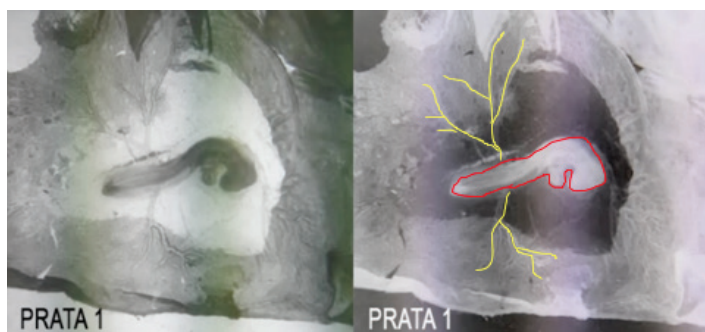


Figura 7 - Aspecto microscópico da MCA ovos referentes ao “Grupo 3: Nanopartículas de prata (100ul)”, após 48 horas de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Grupo 4: Prednisolona (100ul)

O grupo 4 sugere uma diminuição na produção de neovascularização embrionária, o que é esperado por se tratar de um fármaco anti-inflamatório. No total de 7 ovos incubados, foi possível remover a membrana de 4 ovos. A imagem contida abaixo contém a fotografia de uma das membranas removidas.



Figura 8 - Aspecto microscópico da MCA dos ovos referentes ao “Grupo 4: Prednisolona (100ul)”, após 48 horas de incubação

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Grupo 5: Nanopartículas de prata (50ul) + Tumor de ehrlich (50ul)

O grupo 5 sugere o aumento na produção de neovascularização embrionária, justificado pela administração do tumor de Ehrlich. No total de 7 ovos incubados, foi possível remover a membrana corioalantóide de 3 ovos. A imagem contida abaixo contém a fotografia das três membranas removidas.

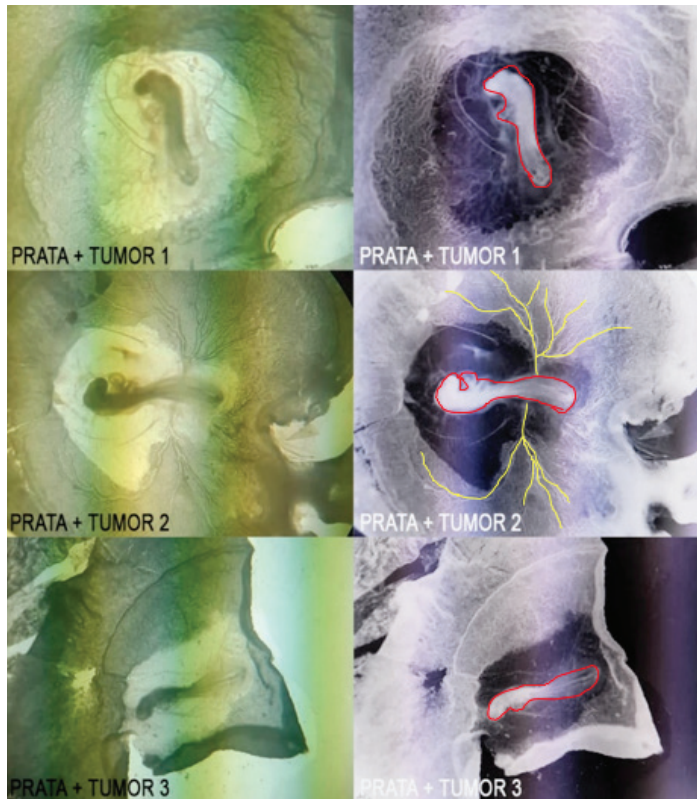


Figura 9 - Aspecto microscópico da MCA ovos referentes ao “Grupo 5: Nanopartículas de prata (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul)”, após 48 horas de incubação.
 Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Grupo 6: Prednisolona (50ul) + Tumor de ehrlich (50ul)

Em comparação ao grupo controle, o grupo 6 sugere diminuição na neovascularização, resultado este, esperado por se tratar de um fármaco anti-inflamatório. Este grupo, apresentou também o menor índice de membranas extraídas, comparado aos demais. Num total de 7 ovos incubados, foi possível remover a membrana de apenas 2 ovos. A imagem contida abaixo contém a fotografia de uma das membranas removidas.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.



Figura 10 - Aspecto microscópico da MCA dos ovos referentes ao “Grupo 6: Prednisolona (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul)”, após 48 horas de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Análise do desenvolvimento de vasos sanguíneos obtidos através da extração das membranas corioalantoidea de acordo com cada grupo

Quando a análise microscópica possui como a finalidade o estudo do desenvolvimento normal ou alterado de vasos sanguíneos, não faz-se possível a quantificação destes vasos no método de pesquisa MCA descrito neste trabalho. Sendo assim, o parâmetro utilizado para obter os resultados, foi através da análise visual e aspecto microscópico que desenvolvem-se na membrana corioalantoidea em decorrência da aplicação de substâncias com potencial angiogênico e não angiogênico.

Foi possível constatar que baseando-se no mesmo total de ovos incubados, a quantidade de vasos sanguíneos desenvolvidos comportou-se de uma forma diferente de acordo com cada grupo de ovos, os quais receberam o mesmo estímulo, porém apresentaram respostas diferentes. Esta disparidade será discutida a seguir.

No grupo 1: Soro fisiológico (100ul), o padrão de crescimento apresentado demonstrou desenvolvimento normal dos vasos sanguíneos do embrião de galinha. Nota-se um aspecto esperado visando os padrões de crescimento de uma ave. A justificativa disso, deve-se ao grupo não ter recebido nenhum tipo de tratamento que pudesse acelerar ou retardar o processo. A alíquota de 100ul administrada, teve como o objetivo apenas padronizar a concentração de substâncias dos ovos, sem acarretar mudanças notáveis em microscopia ótica além de facilitar a exposição da MCA para a membrana já vascularizada. O tratamento com soro fisiológico embasou-se no artigo científico realizado pelo autor Chaves, D. A., et al, 2016, onde 56 ovos foram tratados com uma gota de soro fisiológico no quinto dia de incubação. Porém para este trabalho, adotou-se apenas 24 horas de incubação, por concluir-se que este tempo é o suficiente para pes-

quisa da neovascularização da MCA. Sendo assim, o grupo controle negativo foi utilizado como parâmetro de comparação ou grupo controle, onde os resultados próximos a ele são considerados normais, e os diferentes são considerados anormais (crescimento aumentado ou diminuído de vasos sanguíneos).

O grupo 2: Tumor de Ehrlich (100 ul) apresentou um desenvolvimento embrionário acelerado que foi observado através da análise microscópica. Pode-se observar uma angiogênese disfuncional com terminações interrompidas e pontos de vazamento que facilitam a metástase das células tumorais, terminações estas que são observadas através de pontos escuros ou brancos ao decorrer da MCA. Esses pontos hemorrágicos, já foram associados ao TAE e descrito por outros autores em seu trabalho, como CHAVES et al., 2016. Nota-se que em comparação com o grupo controle, esse grupo apresentou embriões com o crescimento mais desenvolvido e apresentou o padrão previsto para este grupo, já que o Tumor de Ehrlich induz a multiplicação acelerada de neoangiogênese.

No grupo 3: Nanopartículas de prata (100ul), o principal ponto observado neste grupo, foi a dificuldade de manter a integridade da membrana corioalantoidea ao removê-la dos ovos, fato este que pode ter ocorrido decorrente a leve diminuição na produção de vasos sanguíneos. Sabe-se que o uso de nanomedicina demonstra-se eficiente por agir em locais específicos da doença, sendo utilizados como nanocarreadores (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

O grupo 4: Prednisolona (100ul) apresentou uma quantidade diminuída de vasos sanguíneos em comparação ao grupo controle, o que pode ser justificado pelo fato dos ovos deste grupo terem recebido um tratamento com uma substância química com propriedades anti-inflamatórias, como o glicocorticoide que modifica a resposta imunológica do organismo (DUARTE et al., 2009).

Segundo CASTRO, 2018, com base nos seus estudos com nanopartículas de prata, as nanopartículas de prata estimulam viabilidade, indicando possível utilização nas células testadas em medicina regenerativa. Porém apesar disso, é necessária para melhor comparação e validação dos dados, a realização de mais ensaios. Com base nos dados constatados, grupo 5: Nanopartículas de prata (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul), não foram observadas alterações relevantes quanto a interferência das nanopartículas de prata associadas ao Tumor de Ehrlich. Apesar disto, sugere-se que a nanopartícula de prata favoreceu um crescimento normal dos vasos sanguíneos, não permitindo a influência do tumor sobre os vasos em sua totalidade.

Um estudo de caso relatado por SAAD, R. associou a prescrição do fármaco de prednisolona para o tratamento de leucocitose canina

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata ($AgNO_3$) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de Ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

diagnosticada em um hemograma. Associou-se assim que o grupo de número 6: Prednisolona (50ul) + Tumor de Ehrlich (50ul) apresentou diminuição acentuada do desenvolvimento de vasos sanguíneos, o que sugere efeito anti-inflamatório associado a uma alteração na neovascularização e desta forma, a prednisolona se mostrou como uma ótima substância anti-angiogênica, atuando na diminuição da proliferação de vasos irrigadores do tumor.

Outro parâmetro importante a ser discutido, é a facilidade ou dificuldade na extração das MCAs dos ovos. Levou-se em consideração a quantidade padronizada de 7 ovos por grupo. No grupo 1: Soro fisiológico (100ul), foi possível realizar a remoção de 4 membranas. O gráfico abaixo, apresenta a comparação de MCAs extraídas de acordo com cada grupo.

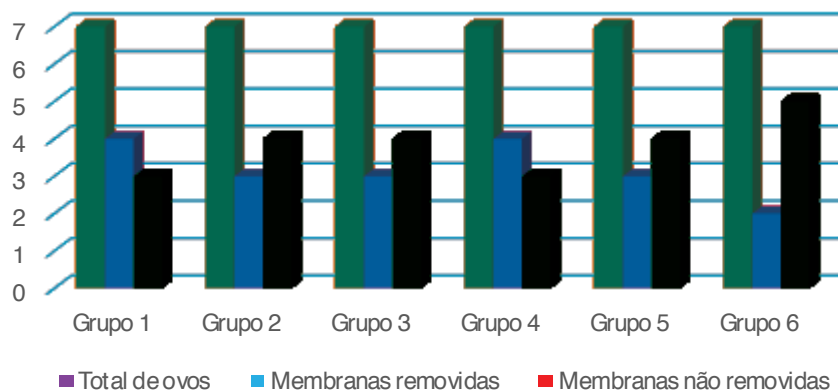


Figura 11 - Quantidade de membranas corioalantoidea removidas por grupo. Fonte: Elaborada pela autora (2019).

É possível observar que a variação mais importante ocorre no grupo 6, que apresentou a menor quantidade de membranas corioalantóides extraídas, sendo essa porcentagem de 28,57%, em relação ao total de 7 ovos do grupo. Apesar dos resultados apresentarem benefícios decorrentes desta associação entre droga e células tumorais, análises mais precisas devem ser realizadas, pois sugere-se também um retardamento no desenvolvimento embrionário, que podem causar futuras anomalias ou até mesmo morte do embrião.

Os demais grupos não apresentaram uma variação considerável no âmbito de extração da membrana corioalantoidea. As porcentagens de membranas corioalantoidea extraídas na ordem dos grupos, foram 57,14% (grupo 1), 42,85% (grupo 2), 57,14% (grupo 3), 42,85% (grupo 4), 57,14% (grupo 5) e 28,57% (grupo 6).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da literatura encontrada relatar que a membrana corioalantoidea é formada a partir do quarto dia de desenvolvimento do embrião, os presentes testes científicos realizados provaram ser possível realizar este procedimento a partir das 48 horas de desenvolvimento embrionário aviário, condição essa que economiza o período de incubação dos ovos e possibilita a antecipação do método de estudo.

O grupo de ovos tratados com nanopartículas de prata (associado com células tumorais de Ehrlich ou não), seguiu um crescimento de vasos sanguíneos dentro da normalidade e faz-se necessário a realização de outros testes científicos afim de averiguar a atual influência no emprego de nanopartículas de prata no tratamento de ovos embrionados com células tumorais de Ehrlich

AGRADECIMENTO

À Prof^a Dra. Dulce Helena Jardim Constantino, por dar início a construção deste projeto.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.

REFERÊNCIAS

AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, v. 411, n. 23–24, p. 1841–1848, 2010.

BASTOS, R. M. DE P. B. Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos. *Quimica Nova*, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2006.

BIOLOGIA., P. **Anexos embrionários.**, 2016. Disponível em: <<https://planetabiologia.com/anexos-embrionarios/>>

CASTRO, P. S. DE. **Estudo da biocompatibilidade das nanopartículas de ZNO e PRATA dopados com európio em cultura de células-tronco humanas, células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) e células tumorais da próstata (PC-3).** v. 10, n. 2, p. 1–15, 2018.

CHAVES, D. A. et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*stryphnodendron adstringens*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, n. 2, p. 524–530, 2016.

DUARTE BYRRO, RICARDO MARTINS et al. **Sistemas biodegradáveis contendo acetato de prednisolona para administração orbitária.** *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 72, n. 4, p. 444–450, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/71053>>.

GOMES, C. et al. Carcinoma inflamatório mamário canino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 171–174, May, 2006.

HORTA, T. et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese: Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta$ 3. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, p. 1–17, 2007.

INCA. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil.** Ministério da saúde. Rio de Janeiro, 2017.

LABNETWORK. **A revolução de um método de pesquisa alternativo ao uso de animais.**, 2015. Disponível em: <<https://www.labnetwork.com.br/especiais/a-revolucao-de-um-metodo-de-pesquisa-alternativo-ao-uso-de-animais/>>

PINHO, M. DE S. L. Angiogênese: O gatilho proliferativo. **SEÇÃO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, v. 25, n. 0, p. 396–402, 2005.

PRADO, A. et al. **Ensaio com membrana corioalantóide de galinhas: modelo robusto para responder diferentes problemas biológicos.** p. 0–4.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 49, n. 2, p. 131–135, 2008.

SCHATZ, J. C. **Caracterização morfológica de embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula.** 2003.

SILVA, E. O; ZURRIDA, S. **Câncer de mama: um guia para médicos.** Atibaia: Atlântica, 1999.

SILVEIRA, S. O. **Orientação para práticas de Laboratório.** 2015, v. 5, n. 2, p. 234–248, 2013.

STOCKMANN, C. et al. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. April, p. 1–13, 2014.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.

WEISS, S. L. I. **Ação de fatores físicos e químicos sobre o padrão da atividade neuromuscular em embriões de *Gallus domesticus*.** v. 45, n. 3, 2009.

FRANCESE, Monique Malta e WECKWERTH, Paulo Henrique. Análise do efeito do tratamento com nanopartículas de prata (AGNO₃) revestidas com pectina sobre a angiogênese induzida pelas células do tumor de ehrlich em modelo da membrana corioalantoidea. *SALUSVITA*, Bauru, v. 39, n. 1, p. 23-42, 2020.