

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**A MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO OVO DE GALINHA (CAM)
PARA INVESTIGAÇÃO *IN VIVO* DE RADIOFÁRMACOS**

Raíssa Oliveira Nascimento

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Lígia Ferreira Gomes

São Paulo

2024

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. O cenário da pesquisa experimental em oncologia.....	6
1.2. Técnica de imagem PET.....	7
1.3. O modelo animal no cenário atual.....	9
2. OBJETIVO(S).....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Estratégias de pesquisa.....	10
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSSÃO.....	12
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
7. REFERÊNCIAS.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS

^{125}I Iodo-125, radioisótopo Iodeto

^{177}Lu Lutécio-177

[^{18}F]-FDG [^{18}F]-Fluoro-desoxi-glicose

^{18}F Flúor-18, radioisótopo Fluoreto

[^{18}F]siPSMA-14, ligante siPSMA-14 radiomarcado com ^{18}F

2D Bidimensional

3D Tridimensional

“3 Rs” *Reduce, Replace and Refine* (Reducir, Substituir e Refinar)

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tecnécio-99 metaestável, Isômero nuclear metaestável do Tecnécio-99

a.C. antes de Cristo

CAM Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (Membrana Corioalantóide do Ovo de Galinha)

CT Computed Tomography (Tomografia Computadorizada)

EVP Efeito de Volume Parcial

IARC International Agency for Research in Cancer (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)

INCA Instituto Nacional de Câncer

kBq Quilo Becquerel (Unidade de medida do S.I. para radiação)

mL Mililitro (Unidade de medida do S.I. para líquidos)

OMS Organização Mundial de Saúde

PSMA Prostate Specific Membrane Antigen (Antígeno de Membrana Específico da Próstata)

PET Positron Emission Tomography (Tomografia por Emissão de Pósitrons)

S.I. Sistema Internacional de Medidas

SUV Standard Uptake Value (Valor Convencional de Captação, ou Valor de Captação Padronizado)

RESUMO

NASCIMENTO, R.O. **A membrana corioalantóica de ovo de galinha (CAM) para investigação *in vivo* de radiofármacos.** 2024. no. 23. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Palavras-chave: Modelo CAM (membrana corioalantóica embrionária); *in ovo*; Ética em Pesquisa; Radiofarmácia.

INTRODUÇÃO: O embrião de galinha e sua membrana corioalantóica (CAM) são amplamente utilizados em vários campos de pesquisa, uma vez que este modelo representa um sistema de teste *in vivo* relativamente simples, rápido e de baixo custo. O modelo apresenta também capacidade para monitorar o crescimento e progressão de tumores xenotransplantados, de onde vem seu potencial para uso na avaliação da biodistribuição de novos fármacos que, em combinação com estratégias de tomografia computorizada (CT) e tomografia por emissão de pósitron (PET), apresenta bom prognóstico para o desenvolvimento e triagem de alto rendimento de novos radiofármacos com aplicações em oncologia. **OBJETIVO:** Discutir a viabilidade de uso da membrana corioalantóica do ovo de galinha (CAM) como um modelo *in vivo* para biodistribuição e estabilidade de radiofármacos através da combinação com técnicas de imagem da medicina nuclear (PET-CT), abordando também aspectos éticos e avanços possíveis com essa nova prática. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para a presente revisão, foi realizada uma coleta de materiais bibliográficos, com foco às palavras-chave deste trabalho e aos artigos de maior relevância no meio acadêmico. **RESULTADOS:** Estudos acadêmicos que se debruçam sobre o tema têm demonstrado resultados positivos não apenas em testes individuais mas, igualmente, estudos comparativos com o modelo *in vivo* usual (com roedores) evidenciam suas similaridades. Tal fato, aliado às comodidades ofertadas ao longo de toda experimentação com o modelo o tornam um ideal para triagens *in vivo* de novos compostos radiomarcados, oferecendo resultados confiáveis e com replicabilidade aos demais modelos. **CONCLUSÕES:** Ao fim desta revisão, destaca-se o sucesso do modelo CAM em experimentações clínicas, a fim de investigar metodologias para diagnóstico e tratamento de neoplasias malignas. Além deste incrível atrativo, o modelo também vai de encontro à responsabilidade ao manejo animal, fornecendo uma solução mais viável econômica e eticamente em relação às usuais no meio científico.

1. INTRODUÇÃO

Por muitos anos, ratos e camundongos de laboratório foram usados como modelo padrão para pesquisa *in vivo* em oncologia, particularmente no desenvolvimento de novos radiofármacos. O modelo da membrana corioalantóica de ovo de galinha (CAM), ao contrário dos modelos de indução de neoplasias em roedores, requer um espaço limitado, é de custo reduzido e é eticamente mais sustentável. Diferentes avanços tecnológicos vêm permitindo refinamentos na pesquisa experimental em oncologia, permitindo abreviar o tempo de investigação e reduzir o sofrimento animal sem comprometer a qualidade dos resultados obtidos. A capacidade de monitorar o crescimento e progressão de tumores xenotransplantados utilizando o modelo CAM tem potencial para ser uma ferramenta ideal para o desenvolvimento e triagem de alto rendimento de novos radiofármacos com aplicações em oncologia

A substituição de roedores por uma espécie evolutiva inferior como a galinha e o refinamento dos experimentos com animais utilizando um estágio de desenvolvimento embrionário menos sensível ao sofrimento do que um animal adulto abordam o *princípio dos 3Rs*, referindo-se à Substituição, Redução e Refinamento da experimentação animal³. O embrião de galinha e sua membrana corioalantóica (CAM) são amplamente utilizados em vários campos de pesquisa, uma vez que este modelo representa um sistema de teste *in vivo* relativamente simples, rápido e de baixo custo³. Ao longo de décadas, a CAM tem sido empregada para estudar a angiogênese, bem como o crescimento tumoral, devido seu potencial para o estudo de implantes de células e tecidos quanto à viabilidade e crescimento dos enxertos, efeitos sistêmicos sobre o embrião e o feto, produção de metástases e desenvolvimento vascular⁵.

Efetivamente, os xenoenxertos derivados de linhagens celulares humanas⁵ são considerados uma ferramenta cada vez mais valiosa em oncologia, por fornecerem modelos biológicos de muitos tipos diferentes de câncer.

Devido à sua simplicidade, o modelo *CAM* aparece como plataforma ideal para testes farmacológicos iniciais, incluindo a avaliação de biodistribuição ou avaliação de eficácia de novos compostos bioativos⁵. Com o uso crescente do modelo *CAM* e a necessidade de monitoramento longitudinal, imagens *in ovo* não invasivas do embrião de galinha e especialmente da *CAM* ganharam interesse nos últimos anos. Considerando a capacidade do modelo *CAM* para monitorar o crescimento e progressão de tumores xenotransplantados, surge um enorme potencial para seu uso na avaliação da biodistribuição de novos compostos, especialmente em combinação com estratégias específicas de direcionamento. Neste contexto, a combinação das capacidades da tomografia computorizada (CT) com a sensibilidade da tomografia por emissão de pósitron (PET), conhecida na prática médica por *PET-CT*, apresenta ser promissora para o desenvolvimento e triagem de alto rendimento de novos radiofármacos com aplicações em oncologia.

1.1. O cenário da pesquisa experimental em oncologia

“Câncer” (também conhecido por “neoplasias malignas” ou “tumores malignos”) é a denominação dada a um grande grupo de enfermidades caracterizadas pelo crescimento exacerbado e descontrolado de células, que pode se iniciar em qualquer órgão ou tecido corporal, indo inclusive além destes e se espalhando por demais áreas, num processo conhecido como metástase.

Segundo dados de 2022 da Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (IACR), da Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer afetou cerca de 20 milhões¹ de pessoas ao redor do mundo, das quais aproximadamente 9,7

milhões¹ vieram a óbito. Ainda segundo esta pesquisa, os tipos de cânceres mais comuns para os dois sexos são os cânceres de pulmão (2,5 milhões de casos, ou 12,4%), mama feminino (2,3 milhões de casos, ou 11,6%), colorretais (1,9 milhões de casos, representando 9,6%), próstata (1,5 milhões de casos, ou 7,3%) e de estômago (970 mil casos, ou 4,9%), sendo que o câncer de pulmão é o que apresenta maior taxa de mortalidade, com 1,8 milhões de mortes (18,7% do total de mortes por câncer). No Brasil, segundo dados de 2023 do INCA², cerca de 704 mil novos casos foram registrados. Diferentemente da estatística mundial, no Brasil os cânceres mais incidentes são os de próstata e de mama (15% dos casos), colorretais (9,4% dos casos), de brônquios e pulmão (6,7% dos casos, também com maior mortalidade) e de estômago (4,4% dos casos)². A região Sudeste é a que registra a maior quantidade de novos casos², com 48,4% destes.

Um fator estatístico interessante é que há a estimativa de que cerca de 30 a 50% das mortes mundiais por câncer poderiam ser evitadas¹ simplesmente pela escolha de hábitos de vida mais saudáveis, medidas de saúde pública, diagnóstico prévio e medidas paliativas adequadas. Nestes dois últimos pontos vemos um papel importante das pesquisas clínicas e pré clínicas e seu impacto na saúde como forma de aumentar a expectativa de vida e trazer bem estar à população.

Neste contexto, a área da pesquisa em oncologia, seja ela clínica ou puramente experimental, engloba estudos *in vitro* e *in vivo*, para posteriormente se seguir para os Estudos de Fase 1 e 2 em humanos. Dessa forma, para que estudos farmacológicos, fisiológicos ou anatômicos sejam validados, é preciso passar pela etapa *in vivo*, com manipulação animal e suas particularidades referentes às características do estudo.

1.2. Técnica de imagem PET

A técnica de imagem molecular por Tomografia por Emissão de Pósitrons (*PET*) é um método não invasivo utilizado no diagnóstico de doenças neurológicas, tumorais, entre outras. A combinação das técnicas da *PET* com a Tomografia Computadorizada (*CT*) garante um mapeamento anatômico de alta qualidade e uma visão geral do metabolismo da área investigada, possibilitando a reconstrução tridimensional das estruturas e uma análise do metabolismo momentâneo¹¹.

A captura da imagem *PET* é realizada após administração, geralmente por via intravenosa, de um radiofármaco marcado com um radionuclídeo emissor de pósitrons, como por exemplo o $[^{18}\text{F}]$ ¹⁵. À medida que o radionuclídeo $[^{18}\text{F}]$ decai, por exemplo, os pósitrons emitidos percorrem uma curta distância antes de interagir com os elétrons próximos. A interação entre um pósitron e um elétron leva a um evento de aniquilação, emitindo dois raios gama de 511 keV em direções opostas. Os raios gama são detectados em coincidência, e os sinais são reconstruídos usando algoritmos computacionais para gerar projeções 2D ou imagens 3D¹⁵.

Amplamente considerada como a modalidade de imagem mais sensível, a *PET* pode fornecer informações quantitativas, como atividade por volume de tecido (kBq/mL) versus tempo ou valores de captação padronizados (*SUV*), que são importantes na avaliação clínica de pacientes oncológicos¹¹.

A imagem *PET* também é uma ferramenta indispensável na pesquisa oncológica pré-clínica e clínica. O radiofármaco $[^{18}\text{F}]$ -Fluoro-desoxi-glicose ($[^{18}\text{F}]$ -FDG) por exemplo, tem sido bastante utilizado para estudar a proliferação

tumoral e metástases *in vivo*. Mais de 90% das pesquisas clínicas na deteção de neoplasias malignas utilizam o $[^{18}\text{F}]$ -FDG. No entanto, este radiofármaco tem-se demonstrado pouco específico no diagnóstico de alguns tumores. O $[^{18}\text{F}]$ -FDG possui alta captação em locais inflamatórios e em alguns órgãos saudáveis que apresentam elevada metabolização da glicose, contribuindo para esta inespecificidade. Dessa forma, diversos esforços têm sido feitos para desenvolver e avaliar novos radiofármacos a fim de melhorar a sensibilidade e especificidade da imagem *PET* em câncer no que diz respeito à caracterização, estratificação do tratamento e monitoramento terapêutico. Novos radiofármacos incluem marcadores de proliferação, metabolismo de aminoácidos, hipóxia ou angiogênese¹⁶. Apesar do sucesso no seu desenvolvimento, esses novos traçadores ainda têm sido predominantemente usados no ambiente de pesquisa, com uso clínico limitado.

Mesmo assim, é possível considerar que, na era da terapia biológica direcionada e da caracterização molecular, a avaliação não invasiva mais específica do tumor e o monitoramento da resposta à terapia estão evoluindo com o uso de novos marcadores *PET*.

1.3. O modelo animal no cenário atual

O uso de animais em experimentos teve seu inicio no século III a.C., porém foi interrompido em meados do século I a.C. e só retomado na época renascentista, em meados do século XV, dando início a chamada “metodologia científica”, sobretudo para estudo da anatomia. Com o passar dos séculos os estudos se aprofundaram na área de fisiologia e no entendimento do sofrimento animal, procurando minimizar a dor e as repetições desnecessárias dos processos⁶.

Os ratos foram a primeira espécie animal a ser criada para servirem como

animais de laboratório, seguidos dos camundongos. Atualmente, os roedores compõem cerca de 80% do total dos animais utilizados em estudos e sua relevância se deve ao fato de que estes animais compartilham 90% do genoma humano, permitindo manipulações genéticas para que se respondam às condições fisiológicas, toxicológicas, imunológicas e farmacológicas requeridas, além da facilidade em sua criação e manejo²⁰.

2. OBJETIVO(S)

O objetivo geral deste projeto consiste em discutir, através de revisões bibliográficas, a viabilidade de usar a membrana corioalantóica de ovo de galinha (CAM) como um modelo *in vivo* para avaliar a biodistribuição e estabilidade de radiofármacos através da combinação das técnicas de tomografia computadorizada (CT) com a excelente sensibilidade da tomografia por emissão de pósitrons (PET), incluindo a abordagem de aspectos éticos em pesquisa acadêmica e pré-clínica, desafios e avanços permitidos com a eventualidade da substituição de modelos *in vivo* tradicionalmente utilizados pelo modelo proposto da membrana corioalantóica de ovos de galinha (CAM).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Por se tratar de uma revisão teórica, o método aqui empregado é uma coleta bibliográfica. Ressalto ainda que a maioria dos artigos aqui referidos são em língua inglesa, o que destaca o fato de serem utilizados dois idiomas para maior enriquecimento da discussão.

3.1. Estratégias de pesquisa

Como pesquisa primária, foi realizada uma pesquisa bibliográfica, utilizando sobre tudo as combinações das palavras-chave “radiofármaco”, “*in ovo*”, “*CAM*” e “sustentabilidade”. Em um segundo momento, buscou-se aprofundar nos ideais depreendidos das pesquisas anteriores, integrando novos termos à lista, como “3D”, “*PET*”, “viabilidade” e “microambiente tumoral”. Foi dada prioridade a artigos com mais citações e mais recentes.

4. RESULTADOS

Nos últimos tempos, o embrião de galinha e sua *CAM* tem sido utilizado no campo das ciências radiofarmacêuticas. Würbach *et al.* mostraram pela primeira vez a sua utilização para estudar a distribuição, absorção e cinética do fluoreto $[^{18}\text{F}]$ usando a técnica de imagem Tomografia por Emissão de Pósitrons (*PET*)¹⁸. Os resultados no embrião de galinha foram comparáveis com os dados obtidos em roedores. Mais recentemente, Warnock *et al.* demonstraram que o metabolismo da glicose e a síntese proteica de tumores de glioblastoma cultivados na *CAM* podem ser visualizados por imagem *PET* após a injeção de $[^{18}\text{F}]$ -Fluoro-desoxi-glicose ou 2- $[^{18}\text{F}]$ -Fluoro-L-tirosina²⁴. Haller *et al.*⁵ investigaram a distribuição tecidual e a estabilidade de diferentes radiofármacos marcados com $[^{18}\text{F}]$, $[^{125}\text{I}]$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ e $[^{177}\text{Lu}]$. Em comparação com os modelos de camundongos estabelecidos, eles concluíram que ocorre uma distribuição tecidual semelhante e que a estabilidade de radiofármacos no embrião de galinha é adequada para sua utilização. Em um trabalho recente de Zlatopolskiy *et al.*⁴⁶ o modelo *CAM* foi usado para avaliação de radiotraçadores

endereçando à via metabólica do triptofano. Para isso, xenoenxertos das linhagens tumorais MCF-7, PC-3 e NCI-H69 foram cultivados na *CAM*. A distribuição tecidual do novo radiofármaco foi avaliada após injeção sistêmica e a captação no tumor avaliada por *PET/CT*.

Todos esses estudos apontam para a possibilidade de utilização do embrião de galinha como alternativa ao modelo de roedor para validação de novos radiofármacos *PET*. Os resultados desses estudos foram promissores e justificam testes mais extensivos do embrião de galinha como um modelo alternativo para testar o comportamento *in vivo* de radiofármacos⁴⁵.

5. DISCUSSÃO

A inserção do modelo *CAM* entre os ensaios pré-clínicos traz a conveniência de empregar uma técnica simples para triagem inicial de novos radiofármacos, especialmente para investigar a estabilidade *in vivo* de novos radiotraçadores em um estágio inicial de desenvolvimento. Isso permite promover apenas os radiotraçadores mais promissores para estudos *in vivo* com modelos de roedores, enquanto aqueles que falham no embrião de galinha podem ser retirados de testes adicionais. Uma estratégia que reduz o sofrimento animal, além de economizar tempo e recursos, uma vez que permite a triagem de um grande número de amostras farmacológicas em um curto espaço de tempo.

O modelo tem sido usado com sucesso para estudar a progressão tumoral em resposta a um tratamento farmacológico¹⁸, angiogênese¹⁸, farmacocinética¹⁸ ou propriedades de novos nanomateriais¹⁸. Especialmente para modelos tumorais de xenotransplante, a *CAM* oferece várias vantagens em comparação com os

modelos murinos. Uma vez que o desenvolvimento do sistema linfóide começa na fase tardia da incubação, o modelo *CAM* representa um hospedeiro naturalmente imunodeficiente, permitindo o xenotransplante de muitos tipos de tumores sem limitações específicas da espécie⁵.

O uso de modelos animais é parte indispensável na pesquisa de novos radiofármacos e, tendo em vista a melhora de métodos e a implementação dos 3Rs (do inglês, *Reduce, Refine, Replace*), surge o modelo de Membrana Corioalantóica de Ovos Embrionados (*CAM*), ou ainda, modelo *in ovo*, que permite uma rapidez no tempo de condução dos estudos, uma vez que a incubação do embrião dura apenas 21 dias, sendo que, dentro de 17 dias a imunidade animal ainda é imatura.

A Membrana Corioalantoica (*CAM*) de ovos de galinha fertilizados representa um modelo único para a pesquisa biomédica. A Membrana Corioalantóica (*CAM*) é formada no quarto dia do desenvolvimento embrionário, pela junção das estruturas alantóide e córion, e passa a ser responsável pelas trocas gasosos do ovo embrionado, na absorção de albumina da clara e dos sais de cálcio da casca, que irão favorecer a formação do esqueleto do embrião⁸. Para realizar estas funções a membrana aproveita-se da grande rede de vascularização que abrange o ovo por completo, possibilitando estudos que necessitam de uma rede vascular, como enxertos de tecidos, crescimento tumoral, formação de metástases, cicatrização de feridas, liberação de drogas, análise toxicológica, moléculas angiogênicas e antiangiogênicas⁸.

Seu manejo conveniente e simples se deve ao fato da não necessidade de oferecimento de uma alimentação ou habitats específicos no espaço onde se realiza a pesquisa, sendo necessária apenas uma incubadora. Outro fator importante é que o embrião só é considerado vivo a partir do 18º dia de incubação, quando tem seu sistema nervoso e imune majoritariamente

formados. Considerando a agressividade de alguns modelos de crescimento tumoral, essa condição de experimentação nos indica que a realização de ensaios com o embrião (ou com o feto, antes desse período crítico) em substituição aos roedores, contribui para evitar sofrimento animal.

Além da comodidade em relação à condução do estudo, o modelo é bem mais barato e acessível se comparado ao comumente utilizado de roedores, e ainda que o modelo não seja utilizado para o estudo em sua totalidade, torna-se uma aposta interessante para se fazer triagens de novas moléculas radiomarcadas, poupando tempo e recursos, e sobretudo, priorizando o bem-estar animal.

A rede de vasos sanguíneos da *CAM* fornece um excelente ambiente para a formação de tumor primário e uma base para a formação de vasos sanguíneos induzidos por estímulos angiogênicos resultantes da integração de células exógenas aos tecidos em desenvolvimento²¹. Os xenoenxertos derivados de linhagens celulares humanas²² são considerados uma ferramenta cada vez mais valiosa em oncologia, potencialmente fornecendo modelos biológicos de muitos tipos diferentes de câncer.

Enquanto os modelos de roedores imunodeficientes apresentam barreiras à aplicação generalizada devido às restrições de custo e eficiência, o modelo *CAM* é modelo geral, que pode ser considerado eficiente, especialmente, para testes iniciais de progressão tumoral. Devido à sua simplicidade, o modelo *CAM* aparece como plataforma ideal também para testes iniciais de compostos farmacológicos, incluindo avaliação de biodistribuição ou avaliação de eficácia de novos compostos.

Em sua tese de doutorado, Löffler²³ descreve de forma interessantíssima, e ilustrada, comparações entre o modelo *in ovo* e “*in mice*” (nossa modelo *in vivo*, com camundongos). Seus achados apontam que, ainda que sofra alteração do

Efeito de Volume Parcial (EVP), as imagens obtidas do ovo do embrião de galinha podem sim ser consideradas para avaliação de ligantes específicos, como o traçador para PSMA radiomarcado com $[F^{18}]$ (Figura 1). Além da comparação por imagens, tal fato foi novamente constatado pela avaliação das estruturas em análise (dos embriões e também dos camundongos) por meio de um contador gama (contador γ), que quantifica a radiação presente nas superfícies e/ou ambiente. A análise quantitativa também foi representada (Figura 2), indicando que para o modelo *in ovo* as concentrações de radiofármaco tendem a permanecer em níveis constantes no tecido de interesse (renal), ao passo que para o teste *in vivo* verifica-se um acúmulo progressivo nesse mesmo tecido, indicando o efeito da metabolização do organismo, um processo que demanda um pouco mais de tempo em avaliação, em comparação ao anterior, ideal para ensaios de triagens de radiomarcadores.

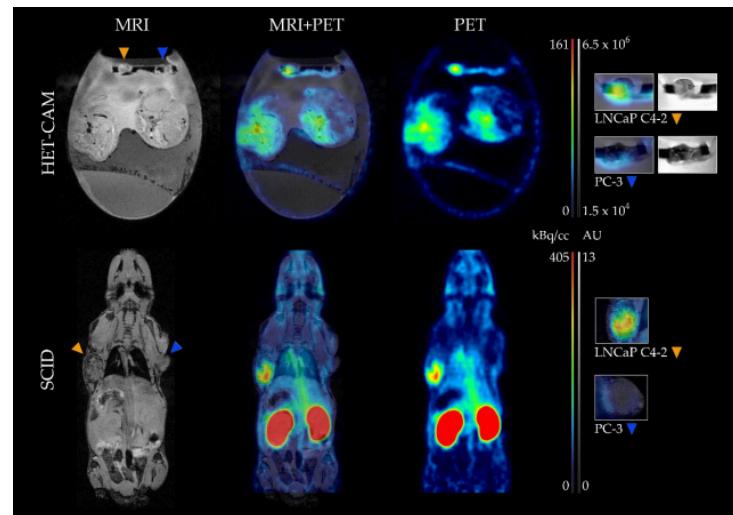


Figura 1: Acúmulo de $[^{18}F]siPSMA-14$ em modelo de embrião de galinha (acima) e de camundongo (abaixo), com sobreposição de imagens à direita do quadro

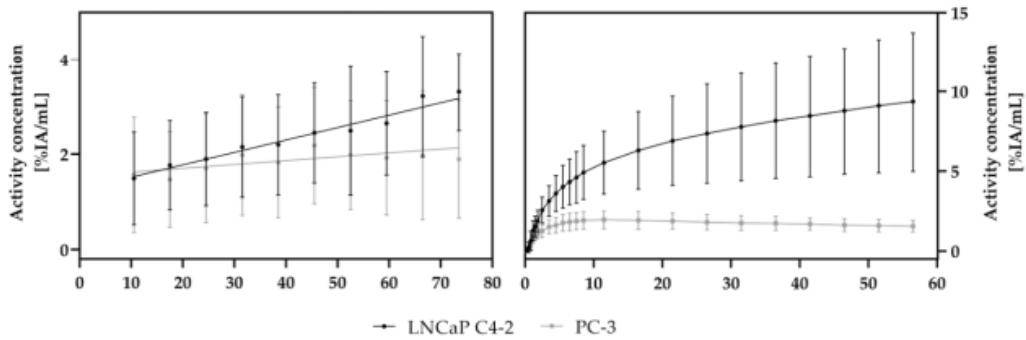


Figura 2: Acúmulo de $[^{18}\text{F}]si\text{PSMA-14}$ em tumores positivos para PSMA no modelo CAM (esquerda) e em camundongo (direita).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observa-se que há um crescente esforço por parte da comunidade científica na busca por novas metodologias experimentais, a fim de aprimorar os rendimentos gerais dos estudos. Simultaneamente a este, temos o aumento da conscientização sobre o manejo de animais de laboratório e seu uso em experimentações *in vivo*. Com estes alicerces, seguimos rumo ao refinamento das linhas de pesquisa para algumas das patologias mais desafiadoras: as neoplasias malignas.

O maior entendimento das questões fisiológicas e metabólicas dos tumores, alinhados à visualização permitida pelas partículas de radioisótopos em práticas de imagem PET-CT, nos permitirá partir para pesquisas cada vez mais assertivas.

Sobretudo, concluímos o principal tópico deste trabalho, como sendo aqueles relativos ao uso de métodos alternativos *in vivo*. Ressaltamos ao longo deste a importância da etapa de testes dessa natureza nas pesquisas, mas também como ferramentas alternativas, até então não usuais, são vistas como opções vantajosas por poupar recursos (além dos econômicos, o tempo é um muito importante), e

principalmente, por serem capaz de fornecer um viés ético pautado no destaque à responsabilidade com o bem-estar animal, tanto na condução de ensaios com os embriões de galinha, quanto no desvio, em primeiro momento, de modelos convencionais como os roedores.

7. REFERÊNCIAS

1. OMS aponta aumento da carga global de câncer, devido à necessidade crescente de serviços de atenção. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). 2024. Disponível em: <<https://cee.fiocruz.br/?q=oms-aponta-aumento-da-carga-global-de-cancer>>
2. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. Instituto Nacional de Câncer [Ministério da Saúde]. Revista Brasileira de Cancerologia 2023; 69(1): e-213700. doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700
3. Dupertuis, Y.M; Delie, F; Cohen, M; Pichard, C. In ovo method for evaluating the effect of nutritional therapies on tumor development, growth and vascularization. Clinical Nutrition Experimental 2. (2015). 9-17. doi: 10.1016/j.yclnex.2015.08.001.
4. Hagedorn, M; Javerzat, S; et. al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. (2005). 102(5)1643-1648. doi: 10.1073/pnas.0408622102.
5. Haller, S; Ametamey, S.M; Schibli, R; Muller, C. Investigation of the chick embryo as a potential alternative to the mouse for evaluation of radiopharmaceuticals. Nuclear Medicine and Biology. (2015). 42(3)226-233. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.10.010.
6. Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais – Conceitos e procedimentos recomendados. Conselho Federal de

- Medicina Veterinária. Brasília, 2012. V.1. 62p.
7. Taizi, M; Deutsch, V.R; Leitner, A; Ohana, A; Goldstein, R.S. A novel and rapid in vivo system for testing therapeutics on human leucemias. International Society for Experimental Hematology. (2006) 34:1698-1708. doi: 10.1016/j.exphem.2006.07.005.
 8. Góes, H.A.N. Propriedades Angiogênicas do Pólipo Nasal no Modelo Experimental da Membrana Corioalantóica de Embrião de Galinha. (2019). Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2019.
 9. Chen, L.; Wang, S.; Feng, Y.; Zhang, J.; Du, Y.; Zhang, J.; Van Ongeval, C.; Ni, Y.; Li, Y. Utilisation of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model Platform for Imaging-Navigated Biomedical Research. Cells. (2021). 10, 463. doi: 10.3390/cells10020463.
 10. James, S.S; et. al. Current Status of Radiopharmaceutical Therapy. International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics. (2020). 109(4):891-901. doi: 10.1016/j.ijrobp.2020.08.035.
 11. Sgouros, G., Bodei, L., McDevitt, M.R. et al. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. Nat Rev Drug Discov, (2020). 19:589-608. doi: 10.1038/s41573-020-0073-9.
 12. Yu S. Review of ¹⁸F-FDG synthesis and quality control. Biomed Imaging Interv J. (2006). 2(4):57. doi: 10.2349/bij.2.4.e57.
 13. Lemaire, C; et. al. Fast [18F]FDG synthesis by alkaline hydrolysis on a low polarity solid phase support. J Label Compd Radiopharm. (2002). 45:435-447. doi: 10.1002/jlcr.572.
 14. Fedorova, O.S; Kuznetsova, O.F; Shatik, S.V; Stepanova, M.A; Belokon, Y.N; Maleev, V.I; Krasikova, R.N. ¹⁸F-labeled tyrosine derivatives: Synthesis and experimental studies on accumulation in tumors and abscesses. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. (2009). Vol.35, No.3, pp.306-314. doi: 10.1134/S1068162009030042.
 15. Menezes, V.O. Otimização de Protocolo de PET/CT Oncológico com FDG-F18 Baseado na Análise de Multiparâmetros. 2015. 57f. Tese

- (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.
16. Winter, G; Koch, A.B.F; et.al. In vivo PET/MRI Imaging of the Chorioallantoic Membrane. *Front. Phys.* (2020). doi: 10.3389/fphy.2020.00151.
 17. Heidrich, A., Würbach, L., Opfermann, T. et al. Motion-Artifact-Free In Vivo Imaging Utilizing Narcotized Avian Embryos In Ovo. *Mol Imaging Biol* (2011). 13:208–214. doi: 10.1007/s11307-010-0355-4.
 18. Würbach, L; Heidrich, A; Opfermann, T; et al. Insights into Bone Metabolism of Avian Embryos In Ovo Via 3D and 4D 18F-fluoride Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol.* (2012). 14:688-698. doi: 10.1007/s11307-012-0550-6.
 19. Jacobson. O; Kiesewetter, D.O; Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chemistry*. (2015). 26 (1), 1-18. doi: 10.1021/bc500475e.
 20. Löffler, J.; Hamp, C.; Scheidhauer, E.; Di Carlo, D.; Solbach, C.; Abaei, A.; Hao, L.; Glatting, G.; Beer, A.J.; Rasche, V.; et al. Comparison of Quantification of Target-Specific Accumulation of [18F]F-siPSMA-14 in the HET-CAM Model and in Mice Using PET/MRI. *Cancers*. (2021). 13, 4007. doi: 10.3390/cancers13164007.
 21. Santos, J.A; Duailibi, M.T; et. al. Chick embryo model: homing and host interactions of Tissue Engineering aimed human Dental Stem Cells. *Tissue Eng.* (2018). 24(11-12):882-888. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0387.
 22. Kapałczyńska, M; Kolenda, T; Przybyła, W; Zajęczkowska, M; Teresiak, A; Filas, V; Ibbs, M; Bliźniak, R; Łuczewski, Ł; Lamperska, K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* (2018). 4:910-919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
 23. Löffler, J. Analyses and evaluation of the biodistribution of novel peptide ligands and nanoparticles *in ovo* and *in mice*. Tese de dissertação para título de Doutor. International Graduate School in Molecular Medicine, Ulm University. (2023). doi: 10.18725/OPARU-50860.

24. Baldavira, C.M; Gomes, L.F; De La Cruz, L.T; Maria, D.A; Capelozzi, V.L. In vivo evidence of angiogenesis inhibition by β 2-glycoprotein I subfractions in the chorioallantoic membrane of chicken embryos. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (2021). 54:3. doi: 10.1590/1414-431X202010291.
25. Warnock, G; Turtoi, A; Blomme, A; et al. In vivo PET/CT in a human glioblastoma chicken chorioallantoic membrane model: a new tool for oncology and radiotracer development. *Journal of Nuclear Medicine:Official Publication. Society of Nuclear Medicine.* (2013). 54(10):1782-1788. doi: 10.2967/jnumed.112.117150.
26. Russell, W.M.S; Burch, R.L. The principles of humane experimental technique. [Reissued: 1992, Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, Herts., UK] Special ed. London: Methuen; 1959.
27. Vargas, A; Zeisser-Labouebe, M; Lange, N; Gurny, R; Delie, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* (2007) 59:1162– 76. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.019.
28. 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. *Int J Mol Sci* 2012;13:9959–70.
29. Kain, K.H; Miller, J.W; Jones-Paris, C. R; Thomason, R. T; Lewis, J. D; Bader, D. M; et. al. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev Dyn* 2014;243:216–28.
30. DeBord, L.C; Pathak, R.R; Villaneuva, M; Liu, H.C; Harrington, D.A; Yu, W; et al. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res.* (2018) 8:1642–60.
31. Vu, B.T; Shahin, S.A; Croissant, J; Fatieiev, Y; Matsumoto, K; Le-Hoang Doan, T; et al. Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. *Sci Rep.* (2018) 8:8524. doi: 10.1038/s41598-018-25573-8.

32. Ribatti, D; Tamma, R. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo experimental model to study human neuroblastoma. *J Cell Physiol.* (2018) 234:152–7. doi: 10.1002/jcp.26773.
33. Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res.* (2014) 328:314–24. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.010.
34. 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. *J Biomed Biotechnol.* (2010) 2010:940741. doi: 10.1155/2010/940741.
35. Nowak-Sliwinska, P; Segura, T; Iruela-Arispe, M.L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis.* (2014) 17:779–804. doi: 10.1007/s10456-014-9440-7.
36. Haller, S; Ametamey, S.M; Schibli, R; Muller, C. Investigation of the chick embryo as a potential alternative to the mouse for evaluation of radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol.* (2015) 42:226–33. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.10.010
37. Cherry, S; Sorenson, J; Phelps, M. Physics in Nuclear Medicine. 4th ed. Saunders, Elsevier Inc.; Philadelphia, PA, USA: 2012.
38. Acton, P.D; Zhuang, H; Alavi, A. Quantification in PET. *Radiol Clin North Am.* 2004 Nov; 42(6):1055-62, viii.
39. Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev.* (2016) 141:70– 7. doi: 10.1016/j.mod.2016.05.003.
40. Buchele, B; Zugmaier, W; Genze, F; Simmet, T. High-performance liquid chromatographic determination of acetyl-11-keto-alpha-boswellic acid, a novel pentacyclic triterpenoid, in plasma using a fluorinated stationary phase and photodiode array detection: application in pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2005) 829:144– 8. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.09.043.
41. Estrada, A.C; Syrovets, T; Pitterle, K; Lunov, O; Buchele, B;

- Schimana-Pfeifer, J; et al. Tirucallic acids are novel pleckstrin homology domain-dependent Akt inhibitors inducing apoptosis in prostate cancer cells. *Mol Pharmacol.* (2010) 77:378–87. doi: 10.1124/mol.109.060475.
42. Loos, C; Syrovets, T; Musyanovych, A; Mailander, V; Landfester, K; Simmet, T. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. *Biomaterials.* (2014) 35:1944– 53. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.056.
43. Lunov, O; Syrovets, T; Loos, C; Beil, J; Delacher, M; Tron, K; et al. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano.* (2011) 5:1657– 69. doi: 10.1021/nn2000756.
44. Leng, T; Miller, J.M; Bilbao, K.V; Palanker, D.V; Huie, P; Blumenkranz, M.S. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina.* (2004) 24:427–34. doi: 10.1097/00006982-200406000-00014.
45. Würbach, L; Heidrich, A; Opfermann, T; Gebhardt, P; Saluz, H.P. Insights into bone metabolism of avian embryos in ovo via 3D and 4D 18F-fluoride positron emission tomography. *Mol Imaging Biol* 2012;14:688–98.
46. Warnock, G; Turtoi, A; Blomme, A; Bretin, F; Bahri, M.A; Lemaire, C; et al. In vivo PET/CT in a human glioblastoma chicken chorioallantoic membrane model: a new tool for oncology and radiotracer development. *J Nucl Med* 2013;54:1782–8.
47. Zlatopolskiy, B.D; Zischler, J; Schafer, D; Urusova, E.A; Guliyev, M; Bannykh, O; et al. Discovery of 7-[(18)F]Fluorotryptophan as a novel positron emission tomography (PET) probe for the visualization of tryptophan metabolism in vivo. *J Med Chem.* (2018) 61:189–206. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01245.
48. Gebhardt, P; Würbach, L; Heidrich, A; Heinrich, L; Walther, M; Opfermann, T; et al. Dynamic behaviour of selected PET tracers in embryonated chicken eggs. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* (2013). 32:371–7.

DocuSigned by:

78C0B321594F43A...

22/05/2024

Data e assinatura do aluno(a)



22/05/2024

Data e assinatura do orientador(a)