ISAAC HUANG

**Análise histomorfológica e imuno-histoquímica de fragmento de gengiva
inserido em membrana corioalantóica de ovos fecundados de galinha**

São Paulo

2018

ISAAC HUANG

**Análise histomorfológica e imuno-histoquímica de fragmento de gengiva
inserido em membrana corioalantóica de ovos fecundados de galinha**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Profa. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Huang, Isaac.

Análise histomorfológica e imuno-histoquímica de fragmento de gengiva inserido em membrana corioalantóica de ovos fecundados de galinha / Isaac Huang ; orientador Luciana Corrêa . -- São Paulo, 2018.

87p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Gengiva. 2. Ovo. 3. Galinhas. 4. Membrana corioalantoide. I. Corrêa, Luciana. II. Título.

Huang I. Análise histomorfológica e imuno-histoquímica de fragmento de gengiva inserido em membrana córioalantóica de ovos fecundados de galinha. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 25 / 09 /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Zindel Deboni

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Adriana da Costa Neves

Instituição: Instituto Butântã Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Marcia Nishizawa

Instituição: Universidade Anhembi Morumbi Julgamento: Aprovado

Dedico esse trabalho aos meus pais, pelos inúmeros sacrifícios que fizeram por mim, por sempre me apoiarem e me mostrarem a importância dos estudos. Sem vocês eu não seria nada.

Dedico esse trabalho a minha esposa, Flavia Wu, por ser minha companheira e por sempre estar ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigado por me aturar nos meus momentos de impaciência, e nunca ter saído de perto. Te amo muito.

A minha irmã, Michelle, por se preocupar comigo, e pela ajuda quando eu precisei.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Luciana Corrêa, por ter me aceitado como seu aluno, mesmo eu não sabendo muito. Teve a paciência de me ensinar e de me guiar sempre em que eu estava em dúvida ou não sabia em como prosseguir no trabalho. Meu sinceros agradecimentos por tudo que eu aprendi na vida acadêmica, e pela oportunidade de ser seu orientando.

A Flávia Rosin, além da sua amizade e pelas conversas diversas, sempre me ajudou e respondeu as minhas dúvidas, não importa o quão ocupada ela sempre estava disposta a me ajudar.

Aos professores da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial: Profa Dra. Marília Trierveiler Martins, Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, Profa. Dra. Karen Lopez Ortega, Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini, Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado.

As amigas feitas no Laboratório de Patologia Experimental: Marina, Danielle, Mariana, Paula e Fabiola. Sempre irei lembrar dos momentos que passamos.

A Elisa, Juvani e Adriana, pelas ajudas e dúvidas respondidas que eu tive durante os experimentos.

A Cida, secretária da Radiologia, por sempre me acolher para tomar um café e pelas conversas.

Ao Vinícius, pela ajuda nos momentos em que precisei.

Ao colega e amigo Jun Ho Kim, pela amizade e ajuda em momentos em que eu mais precisei. E pelas conversas e doces que comemos.

A Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, por ter coletado e cedido o material necessário para a realização deste trabalho.

Aos colegas da Pós Graduação: Moses, Wladimir, Marcelo, Paulo, Cibebe, Anaeliza, Erika.

A agencia de fomento CAPES, pelo auxilio financeiro durante esses anos.

“Entregue o seu caminho ao Senhor; confie nele, e ele agirá”
Salmos 37:5

RESUMO

Huang I. Análise histomorfológica e imuno-histoquímica de fragmento de gengiva inserido em membrana corioalantóica de ovos fecundados de galinha [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

A membrana corioalantóica (MCA) é uma das membranas extraembrionárias do embrião da galinha, cuja característica principal é ser muito vascularizada e permeável a trocas iônicas e gasosas. O ambiente onde está inserida permite o desenvolvimento de vários modelos experimentais, incluindo estudos de angiogênese, toxicologia e biocompatibilidade, bem como análise do processo de reparo e de carcinogênese de inúmeros tecidos. O objetivo deste trabalho foi verificar as alterações histomorfológicas de fragmentos de gengiva enxertados na MCA, com o intuito de verificar a viabilidade da utilização desse modelo em estudos envolvendo a mucosa oral. Fragmentos de gengiva foram coletados de pacientes submetidos a cirurgia de exodontia e enxertados na MCA de ovos fecundados de galinha após 9 dias de desenvolvimento embrionário. A coleta das gengivas foi feita após 1, 3 e 5 dias de inserção na MCA. As alterações morfológicas microscópicas foram analisadas no decorrer do tempo no epitélio e na lâmina própria da gengiva e na MCA. Análise de TUNEL foi realizada para se comprovar a presença ou não de apoptose nos tecidos da gengivais. Foram realizadas também análises imuno-histoquímicas e quantificação da expressão de queratinas 10 (K10) e 14 (K14), para verificar as alterações de diferenciação epitelial, e CD34, para mensuração da vascularização. Do total de 25 ovos embrionados utilizados, 10 ovos receberam as gengivas para o experimento; o restante não mostrou viabilidade embrionária e foi descartado. Após 1 dia de inoculação, a interface MCA-gengiva exibiu intenso infiltrado inflamatório, o qual invadiu a lâmina própria. Após 5 dias, essa reação inflamatória ficou restrita à interface MCA-gengiva. As principais modificações morfológicas na gengiva foram observadas nos períodos de 3 e 5 dias de inoculação, em que houve perda da arquitetura do epitélio, mantendo-se somente a camada basal viável, e redução da celularidade na lâmina própria. Observou-se aumento da vascularização no período de 5 dias, atestada pela quantificação de vasos CD34 positivos. O epitélio remanescente exibiu ausência de estratificação e de expressão de K10, intensa marcação de K14 e células

TUNEL negativas, sugerindo a presença de células epiteliais viáveis e pouco diferenciadas. Concluiu-se que a gengiva foi incorporada à MCA, com redução paulatina da reação inflamatória e revascularização, bem como manteve-se viável nesse ambiente em um período de 5 dias; contudo, sofreu processos de adaptação que incluíram a perda da estratificação epitelial e a redução da celularidade na lâmina própria.

Palavras-chave: Gengiva. Ovo. Galinha. Membrana corioalantóica.

ABSTRACT

Huang I. Histomorphological and imunohistochemistry analysis of gingival fragments inserted in chorioallantoic membrane of chicken eggs [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Chorioallantoic membrane (CAM) is one of the chicken embryo extra embryonic membrane, whose main characteristic is being very vascularized and permeable for ionic and gaseous exchanges. The environment where it is inserted allows the development of many experimental model, including studies about angiogenesis, toxicology and biocompatibility, as well as analysis of the repair process and carcinogenesis of many tissues. The objective of this study was to verify the histomorphological changes of gingival fragments grafted on CAM, with the intent to check the viability of this model in studies involving oral mucosa. Fragments of gingiva were collected from patients undergoing dental extraction and grafted on CAM of fertilized chicken egg after 9 days of embryonic development. The collect of gingiva were made after 1, 3 and 5 days of insertion on CAM. The morphological alterations were analyzed over the time in the epithelium and lamina propria of gingiva and CAM. TUNEL analysis were made to evaluate the presence or not of apoptosis in the gingival tissue. Imunohistochemistry and quantification of the expression of keratin 10 (K10) and 14 (K14) were also made to check any alteration of epithelial differentiation, and CD34, for measurement of vascularization. Total of 25 fertilized egg were used, 10 eggs received gingiva for experiments; remaining egg didn't show embrionary viability and were discarded. After 1 day of inoculation, the CAM-gingiva interface exhibited a intense inflammatory infiltrate, which invaded the lamina propria. After 5 days, this inflammatory reaction were restricted to the CAM-gingiva interface. The main morphological changes in the gingiva were observed between 3 to 5 days of inoculation, in which there was loss of epithelial architecture, only the basal layer were viable, and a reduction of cellularity in lamina propria. Were observed a increase of vascularization in period of 5 days, attested by the quantification of positive CD34 vessel. The remaining epithelia showed the absence of stratification and expression of K10, intense marking of K14 and TUNEL cell negative, suggesting the presence of viable epithelial cells and less differentiated. It was concluded that the gingiva was incorporated by CAM, with gradual reduction of inflammatory reaction and

revascularization, as well remained viable in this environment in a period of 5 days; however, it underwent processes of adaptation that included the loss of epithelial stratification and the reduction of cellularity in the lamina propria.

Keywords: Gingival. Chorioallantoic Membrane. Egg. Chicken.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	MEMBRANA CORIOALANTOICA	19
2.2	MODELOS DE ESTUDO UTILIZANDO MEMBRANA CORIOALANTOICA	22
2.3	APLICAÇÕES DA MCA NA ODONTOLOGIA	29
2.4	QUERATINAS 10 E 14	30
2.5	CD34.....	32
2.6	HIPÓTESE.....	33
3	PROPOSIÇÃO.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	PREPARO DOS OVOS PARA ACESSO A MEMBRANA CORIOALANTOICA.....	37
4.2	COLETA DAS GENGIVAS E INSERÇÃO NA MEMBRANA CORIOALANTOICA.....	37
4.3	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	40
4.4	ENSAIO TUNEL.....	40
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
4.6	QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....	42
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43

5	RESULTADOS	45
5.1	VIABILIDADE DOS OVOS.....	45
5.2	ASPECTO MACROSCÓPICO E MICROSCÓPICO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA.....	46
5.3	ASPECTO MICROSCÓPICO DA GENGIVA INSERIDA NA MEMBRANA CORIOALANTÓICA.....	47
5.4	ANÁLISE DE TUNEL	51
5.5	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	55
5.5.1	<i>Queratina 10</i>	55
5.5.2	<i>Queratina 14</i>	59
5.5.3	<i>CD34</i>	63
6	DISCUSSÃO.....	69
7	CONCLUSÕES.....	75
	REFERENCIAS	
	ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

Em 1959, o princípio dos 3R (do inglês “replacement, reduction, and refinement”) foi proposto pela primeira vez por Russel e Burch para o uso mais racional dos animais nos experimentos científicos, sem perder a qualidade nas pesquisas (Tannenbaum; Bennett, 2015). Embora esses princípios sejam bastante reconhecidos e adotados por diversas legislações e protocolos pelo mundo todo, ainda não foram totalmente incorporados no dia a dia das pesquisas científicas (Tornqvist et al., 2014).

Modelos experimentais utilizando membrana corioalantóica (MCA) de ovos fecundados de galinha podem se enquadrar no princípio dos 3R, já que podem substituir algumas etapas experimentais em animais e podem ser concebidos causando interferência mínima no embrião (Walewska et al., 2017). Em ovos embrionados de galinha, a MCA é uma membrana extraembrionária utilizada em estudos sobre angiogênese, já que possui uma extensa rede de vasos sanguíneos; também tem sido aplicada em pesquisas sobre carcinogênese, invasão tumoral e metástases, pela facilidade de inserção de células cancerígenas e fragmentos de tumores; também tem aplicações nas áreas de toxicologia e biocompatibilidade de substâncias e biomateriais (Comsa et al., 2017; Vu et al., 2018). A MCA permite o xenotransplante de células e tecidos enxertados com baixos índices de rejeição, sendo de fácil manuseio laboratorial e de baixo custo (Sys et al., 2012; Jedelska et al., 2013). O baixo índice de rejeição ocorre porque o sistema linfóide do embrião ainda está incompleto, e o seu desenvolvimento total se dá em períodos mais tardios da embriogênese, permitindo a observação de xenotransplantes durante vários dias após a inoculação na MCA (Uloza et al., 2015).

Apesar de a MCA ser utilizada em vários experimentos para testes de materiais dentários e tumores na região de cabeça e pescoço (Van Tubergen et al., 2013, Ota et al., 2015, Ilyas et al., 2018), não encontramos nenhum estudo em que foi realizado xenotransplante de mucosa oral nessa membrana. As aplicações desse tipo de estudo seriam inúmeras, incluindo investigações acerca do potencial reparativo da mucosa oral, estudos de toxicidade à mucosa oral, e pesquisas sobre carcinogênese oral a partir da exposição a carcinógenos. Assim, delineamos o presente estudo, que teve como principal foco verificar se seria possível manter fragmentos de gengiva na MCA, observando principalmente as alterações morfológicas na mucosa gengival durante um período de cinco dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MEMBRANA CORIOALANTÓICA

A MCA presente em ovos embrionados de galinha é o produto da fusão do córion com o alantoide, duas membranas extraembrionárias que revestem o embrião em ovos amnióticos (Gabrielli; Accili, 2010). Após 4 dias de incubação, forma-se o alantóide da galinha, por intermédio a invaginação da parede ventral do intestino posterior endodérmico. Com 4 a 10 dias de incubação do ovo, a vesícula alantóica aumenta rapidamente o seu tamanho. Durante esse processo, é formada a MCA, através da fusão da mesoderme do alantoide com a mesoderme adjacente do cório (Ribatti, 2016) (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Esquema de desenvolvimento da membrana corioalantóica (MCA). Há fusão do alantoide com o córion, originando a MCA, a qual fica aderida à membrana da casca

Fonte: Adaptado de <http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0v.htm> e de http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/hillis2e_ch38_6.html

A MCA é constituída por três camadas derivadas de tecidos embrionários distintos: o epitélio coriônico ectodermal, que está intimamente ligado com o interior da casca do ovo, o mesoderme intermediário, que possui uma rica rede de vasos sanguíneos e componentes estromais, e o epitélio alantóico endodermal, que se sobrepõe à cavidade alantóica (Akins; Tuan, 1993).

Na mesoderme, existe uma abundante rede de vasos, ligada à circulação sanguínea do embrião por duas artérias alantóicas e uma veia alantóica. A vascularização da membrana corioalantóica passa por três fases de desenvolvimento. Nos estágios iniciais, múltiplos brotamentos capilares invadem o mesênquima, fundindo e formando o plexo capilar primário. No segundo estágio, os brotamentos não são mais visíveis; nas fases mais tardias, os capilares em crescimento aumentam de tamanho, originando malhas intercapilares. No quarto dia de incubação, os vasos da MCA possuem capilares indiferenciados, com as suas paredes formadas por uma simples camada de células endoteliais, sem a presença da lâmina basal. No oitavo dia, os vasos sanguíneos espalhados na mesoderme crescem rapidamente, até formar um plexo capilar intimamente ligado e sobreposto às células epiteliais do córion. A proliferação capilar continua rapidamente até o 11º dia de incubação. Entre os 10º e 12º dias, já se observa a presença de arteríolas e vênulas, e a parede das arteríolas possui uma ou mais camadas de células mesenquimais. As vênulas são cercadas por células mesenquimais indiferenciadas, que irão mais tarde se desenvolver em células musculares lisas. No 14º dia, o plexo capilar está localizado na superfície da ectoderme, adjacente à membrana da casca (Ribatti, 2016).

A MCA é uma estrutura bastante fina, dificilmente ultrapassando os 100µm de espessura. Histologicamente, observam-se três camadas: ectoderme, representada por uma ou duas camadas de células epiteliais, originando um epitélio denominado epitélio coriônico; a mesoderme, contendo células estromais, fibras colágenas e vasos sanguíneos de diferentes tamanhos localizados abaixo da ectoderme; e a endoderme, constituída por uma simples camada de células epiteliais planas, originando o epitélio alantóico (Deryugina; Quingley, 2008; Gabrielli; Accili, 2010). Após 10 dias de incubação, o epitélio coriônico pode assumir várias camadas, compostas por células que finalizam sua diferenciação após 14 dias da fecundação. Já o epitélio alantóico exibe transformações morfológicas no decorrer do tempo, passando de células achatadas para células mais cuboidais (Gabrielli; Accili, 2010).

A MCA possui diversas funções ao longo do desenvolvimento do embrião. Logo no início, antes do 6º dia após a fecundação, a membrana é responsável pelas trocas gasosas. Após alguns dias de incubação, passa a ser responsável pela respiração do embrião, uma vez que o alantoide está intimamente ligado a casca e devido à MCA ser altamente vascularizada (Ribatti, 2016). Inicialmente, O₂ e CO₂ difundem para o

embrião por intermédio do gradiente de pressão desses gases, ultrapassando a barreira da casca. Contudo, esse processo é insuficiente logo no início do desenvolvimento embrionário, sendo necessária a presença de rica rede vascular próxima à casca, localizada na MCA, para absorção desses gases. A MCA é altamente eficiente para eliminar CO₂, e menos eficiente para absorver O₂, devido à reduzida presença de água na interface membrana da casca e MCA, dificultando a difusão de O₂ (Ferner; Mess, 2011). Tem alto coeficiente de permeabilidade; curiosamente, a mucosa oral possui coeficiente muito próximo ao da MCA (Tay et al., 2011).

Essa membrana também possui uma importante função na osteogênese. O cálcio da casca do ovo é reabsorvido e transportado até o embrião para a formação dos ossos. Entre os 10° e 12° dias, as células coriônicas epiteliais começam a mobilizar e transportar cálcio da casca para dentro da circulação do embrião; essa atividade tem seu pico no 17° dia de desenvolvimento. O transporte de cálcio na membrana é unidirecional, sendo um processo ativo altamente específico para o Ca²⁺. É regulado pelas vitaminas K e D, por ATPases dependentes de Mg²⁺ e dependente de anidrase carbônica. e também pela quantidade de cálcio disponível na casca (Gabrielli; Accili, 2010).

A MCA é responsável também pela reabsorção de água e eletrólitos do fluido alantóide. A sua reabsorção se deve ao epitélio alantóide, que, embora seja a camada epitelial mais delgada, serve como uma barreira permeável seletiva, permitindo a absorção de água e eletrólitos e funcionando como uma eficiente defesa contra elementos tóxicos intraluminais. O epitélio alantoide absorve sódio e cloretos do fluido alantoide, e mantém os níveis de cálcio, potássio e fósforo nesse fluido, bem como de uréia e outros produtos do catabolismo protéico. Isso provavelmente se deve às numerosas junções célula-célula, presentes entre as células voltadas para o lúmen (Gabrielli; Accili, 2010).

2.2 MODELOS DE ESTUDO UTILIZANDO MEMBRANA CORIOALANTÓICA

A primeira evidência da utilização da MCA como um modelo de estudo para experimentos foi através de uma publicação de James B. Murphy em 1913, que inoculou células do sarcoma de Jensen (sarcoma de rato) na MCA após 6 dias de fecundação. No décimo oitavo dia de incubação, ele abriu os ovos e observou que 8 de 10 ovos permaneceram viáveis e, desses, apenas um não mostrou evidências de crescimento de tumor; em todos os outros, houve o crescimento de uma massa no local de inoculação das células (Murphy, 1913). Murphy afirmou que, ao inocular tecido de outros mamíferos no embrião da galinha, haveria ausência de uma resposta imune contra os tecidos inoculados (Ribatti, 2004). Como o sistema linfóide do embrião não está totalmente formado até os últimos dias de incubação, o embrião da galinha pode servir de hospedeiro para tecidos enxertados, sem que haja reações contra o tecido (Uloza et al., 2015).

Desde então, a MCA tem sido utilizada para estudos de angiogênese e invasão de células tumorais e metástase, transplante de órgãos e engenharia tecidual, como plataforma de visualização da distribuição e toxicologia de drogas e como base de teste de biocompatibilidade de biomateriais (Ribatti, 2014; Huang et al., 2017).

Particularmente nos modelos em que se utilizam fragmentos de tecidos, como é a proposta do presente estudo, a MCA tem sido utilizada principalmente para estudo da viabilidade de tumores (Sys et al., 2012; Sys et al., 2013; Uloza et al., 2015), para a verificação do efeito quimioterápico sobre tumores específicos (Ferician et al., 2015; Okamura et al., 1995), para estudo do funcionamento de órgãos, principalmente reprodutores (Uematsu et al., 2014; Isachenko et al., 2013; Qureshi et al., 2008; Vatanparast et al., 2018), e para análise do processo de reparo em vários tecidos (Huxlin et al., 1992; Katoh et al., 2001), incluindo fragmentos de tecido ósseo (Moreno-Jiménez et al., 2016). O quadro 2.1 descreve alguns desses estudos utilizando fragmentos de tecido inoculados na MCA.

Uma investigação mais antiga referente à inoculação de tecidos na MCA revelou que existem três processos distintos de neovascularização dos enxertos na MCA. O primeiro foi observado em fragmentos de sarcoma de rato, em que foi observada penetração de vasos sanguíneos do hospedeiro no interior do enxerto; o segundo tipo foi a anastomose de vasos recém-formados pelo enxerto com a rede vascular do hospedeiro, observada em tecidos normais embrionários de ratos e de galinha; e o terceiro tipo foi a ausência de revascularização, com completa deterioração da rede vascular do enxerto, detectada em tecidos normais adultos de ratos. Nesse caso, a presença de vasos do hospedeiro no enxerto foi associada a um processo de reação de corpo estranho, como tentativa para eliminar o fragmento tecidual (Ausprunk et al., 1975).

Um exemplo de aplicação da MCA para fragmentos de tecido duro é o de Moreno-Jiménez et al. (2016), que testou a hipótese de que a MCA pode ser usada para análise da regeneração de osso humano. Os autores utilizaram amostras da cabeça femoral de pacientes que passaram por cirurgia ortopédica, e criaram um modelo de reparo ósseo criando pequenos defeitos nos cilindros de osso. As amostras ficaram enxertadas na MCA por sete dias. Observaram que os vasos sanguíneos da MCA infiltraram no osso implantado; houve também deposição de matriz extracelular e condensação endocondral no osso. Para determinar se o tecido estava viável após a implantação na MCA, no momento da coleta dos fragmentos, culturas primárias de células derivadas da amostra implantada foram feitas, confirmando que o tecido se manteve viável nesses sete dias inoculados na MCA.

Um dos tecidos utilizados nesses modelos, que possui certa semelhança com a mucosa oral, é a pele. Um estudo pioneiro foi conduzido por Goodpasture et al. (1938), no qual fragmentos de pele humana foram inoculados na MCA e analisados histologicamente durante 10 dias. Os autores verificaram a perfeita incorporação desses fragmentos à MCA, com manutenção da integridade da epiderme e da derme, fusão do epitélio coriônico com a epiderme, presença de neovascularização na derme, com circulação de eritrócitos da ave, e presença de leucócitos aviários em meio a derme.

Manutenção da pele humana inoculada na MCA foi também observada em outro estudo, no qual os autores analisaram o potencial alergênico de alguns cosméticos; nesse trabalho, verificaram uma resposta de células de Langerhans nas peles enxertadas após o contato com essas substâncias (Slodownik et al., 2009).

Em outra investigação, fragmentos de pele de embrião foram inoculados na MCA, com o intuito de esclarecer o potencial regenerativo desse tecido. Os autores verificaram que houve regeneração integral da epiderme e da derme após lesão induzida nos fragmentos inoculados na MCA, sem formação de cicatriz (Carre et al., 2012).

Quadro 2.1 – Exemplos de estudos envolvendo fragmentos de tecidos inoculados na membrana corioalantóica (MCA)

Material utilizado	Objetivo do trabalho	Tempo do tecido na MCA	Principais resultados em relação às características do tecido inseridos na MCA	Ref
Sarcoma de sistema musculoesquelético de humano	Determinar a eficácia do MCA para estudar as características de tumores do sistema musculoesquelético	6 a 8 dias	Aderência do tumor à MCA; microscopicamente, foi observada a incorporação do tecido com a MCA; todos os tumores mantiveram a morfologia original	Sys et al. (2012)
Cabeça do fêmur humano	Avaliar se a MCA pode ser utilizada para cultivar e estudar a regeneração de ossos humanos	8 dias	Vasos da MCA infiltraram os cilindros de osso humano; o tecido se manteve viável na MCA; a implantação na MCA induziu a deposição de matriz extracelular e de condensação endocondral	Moreno-Jiménez et al. (2016)
Sarcoma humano	Avaliar o comportamento de xenotransplante na MCA de sarcoma humano	7 dias	Aderência do tumor ao MCA; neovascularização do tumor	Sys et al. (2013)
Testículo de camundongo	Estabelecer um sistema para cultura de testículo de camundongo na MCA e investigar se a MCA induz a espermatogênese e meiose de células germinativas	5 e 7 dias	Tecidos que sobreviveram na MCA apresentaram uma boa vascularização; a membrana dos túbulos seminíferos continuou intacta; o tamanho dos túbulos seminíferos e a quantidade de células germinativas foram maiores que o controle	Uematsu et al. (2014)
Carcinoma de células escamosas da laringe humano	Avaliar as características morfológicas e morfométricas e a angiogênese em fragmentos de tumor inseridos na MCA	2, 3 e 4 dias	As células do tumor mantiveram a sua vitalidade 2, 3 e 4 dias após a implantação; o tumor estava aderido a MCA; o tumor manteve todas as características morfológicas e histológicas após a implantação no MCA e não houve sinais de necrose	Uloza et al. (2015)
Ovário de vacas	Avaliar a MCA como cultura de curto prazo para tecido de ovário bovino adulto comparado com o sistema tradicional <i>in vitro</i>	1, 3 e 5 dias	Infiltração de vasos da MCA no ovário; o ovário se manteve saudável durante 5 dias na MCA; não houve diferenças histológicas no ovário da MCA com culturas <i>in vitro</i>	Beck et al. (2018)
Esôfago de Barret	Validar o modelo com MCA como uma ferramenta de estudo das características fluorescentes do tecido de Barret humano, para fins de fotodiagnóstico	1 a 9 dias	O tecido se manteve viável na MCA em média de 1,7 dias; houve aumento de protoporfirina IX (fotossensibilizador) durante o período de inoculação	Holz et al. (2016)
Tumor renal humano	Avaliar os efeitos da endostatina no tumor renal e na rede vascular dentro e ao redor dos tumores implantados	7 dias	Os fragmentos tumorais exibiam vitalidade após 7 dias na MCA; os tumores do grupo controle aumentaram de tamanho, enquanto os tratados com endostatina diminuíram	Ferician et al. (2015)

Continua na próxima página

Quadro 2.1 – Exemplos de estudos envolvendo fragmentos de tecidos inoculados na membrana corioalantóica (MCA) (continuação)

Material utilizado	Objetivo do trabalho	Tempo do tecido na MCA	Principais resultados em relação às características do tecido inseridos na MCA	Ref
Ovário humano	Comparar a eficácia do descongelamento de tecido do ovário de humano, congelado logo após a cirurgia, ou resfriado em 5°C por 24 h logo após a cirurgia e congelado após esse tempo	5 dias	Após 5 dias na MCA, foi observada a propagação de pedaços do ovário na camada mesenquimal da membrana; apenas os folículos pré-antrais estavam viáveis	Isachenko et al. (2013)
Fragmentos da cortical do ovário de cordeiro	Examinar a hipótese de que a testosterona é responsável pelo aumento de folículos primários visto nos ovários policísticos	5 dias	Folículos saudáveis de todos os estágios foram vistos no tecido vascularizado; o tratamento com hormônio (testosterona e FSH) levou a um aumento seletivo na proporção de folículos primários	Qureshi et al. (2008)
Carcinoma de células renais, carcinoma urotelial, tumor do testículo, adenocarcinoma de humanos	Examinar se a MCA cumpre os pré-requisitos para testes individuais de quimiossensibilidade contra o câncer	8 dias	Os tecidos estiveram viáveis em 11 de 14 carcinomas de célula renal, 7 de 9 carcinomas uroteliais, 2 de 3 carcinomas de testículo, 1 carcinoma de cólon, 1 carcinoma de ovário e nenhum de carcinoma de próstata	Okamura et al. (1995)
Ovário de ovelhas	Comparar a efetividade de dois métodos de criopreservação do tecido ovariano da ovelha (congelamento lento e vitrificação)	5 dias	Proliferação folicular é preservado após a cultura na MCA	Vatanparast et al. (2018)
Retina de rato	Enxertar a retina de rato na MCA e determinar se o seu desenvolvimento é comparável com o grupo controle	1 e 12 dias	Os tecidos enxertados na MCA mantiveram-se viáveis pelo tempo examinado; o modelo permitiu a sobrevivência da retina com características comparáveis com a cultura convencional desse tecido	Huxlin et al. (1992)
Fígado de galinha	Mostrar que o fígado implantado na MCA pode regenerar sem a presença de células-tronco, e que a penetração de vasos possui um importante papel na regeneração	3 a 11 dias	A regeneração do fígado iniciou a partir de células sobreviventes localizadas na periferia do lóbulo hepático; estas migraram para a porção mais interna do lóbulo; o tecido de fígado na MCA foi bem regenerado, tanto morfológica quanto funcionalmente	Katoh et al. (2001)
Rim de rato	Estudo da origem e desenvolvimento dos vasos sanguíneos do rim de ratos na MCA	Até 10 dias	Rins indiferenciados transplantados na MCA por 7 dias diferenciaram e desenvolveram as principais estruturas do rim; na maioria dos casos, os rins foram vascularizados com vasos da MCA	Sariola et al. (1983)

Continua na próxima página

Quadro 2.1 – Exemplos de estudos envolvendo fragmentos de tecidos inoculados na membrana corioalantóica (MCA) (continuação)

Glândula pituitária de galinha	Verificar a o papel dos hormônios de crescimento na angiogênese da MCA após inoculação de glândula pituitária	4 dias	Houve formação aumento da densidade vascular na MCA, incrementada pelos hormônios de crescimento	Gould et al. (1995)
Pele normal humana	Verificar a viabilidade de fragmentos de pele humana na MCA	Até 10 dias	Incorporação do fragmento de pele à MCA, com manutenção das estruturas cutâneas, fusão do epitélio coriônico com a epiderme e neovascularização da derme	Goodpasture et al. (1938)
Tecidos normais (músculo esquelético, coração, fígado e rins) embrionários e adultos de ratos e sarcoma de Walker de ratos	Verificar o processo de vascularização de tecidos inoculados na MCA	Até 9 dias	Os fragmentos de tumor vascularizaram rapidamente e duplicaram de tamanho após 9 dias. Os tecidos normais revascularizaram somente na periferia; os tecidos normais embrionários revascularizaram integralmente após dois dias de inoculação	Ausprunk et al. (1975)
Pele normal humana	Verificar a viabilidade de fragmentos de pele humana na MCA e a imunofenotipagem presente	5 dias	Houve incorporação completa dos fragmentos à MCA, bem como neoformação vascular, com manutenção de células endoteliais humanas e expressão de moléculas com manutenção do imunofenótipo humano	Kunzi-Rapp et al. (1999)
Pele normal humana (5mm)	Analisar a resposta alergênica a alguns cosméticos, pela quantificação de células de Langerhans	4 dias	Foi possível verificar a resposta de células de Langerhans aos cosméticos, mantendo a integridade da pele para visualização dessa resposta	Slodownik et al. (2009)
Pele de embrião de camundongo	Verificar o reparo de lesão circular feita com laser na superfície do fragmento de pele xenotransplantado na MCA	10 dias	Houve incorporação da pele na MCA e regeneração completa da epiderme e da derme, sem formação de cicatriz. A diferenciação da pele foi, contudo, mais reduzida em comparação à diferenciação no próprio embrião	Carre et al. (2012)

2.3 APLICAÇÕES DA MCA NA ODONTOLOGIA

Na área da odontologia, a MCA é bastante utilizada para o estudo de biomateriais, principalmente quanto ao potencial de angiogênese desses biomateriais. É um interessante modelo alternativo aos métodos *in vivo*, sendo de baixo custo.

Ilyas et al. (2018), em seu estudo sobre composto de colágeno com hidroxiapatita, usaram o modelo da MCA para investigar a capacidade de angiogênese do material. Os autores observaram que o composto ficou bem aderido à MCA, com uma ampla rede de vasos sanguíneos convergindo em direção ao compósito. Khan et al. (2017) também utilizaram a MCA para estudo sobre material de hidroxiapatita com nanotúbulos de carbono; os autores conseguiram resultados interessantes quanto à capacidade de angiogênese da hidroxiapatita. Em seu trabalho sobre fibrina com hidrogel e o seu impacto sobre os tecidos e a vascularização, Hertig et al. (2017) mostraram que a fibrina com hidrogel e somente o hidrogel tiveram boa biocompatibilidade com a MCA; no entanto, não houve nenhum crescimento de vaso sanguíneo no material.

A MCA também tem sido utilizada para o estudo de tumores de cabeça e pescoço. Em geral, são inoculadas células desses tumores, e observados aspectos referentes a crescimento tumoral, invasão e metástase, bem como angiogênese induzida pelas células tumorais (Liu et al., 2013, Van Tubergen et al., 2013; Ota et al., 2016).

Um estudo também verificou o potencial osteogênico da cartilagem do côndilo mandibular, inoculando na MCA fragmentos dessa cartilagem oriunda de fetos de camundongos. Esses fragmentos foram mantidos na MCA por 5 dias. Os autores verificaram a presença de matriz semelhante à matriz óssea no interior da cartilagem, sugerindo que os condroblastos se transformam diretamente em osteoblastos, sem necessariamente haver apoptose das células da cartilagem (Jing et al., 2015).

Não encontramos nenhum trabalho que tivesse avaliado a viabilidade ou as características morfológicas da mucosa oral humana enxertada na MCA.

2.4 QUERATINAS 10 E 14

No presente estudo, foram analisadas as queratinas 10 (CK10) e 14 (CK14), para caracterização da diferenciação das células epiteliais da mucosa oral após a inoculação na MCA.

As queratinas são proteínas citoesqueléticas expressas nas células epiteliais. Constituem membros da família dos filamentos intermediários, os quais são divididos em duas grandes classes, de acordo com suas propriedades bioquímicas e imunológicas: tipo I (ácidas), reguladas por 13 genes, e tipo II (básicas), reguladas por 15 genes (Salas et al., 2016). As queratinas não relacionadas ao pêlo e ao cabelo são as Ks 1 a 24. Nos tecidos epiteliais da pele e mucosa oral, as queratinas do tipo I encontram-se combinadas às do tipo II, formando os filamentos intermediários do citoesqueleto; por exemplo, o par K1/K10 é expresso nas camadas suprabasais, enquanto o par K5/K14 encontra-se na camada basal (Salas et al., 2016).

As queratinas possuem heterogeneidade considerável e especificidade entre os tecidos epiteliais; a sua expressão depende da proliferação e diferenciação, do estado da transformação celular e do seu estado de desenvolvimento do epitélio (Pan et al., 2013; Hansson et al., 2001; Chen et al., 2006). São os marcadores mais sensíveis da diferenciação e proliferação epitelial (Bonan et al., 2006). Constituem a maior parte do citoesqueleto, que fornece o suporte mecânico para as células no epitélio (Luomanen et al., 1997).

As queratinas sofrem diversas transformações pós-translacionais (fosforilação, glicosilação, acetilação), as quais determinam modificações na sua distribuição no citoesqueleto. Essas modificações interferem também em vários processos celulares, tais como proteção contra apoptose, por sequestrarem proteínas pró-apoptóticas do citosol; também promovem a manutenção da ancoragem celular, pela regulação de desmossomos e hemidesmossomos, principalmente durante a ação mecânica sobre o epitélio (Salas et al., 2016).

No presente projeto, analisamos a expressão imuno-histoquímica da K10 e K14. A K10 é caracterizada por possuir domínios ricos em glicina e por não ter sítios de clivagem por caspases, protegendo as células contra apoptose; já a K14 liga-se a desmossomos e hemidesmossomos, conferindo aos queratinócitos adesão intercelular e à membrana basal, mantendo a continuidade epitelial (Oshima, 2002; Marceau et al., 2007).

A K10 é expressa em queratinócitos suprabasais de epitélios queratinizados, indicando diferenciação pós-mitótica e aparentemente prevenindo a mitose. Já a K14 é fundamental em epitélios estratificados, sendo fortemente expressa na camada basal. É associada a atividade mitótica e a um fenótipo pluripotente nas células da camada basal (Bragulla; Homberger, 2009).

Em termos gerais, na mucosa oral ortoqueratinizada, a K10 é expressa nas camadas espinhosa e granulosa, e a K14, na camada basal. Na mucosa oral paraqueratinizada, a K10 é expressa na camada espinhosa, e a K14, na camada basal do epitélio. Contudo, variações regionais existem; por exemplo, na gengiva marginal, diferentes padrões de expressão de K5, 14, 4, 13, 6, 16 e 19 podem ser observados (Rao et al., 2014; Koike et al., 2011; Marley et al., 1994).

A K10 pode não estar expressa em diversas regiões da mucosa oral normal, tais como mucosa jugal, e pode estar fortemente expressa em situações de inflamação, como por exemplo mucosite derivada de radioterapia; nesse caso, sua expressão pode ser interpretada como um processo de aumento da camada de queratina do epitélio. Já a K14, expressa na camada basal do epitélio da mucosa oral normal, pode estar presente em camadas mais superiores em situações de mucosite, indicando uma tentativa de renovação epitelial por intermédio da proliferação de queratinócitos (Bonan et al., 2006).

Na mucosa oral de ratos, a K10 esteve presente nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio do palato e da mucosa jugal, estando associada a regiões de queratinização; já a K14 foi expressa fortemente na camada basal do epitélio da mucosa jugal e discretamente nas camadas mais superiores, enquanto no palato a expressão dessa queratina foi intensa e uniforme em todas as camadas epiteliais. Os autores comentaram haver diferenças na expressão dessas queratinas comparando-se a mucosa oral humana com a de ratos (Murakami et al., 2014).

2.5 CD34

No presente estudo, utilizou-se o CD34 como marcador vascular, para identificação da densidade vascular nas gengivas inoculadas na MCA.

O CD34 é uma fosfoglicoproteína transmembrana presente em diversos tipos de células progenitoras, incluindo as localizadas na parede vascular. Apesar de o CD34 ser um marcador conhecido para as células-tronco hematopoiéticas, atualmente ele é bastante utilizado como um importante marcador de outros tipos de células não hematopoiéticas, como as células endoteliais progenitoras. Na microvasculatura onde as células endoteliais adultas estão localizadas, podemos notar forte expressão de CD34. Na angiogênese, nas suas fases iniciais e antes da fase de brotamento, as células positivas ao CD34 se separam da parede dos vasos, mudando de um estado em repouso e estável, para um estado proliferativo, começando assim a fase de brotamento da angiogênese (Sidney et al., 2014).

O CD34 é bastante expresso nas células endoteliais de vasos sanguíneos, mas também apresenta uma fraca expressão no endotélio linfático (Miettinen, 2014). Na mucosa oral e em tumores da cavidade oral (linfangioma, hemangioma e carcinoma epidermóide), contudo, os vasos linfáticos são, em geral, negativos para CD34 (Xuan et al., 2005; Inoue et al., 2011).

Na mucosa oral, podemos observar a expressão do CD34 nas células endoteliais e nas células adventícias de arteríolas, conhecidas como células fibroblásticas estromais (Desai et al., 2010). Essas células são totipotentes e consideradas células-tronco mesenquimais, sendo encontradas em íntimo contato com a parede vascular, o tecido nervoso periférico e as fibras musculares da mucosa oral e do ligamento periodontal (Roman et al., 2015).

Testes imuno-histoquímicos utilizando o CD34 têm sido feitos em inúmeros estudos envolvendo a MCA, para análise de angiogênese sob diferentes condições experimentais (Mîndrilă et al., 2014; Manjunathan, Ragunathan, 2015). Em geral, as reações com anticorpos anti-CD34 humano não marcam vasos da MCA, sendo possível a identificação da origem da rede vascular, a qual geralmente ocorre por anastomose entre vasos da MCA e do tecido enxertado (Manjunathan; Ragunathan, 2015).

2.6 HIPÓTESE

Com base na literatura, achamos que o microambiente da MCA será adequado para manutenção da vitalidade das estruturas da mucosa gengival, porém modificações na expressão da K10, K14 e CD34 poderão estar presentes, em função principalmente das modificações dos teores de oxigênio e da vascularização.

3. PROPOSIÇÃO

Geral:

Verificar a viabilidade de se utilizar o modelo de MCA para enxertia da gengiva humana em ovos fecundados de galinha, e analisar as características microscópicas dessa gengiva enxertada em três períodos distintos de observação.

Específicos:

- Analisar as alterações morfológicas no epitélio e na lâmina própria das gengivas e na MCA como um todo, nos períodos de 1, 3 e 5 dias após a inoculação.
- Descrever e quantificar a expressão das K10 e 14 no epitélio da gengiva enxertada, nos períodos citados.
- Descrever e quantificar a expressão de vasos CD34 positivos presentes na lâmina própria da gengiva enxertada, nos períodos citados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia a seguir foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FOUSP Nº 007/2017) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (Número do Parecer: 2.006.188) (Anexo A).

4.1 PREPARO DOS OVOS PARA ACESSO À MEMBRANA CORIOALANTÓICA

O procedimento a seguir foi adaptado de Uloza et al., 2015. Ovos embrionados (n=25) de galinha (*Gallus gallus domesticus*) foram adquiridos de granjas locais ou do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Os ovos foram limpos com álcool 70%; em seguida, foram introduzidos em incubadora para ovos (Chocadeira Golden 70 ovos- Automática Digital, Chocadeiras Golden, Piracicaba, Brasil) na temperatura de 37°C e umidade relativa de 60%, com rotação dos ovos em 360° ao longo do seu próprio eixo a cada 4 horas. Foram mantidos nessas condições por 3 dias.

No terceiro dia de incubação, com uma agulha inserida na parte de cima do ovo, 2 ml de albumina foram retirados, para descolar a MCA da membrana da casca do ovo. Em seguida, com um motor elétrico e disco diamantado, foi realizada uma abertura de 1 cm² na porção central da casca do ovo, a qual foi posteriormente selada com fita adesiva, para evitar a desidratação. O ovo foi, então, colocado novamente na incubadora, dessa vez sem a rotação.

4.2 COLETA DAS GENGIVAS E INSERÇÃO NA MEMBRANA CORIOALANTÓICA

Fragmentos de gengivas (n=10) foram coletados de pacientes submetidos a cirurgia de exodontia de terceiro molar incluso, que necessitavam de ressecção parcial de gengiva na região do trígono retromolar. A coleta foi feita na Clínica de Cirurgia do Departamento de Cirurgia da FOUSP, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e sob assinatura prévia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente.

Imediatamente após a coleta, o fragmento foi introduzido em solução contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), com 2% de antibiótico e antimicótico (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e encaminhado para o Laboratório de Patologia Experimental da FOUSP, para logo em seguida ser inserido na MCA. Após sucessivas lavagens com solução antibiótica, a gengiva foi seccionada em duas partes; uma parte foi enxertada na MCA e a outra foi fixada em paraformaldeído a 4%, constituindo assim um grupo controle. O maior diâmetro dos fragmentos variou de 2,0mm a 4,0mm.

A inserção das gengivas na MCA foi realizada no dia 9º dia de incubação. Os fragmentos foram gentilmente dispostos na superfície da MCA, com a lâmina própria em contato direto com o epitélio coriônico. Após a verificação do correto posicionamento dos espécimes, os ovos foram novamente introduzidos na incubadora e mantidos sob temperatura de 37°C e umidade relativa de 60%.

Após 1 dia (n=3), 3 dias (n=3) e 5 dias (n=4) da enxertia do tecido na MCA, foi feita a coleta das gengivas em conjunto com a MCA, as quais foram fixadas em paraformaldeído 4%. O restante do ovo foi descartado e enviado para incineração.

A figura 4.1 ilustra o procedimento de preparo dos ovos e enxertia dos fragmentos de gengiva. A figura 4.2 mostra a gengiva inserida na MCA.

Figura 4.1 – Esquema da metodologia de preparo do ovos, abertura da janela na casca e inoculação da gengiva

Figura 4.2 – Exemplo de fragmento de gengiva (seta) inserido na membrana corioalantóica após 9 dias de incubação (A). Nota-se ao fundo o embrião. O fragmento foi mantido por 3 dias (B), período em que se nota o crescimento do embrião. Detalhe do fragmento da gengiva no momento da inoculação (C) e após 3 dias (D)

4.3 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Após as gengivas controle e as enxertadas serem fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas, foram submetidas a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Foram obtidos cortes histológicos (3 μ m de espessura), os quais foram corados com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram posteriormente analisados quanto às características morfológicas das estruturas da gengiva e da MCA.

4.4 ENSAIO DE TUNEL

O ensaio de TUNEL (do inglês “terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling”) foi realizado nos fragmentos de gengiva controle e nos enxertados na MCA, com o intuito de verificar a presença de fragmentação do DNA, sugestiva de apoptose. Cortes histológicos (3 μ m de espessura) montados em lâmina silanizada foram desparafinizados em dois banhos de xilol (5 minutos cada) e inseridos em etanol a 100% por 5 minutos. Em seguida, foi feita a reidratação do tecido com banhos de etanol em concentração decrescente por 3 minutos cada e lavagem com solução de 0,85% de NaCl por 5 minutos. Foi feita a incubação com Proteinase K (20 μ g/ml) diluído em PBS durante 10 minutos. Mais duas lavagens em PBS foram realizadas por 5 minutos cada, e as células foram permeabilizadas em solução Triton X-100 a 0,2% diluído em PBS durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas com os reagentes do kit Dead End Fluorometric Tunel System (Promega Inc., Madison, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Por fim as lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, CA, USA) e analisadas em microscópio de fluorescência (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemanha).

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram realizados testes imuno-histoquímicos para K10 e K14, para análise das características do epitélio, e CD34, para visualização e quantificação de vasos sanguíneos. Cortes histológicos de 3 μ m foram dispostos em lâminas silanizadas. Após a desparafinação com xilol e a reidratação do tecido com etanol em concentrações decrescentes, foi feita a recuperação antigênica dos tecidos. Para os anticorpos anti-K10 e anti-K14, a recuperação antigênica foi realizada em solução de ácido cítrico 0,01M (pH 6,0) a 95°C por 30 minutos; para o anticorpo anti-CD34, a recuperação antigênica foi realizada com proteinase K (20 μ g/ml) diluída em PBS durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após isso, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com dois banhos (15 min cada) em solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%. Após o bloqueio da peroxidase, os cortes foram lavados em dois banhos de 1 minuto cada em água destilada e em dois banhos em TBS (150mM de NaCl, 20mM de Tris base pH 7,6). Em seguida, foi feito o bloqueio de sítio inespecífico com BSA 1% por uma hora. Depois do bloqueio de sítio inespecífico, os cortes foram incubados com os anticorpos anti-K10, anti-K14 e anti-CD34 por 1 hora em temperatura ambiente. As características dos anticorpos constam na Tabela 4.1. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com TBS (três banhos de 2 minutos cada), e em seguida realizou-se a incubação com anticorpo secundário conjugado com biotina (30 minutos) e com o complexo terciário (30 minutos) (Vectastain kit, Vector Laboratories, CA, USA); cada incubação foi intercalada com três imersões em solução de TBS (2 minutos). A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) (Dako Liquid DAB Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) e a contracoloração com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram então desidratados em banhos em cadeia crescente de etanol e diafinizados com xilol. As lâminas foram então montadas com fita de polietileno (Coverslipping Film Finitex, Sakura, EUA) em sistema de montagem automatizada (Tissue- Tek SCA, Sakura, EUA).

Tabela 4.1 – Características dos anticorpos utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo Primário	Procedência	Espécie	Diluição	Recuperação Antigênica
Anti-K10	Dako (clone DE-K10)	Camundongo	1:100	Ácido Cítrico
Anti-K14	Cell Marque (clone LL002)	Camundongo	1:500	Ácido Cítrico
Anti-CD34	Spring Bioscience (clone QBEnd/10)	Camundongo	1:150	Proteinase K

4.6 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A marcação imuno-histoquímica dos anticorpos anti-K10, anti-K14 e CD34, revelada pela coloração marrom do DAB, foi quantificada objetivamente por meio de método de deconvolução da imagem (Ruifrok; Johnston, 2001), com o qual é possível separar a cor marrom da cor azul da hematoxilina. Para tanto, foram digitalizados cinco campos de cada espécime de gengiva controle e enxertada, no aumento original de 400X, escolhendo-se as regiões de maior marcação, mantendo-se constantes a área de tecido (2048 x 1536 pixels), a resolução e o formato da imagem (300 dpi, padrão RGB, formato JPEG). Os campos digitalizados foram então submetidos a deconvolução da imagem utilizando plugin (Landini, 2015) instalado no programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Com isso, foram obtidas três imagens distintas, uma contendo somente a cor marrom (referente ao DAB), outra contendo somente a cor azul (da hematoxilina) e uma terceira imagem contendo cores residuais.

Para o cálculo da marcação de K10 e K14, foi acessado o histograma da imagem contendo a cor marrom, no qual consta lista de pixels com as respectivas intensidades dessa cor ($\text{Pixel}_{\text{intensity}}$) (que variaram de 0 – tom de marrom mais escuro, até 255 - tom de marrom mais claro), bem como o número de pixels contendo cada tom ($\text{Pixel}_{\text{counting}}$). Em seguida, foi aplicada a fórmula abaixo, a qual gerou uma porcentagem de marcação, que abrangeu tanto a intensidade do tom de marrom quanto a quantidade de pixels referente a cada tom; isso equivale a se analisar a reação imuno-histoquímica considerando-se tanto a intensidade quanto a extensão de marcação. Esse método foi adaptado de Helps et al. (2012).

$$\%DAB = \left(\frac{\sum [(255 - pixel_{intensity}) \times pixel_{counting}]}{(\sum pixel_{counting}) \times 255} \right) \times 100$$

Para o cálculo da marcação do CD34, após a deconvolução da imagem, os tons de marrom foram selecionados por intermédio da ferramenta “Threshold” do ImageJ, obtendo-se em seguida a porcentagem de área de marcação do marrom. Utilizamos esse método para o CD34 porque não verificamos variação na intensidade de marcação, mas sim na extensão da marcação, sendo suficiente somente o cálculo da área de marcação.

Além da quantificação da área de marcação do CD34, foi também realizada quantificação manual dos vasos CD34 positivos. Foram quantificadas as estruturas CD34 positivas compatíveis com parede vascular, com lúmen visível. Foi obtida, então, a densidade vascular (número de vasos/campo).

Todo o procedimento foi realizado pelo mesmo operador, sem conhecimento dos grupos analisados (análise cega).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos da quantificação da marcação imuno-histoquímica para K10 e K14 seguiram uma curva paramétrica e foram apresentados em média e desvio-padrão. Os dados numéricos da quantificação da marcação do CD34 foram não-paramétricos, e foram apresentados em média, mediana, valores mínimo e máximo, e primeiro e terceiro quartis. Para a comparação entre os grupos das marcações de K10 e K14, foi utilizada análise de variância Anova, seguida do teste de Tukey. Para a marcação de CD34, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade dos ovos

Do total de 25 ovos submetidos à abertura da casca, 15 (60,0%) tinham sinais de estarem fecundados (Figura 5.1A), sendo eliminados 10 (40,0%) ovos ou por estarem sem embrião (Figura 5.1B), ou por exibirem MCA alterada, sugerindo contaminação (Figura 5.1C). Esta ocorreu provavelmente porque os ovos eram provenientes de locais nos quais não eram mantidos em condições de assepsia. Dos 15 fecundados, 10/15 (66,7%) receberam fragmentos de gengiva; 5/15 (33,3%) não foram utilizados até o fim do experimento ou porque houve falha no processo de desenvolvimento do embrião (Figura 5.1D), ou porque houve a quebra da casca durante a manipulação. Assim, na nossa amostra, tivemos 33,4% de ovos viáveis para uso da MCA.

Figura 5.1 – Exemplos de situações de viabilidade dos ovos no momento da abertura da janela na casca e durante a incubação. A: Membrana corioalantóica exibindo esboço de vascularização após 3 dias de incubação, sugerindo fecundação (seta). B: Membrana corioalantóica sem sinais de fecundação. C: Membrana corioalantóica opaca, avascular, com coagulação protéica, sugerindo contaminação. D: Embrião inviável e membrana corioalantóica com rede vascular não-desenvolvida

5.2 Aspecto macroscópico e microscópico da membrana corioalantóica

Macroscopicamente, a membrana corioalantóica no 9º dia de incubação exibiu moderada vascularização e translucidez completa, sendo visível o embrião em muitos casos (Figura 5.2A). Microscopicamente, observou-se tecido conjuntivo frouxo, bem celularizado e vascularizado, composto por células mesodérmicas difusamente distribuídas (Figura 5.2B); na superfície em contato com a casca, esse tecido era revestido por epitélio (epitélio coriônico) composto por células poligonais justapostas, formando três a quatro camadas (Figura 5.2C); na superfície oposta, em contato com o alantoide, observou-se epitélio (epitélio alantoide) mais delgado, formado por células cuboidais originando até duas camadas (Figura 5.2D).

Figura 5.2 – Aspecto da membrana corioalantóica no momento de inoculação da gengiva (após 9 dias de incubação). A: Aspecto macroscópico, em que se nota presença de embrião vital e grande quantidade de vasos sanguíneos. B: Aspecto microscópico evidenciando epitélio coriônico (ec), camada mesodérmica intermediária (m) exibindo inúmeras células mesenquimais e epitélio alantoico (ea). C: Detalhe do epitélio coriônico (ec), composto por células poligonais, e do epitélio alantoico (ea) constituído de células cuboidais; o mesoderma (m) é ricamente vascularizado. D: Vaso sanguíneo de luz ampla e parede delgada, localizado no mesoderma, contendo eritrócitos nucleados em seu interior, típicos de aves (Hematoxilina-eosina, aumento original de 100 e 400X)

5.3 Aspecto microscópico da gengiva inserida na membrana corioalantóica

1 dia

As gengivas nesse período exibiram epitélio pavimentoso, com estratificação completa e queratinização, porém sinais de deterioração das camadas superficiais eram visíveis comparando-se com o controle (Figuras 5.3A e 5.3B). Individualmente vários queratinócitos exibiam degeneração vacuolar e núcleos picnóticos, bem como hiperchromatismo nuclear das células basais. Em um espécime, fenda separando o tecido epitelial da lâmina própria estava presente (Figura 5.3C). Nesse caso, as células basais mantiveram-se unidas à membrana basal, compondo um epitélio contínuo. Na lâmina própria, observou-se aumento de celularidade, principalmente na região próxima ao epitélio, composta principalmente por infiltrado inflamatório mononuclear difuso, com várias células plasmocitárias e células semelhantes a macrófagos (Figura 5.3D). Vasos sanguíneos congestionados também se fizeram presentes.

3 dias

Nesse período, notou-se necrose nas camadas intermediárias e superficiais do epitélio gengival, as quais se destacaram das camadas suprabasal e basal (Figura 5.4A). Esta manteve-se aderida à lâmina própria, sendo visíveis prolongamentos delicados em direção ao tecido conjuntivo (Figura 5.4B). Nessa região, vasos sanguíneos congestionados ou exibindo microtrombos, em sua maioria capilares, foram observados. A lâmina própria exibiu redução da celularidade e alteração da disposição das fibras colágenas (Figura 5.4C), com áreas localizadas de degeneração da matriz extracelular. Capilares sanguíneos ocasionais distribuíam-se por todo o tecido conjuntivo. A MCA exibiu intensa celularidade na região adjacente ao tecido conjuntivo da gengiva, por vezes com áreas de necrose e degeneração colagênica. Áreas focais de infiltrado inflamatório mononuclear foram observadas, tanto na interface gengiva-MCA, quanto em regiões mais internas da lâmina própria da gengiva (Figura 5.4D).

Figura 5.3 – Cortes histológicos representativos da gengiva controle (A) e das gengivas após 1 dia de inserção na membrana corioalantóica (B a D) (Hematoxilina-eosina, aumento original de 100 e 400X). A: Fragmento de gengiva controle exibindo epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, revestindo lâmina própria constituída por tecido conjuntivo denso bem vascularizado. B: Fragmento da mesma gengiva mostrada em A, porém este foi mantido na membrana corioalantóica por 1 dia. Nota-se deterioração das camadas superficiais do epitélio, bem como aumento de celularidade na lâmina própria e vasos sanguíneos congestionados. C: Outro espécime exibindo perda da arquitetura epitelial e fenda intraepitelial (setas). D: Detalhe da lâmina própria, em que se notam vasos sanguíneos congestionados e infiltrado inflamatório mononuclear, composto por células plasmocitárias e células semelhantes a macrófagos (seta)

Figura 5.4 – Cortes histológicos representativos da gengiva após 3 dias de inserção na membrana corioalantóica (Hematoxilina-eosina, aumento original de 100 e 400X). A: Perda da arquitetura original do epitélio, com necrose das camadas intermediárias e superficiais (n) e manutenção das camadas suprabasal e basal. B: Detalhe da camada basal de epitélio demonstrando células viáveis e aderidas à lâmina própria por intermédio de prolongamentos delicados. C: Lâmina própria exibindo redução da celularidade e alteração da disposição das fibras colágenas. D: Interface entre o tecido conjuntivo da gengiva (g) e a membrana corioalantóica (MCA), a qual exibe intenso infiltrado inflamatório mononuclear e áreas basofílicas compatíveis com necrose

5 dias

A gengiva nesse período exibiu total dissociação das camadas epiteliais suprabasais e superficiais em relação à camada basal (Figura 5.5A), a qual manteve as características detectadas em três dias, ou seja, originou um epitélio pavimentoso, com duas a três camadas de células, não-queratinizado, contínuo e aderido à membrana basal (Figura 5.5B). No tecido conjuntivo, celularidade reduzida foi mantida, tal qual observada no período de 3 dias; nichos de brotos capilares, por vezes com luz visível (a origem capilar foi confirmada por intermédio da expressão

de CD34, adiante descrita), também foram observados (Figura 5.5C). A MCA ainda exibiu intensa celularidade, composta principalmente por infiltrado inflamatório mononuclear difuso. Este, diferentemente do período de 3 dias, ficou restrito à interface gengiva-MCA, com ausência completa de células inflamatórias no interior da lâmina própria (Figura 5.5D). Degeneração hidrópica das células do epitélio da MCA estava presente (Figura 5.5D), bem como áreas focais de necrose.

Figura 5.5 – Cortes histológicos representativos da gengiva após 5 dias de inserção na membrana corioalantóica (Hematoxilina-eosina, aumento original de 100 e 400X). A: Epitélio exibindo completa dissociação com a lâmina própria, porém com manutenção de camada epitelial pavimentosa mais delgada aderida ao tecido conjuntivo. B: Detalhe dessa camada epitelial, em que se notam células viáveis, bem justapostas e aderidas. C: Lâmina própria exibindo redução da celularidade e vasos sanguíneos congestionados. D: Interface entre o tecido conjuntivo da gengiva (g) e a membrana corioalantóica (MCA), em que se nota manutenção do infiltrado inflamatório descrito em 3 dias, porém agora restrito à MCA. O epitélio desta exibe degeneração hidrópica (em destaque)

5.4 Análise de TUNEL

Controle

No epitélio das gengivas controles, somente as camadas superficiais exibiram células TUNEL positivas; as células epiteliais das camadas espinhosa, suprabasal e basal eram TUNEL negativas. No tecido conjuntivo, também foram raras as células TUNEL positivas (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Exemplo de campo histológico evidenciando a marcação de TUNEL nas gengivas controles. Notam-se poucas células epiteliais TUNEL positivas, localizadas principalmente na camada superficial do epitélio. No tecido conjuntivo, também são raras as células TUNEL positivas. Verde – FITC, marcação positiva de TUNEL. Azul – DAPI, marcação de núcleo celular. Aumento original de 100X

1 dia

Após 24h de permanência na MCA, a maioria das células epiteliais é TUNEL negativa; porém células ocasionais na camada basal exibem positividade para TUNEL, sugerindo fragmentação do DNA e, provavelmente apoptose, dessas células. No espécime que exibiu fenda na interface epitélio-tecido conjuntivo, descrito anteriormente, localizam-se células TUNEL positivas em meio a células TUNEL negativas. Na região do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio, também são frequentes células com positividade para TUNEL. A Figura 5.7 ilustra alguns campos histológicos referentes a esse período.

Figura 5.7 - Exemplos de campos histológicos evidenciando a marcação de TUNEL nos espécimes de 1 dia. A: Epitélio (e) exibindo estratificação normal, com a maioria das células TUNEL negativo. B: Detalhe da área do quadrado de A, em que se notam células TUNEL negativas (seta) adjacentes a células epiteliais TUNEL positivas (cabeça de seta). C: Outro espécime de 1 dias, em que se nota região de fenda infraepitelial (área do quadrado), com várias células epiteliais basais TUNEL positivas (cabeça de seta). D: Detalhe da área do quadrado, referente à região da fenda na interface epitélio-tecido conjuntivo (f), em que se nota mistura de células TUNEL positivas e TUNEL negativas. Verde – FITC, marcação positiva de TUNEL. Azul – DAPI, marcação de núcleo celular. Aumento original de 100 e 400X

3 dias

A gengiva nesse período exibe ainda células TUNEL positivas nas camadas mais superficiais do epitélio e TUNEL negativas na camada basal, principalmente daquelas ainda aderidas à lâmina basal. Redução da celularidade no tecido conjuntivo é evidente, com células TUNEL negativas mescladas a células TUNEL positivas. A figura 5.8 ilustra alguns campos histológicos referentes a esse período.

Figura 5.8 - Exemplos de campos histológicos evidenciando a marcação de TUNEL nos espécimes de 3 dias. **A:** Fragmento de gengiva exibindo epitélio (e) com perda da arquitetura original e dissociação da lâmina própria (f), exibindo células TUNEL negativas nas camadas basal e suprabasal (seta) e TUNEL positiva nas camadas mais superficiais. No tecido conjuntivo (c), nota-se redução da celularidade, com células TUNEL negativas mescladas com células TUNEL positivas. **B:** Detalhe da região destacada em A, em que se notam células epiteliais superficiais TUNEL positivas (seta) e células mais basais TUNEL negativas. Verde – FITC, marcação positiva de TUNEL. Azul – DAPI, marcação de núcleo celular. Aumento original de 100 e 400X

5 dias

Após 5 dias da inoculação, o epitélio como um todo exibe positividade para TUNEL, confirmando a inviabilidade de todas as camadas epiteliais. Contudo, em sítios específicos da camada do epitélio, notam-se algumas células TUNEL negativas, formando nichos isolados, principalmente nas extremidades dos prolongamentos epiteliais. Nesse período, o epitélio contínuo e aderido à lâmina própria, composto por duas a três camadas, descrito anteriormente, exibe completa viabilidade, atestada pela ausência de células TUNEL positivas. O tecido conjuntivo exibe redução importante da celularidade e inúmeras células TUNEL positivas na região do tecido conjuntivo em íntimo contato com a MCA. A Figura 5.9 ilustra esses aspectos do período de 5 dias.

Assim, como resultados gerais do ensaio de TUNEL, nota-se que houve gradativamente a fragmentação do DNA das células epiteliais e das células do tecido conjuntivo, a qual se iniciou já no período de 1 dia. Em 5 dias, o processo de apoptose das células culminou com a perda da estratificação epitelial e a manutenção de um epitélio com poucas camadas, porém viável. O tecido conjuntivo foi perdendo gradativamente a celularidade, principalmente na região próxima à membrana corioalantóica.

Figura 5.9 – Exemplos de campos histológicos evidenciando a marcação de TUNEL nos espécimes de 5 dias. **A:** Epitélio (e) exibindo grande quantidade de células TUNEL positivas, e dissociação da lâmina própria em áreas focais. O tecido conjuntivo (c) exibe grande quantidade de células, a maioria TUNEL negativas. **B:** Detalhe de A, em que se notam células epiteliais basais TUNEL negativas (setas) e células epiteliais TUNEL positivas (cabeça de seta), localizadas principalmente nas camadas suprabasal e intermediária. **C:** Epitélio (e) com redução da estratificação inicial, exibindo células TUNEL negativas. **D:** Relação do tecido conjuntivo (c) da gengiva com a membrana corioalantóica (m), em que se nota redução de celularidade no conjuntivo em contraste com alta densidade de células TUNEL negativo na membrana corioalantóica. Verde – FITC, marcação positiva de TUNEL. Azul – DAPI, marcação de núcleo celular. Aumento original de 100 e 400X

5.5 Análise imuno-histoquímica

5.5.1 Queratina 10

Controle

A expressão da K10 nas gengivas controles foi variável, exibindo marcação discreta nas camadas suprabasais e superficiais (Figura 5.10A), até marcações mais intensas, em regiões específicas das camadas superficiais epiteliais (Figura 5.10B). Em nenhum espécime, foi detectada marcação na camada basal.

Figura 5.10 – Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para queratina 10 em gengiva controle (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X). A: Exemplo de espécime exibindo positividade de intensidade moderada nas camadas intermediárias e superficiais do epitélio de revestimento. B: Outro padrão de marcação, com intensa positividade nas camadas mais superficiais

1 dia

Nesse período, a expressão de K10 não seguiu um padrão definido, com espécimes exibindo marcações discretas e outros, de moderada a intensa, por vezes estando presente em células ocasionais da camada basal (Figura 5.11A e 5.11B). Nas camadas superficiais, toda a extensão do citoplasma exibia marcação; já em algumas células das camadas basal e suprabasal, a marcação era mais na periferia do citoplasma, principalmente nas células exibindo degeneração hidrópica (Figura 5.11C).

Figura 5.11 – Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para queratina 10 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 1 dia (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Exemplo de espécime exibindo positividade de intensidade moderada nas camadas intermediárias e superficiais do epitélio de revestimento. B: Outro padrão de marcação, com intensa positividade nas camadas mais superficiais. C: Detalhe da região destacada em B, em que se evidencia marcação homogênea no citoplasma das células epiteliais intermediárias, e marcação mais na periferia do citoplasma nas células da camada basal, que exibem degeneração hidrópica

3 dias

Observou-se marcação negativa em praticamente todas as camadas do epitélio, que exibiam um padrão necrótico, incluindo as superficiais (Figura 5.12A). Algumas células viáveis da camada basal do epitélio exibiam marcação moderada para K10 (Figura 5.12B). Essa marcação esteve presente no citoplasma sem um padrão homogêneo, originando agregados citoplasmáticos (Figura 5.12B).

Figura 5.12 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para queratina 10 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 3 dias (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Camadas epiteliais intermediárias e superficiais exibindo um padrão necrótico (n) e negativas para K10. Somente algumas células da camada basal (seta) eram positivas para esse marcador. B: Detalhe da área destacada em A, exibindo células basais positivas para K10, porém sem uma marcação homogênea no citoplasma

5 dias

Contrariamente à tendência dos períodos anteriores de se observar uma redução paulatina da K10, nesse período dois dos três espécimes exibiram marcação intensa para essa proteína, inclusive nas camadas epiteliais exibindo um padrão necrótico (Figura 5.13A). Uma amostra exibiu marcação somente nas camadas superficiais, ainda assim bem intensa (Figura 5.13B). O epitélio de poucas camadas, aderido à lâmina própria e com vitalidade confirmada anteriormente pelo teste de TUNEL, foi negativo para K10 em todas as amostras (Figura 5.13C).

Figura 5.13 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para queratina 10 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 5 dias (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Intensa positividade para K10 em todas as camadas do epitélio, o qual exibiu um padrão necrótico; nesse campo, notam-se regiões de ausência de adesão epitelial à lâmina própria, sem evidência de epitélio aderido ao tecido conjuntivo. B: Outro aspecto da marcação da K10, presente em somente um espécime, em que se nota intensa positividade em regiões focais das camadas mais superficiais do epitélio. C: Detalhe da região destacada em B, evidenciando negatividade para K10 no epitélio delgado aderido à lâmina própria (seta)

Foi realizada quantificação objetiva da marcação do DAB nos testes imuno-histoquímicos para K10. A Figura 5.14 ilustra as médias das porcentagens dessas marcações. Os espécimes do período de 5 dias exibiram porcentagem de marcação significativamente maior do que aqueles dos demais períodos ($p < 0.01$) e do controle ($p < 0.01$). O período de 1 dia e, mais nitidamente, o período de 3 dias exibiram menor porcentagem de marcação para K10 em relação ao controle, mas essas diferenças não foram significativas.

Figura 5.14 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de marcação do DAB no teste imuno-histoquímico para queratina 10 em cada período experimental. ** $p < 0.01$ em comparação ao período de 5 dias (Teste de Tukey)

5.5.2 Queratina 14

Controle

A expressão da K14 nas gengivas controles foi intensa nas camadas basal e suprabasal do epitélio (figura 5.15A), exibindo um padrão citoplasmático homogêneo. Marcação discreta esteve presente nas camadas intermediárias epiteliais. Um espécime exibiu marcação da K14 em todas as camadas epiteliais (figura 5.15B).

Figura 5.15 - Corte histológico representativo da reação imuno-histoquímica para queratina 14 em gengiva controle (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X). Nota-se intensa positividade nas camadas basal e suprabasal do epitélio (A) ou intensa em todas as camadas epiteliais (B)

1 dia

A expressão de K14 nesse período foi intensa e restrita à camada basal do epitélio (Figura 5.16A). Contudo, o padrão de marcação intracelular foi diferente, com disposição mais na periferia do citoplasma, principalmente nas células exibindo degeneração vacuolar (Figura 5.17B). Esse padrão sugeriu uma modificação da distribuição dos filamentos no citoesqueleto.

Figura 5.16 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para queratina 14 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 1 dia (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Marcação intensa presente nas camadas basal e suprabasal do epitélio e negativa nas demais camadas. B: Detalhe da área destacada em A, em que se nota que marcação citoplasmática não-homogênea nas células basais, com tendência a se localizar na periferia do citoplasma em células exibindo degeneração vacuolar e núcleos picnóticos (setas)

3 dias

A K14 foi expressa de maneira contínua e uniforme nas células da camada basal, e em grupos isolados de células das camadas mais superiores (figura 5.17A). Diferentemente da K10 nesse período, a K14 exibiu expressão intensa e homogênea no citoplasma (figura 5.17B), principalmente no epitélio aderido à lâmina própria.

Figura 5.17 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para queratina 14 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 3 dias (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Marcação intensa na camada basal, e em grupos isolados de células nas camadas intermediárias. B: Detalhe da região destacada em A, em que se nota intensa positividade citoplasmática, principalmente nas células do epitélio aderido à lâmina própria

5 dias

O padrão observado em 5 dias foi semelhante àquele em 3 dias. A K14 exibiu marcação intensa em toda a extensão do epitélio (figura 5.18A). Esta foi positiva em todos os espécimes, inclusive no epitélio contínuo aderido à lâmina própria, mesmo nas situações em que as demais camadas estavam completamente ausentes (figura 5.18B).

Figura 5.18 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para queratina 14 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 5 dias (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Marcação intensa em todas as camadas do epitélio. B: Detalhe de epitélio delgado aderido à lâmina própria, observado em outro espécime, exibindo intensa marcação em todas as células

Na quantificação da marcação do DAB no teste imuno-histoquímico para K14, o período experimental de 5 dias exibiu porcentagem de marcação significativamente maior em relação ao grupo Controle ($p < 0.05$). Não houve diferenças significativas analisando-se os demais períodos experimentais (Figura 5.19).

Figura 5.19 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de marcação do DAB no teste imuno-histoquímico para queratina 14 em cada período experimental. * $p < 0.05$ em relação ao Grupo 5 dias (Teste de Tukey)

5.5.3 CD34

Controle

Nas gengivas controles, vasos positivos para CD34 foram observados principalmente na região do tecido conjuntivo papilar, adjacente ao epitélio de revestimento. Os vasos eram, em geral, de pequeno calibre, compondo rede vascular densa (Figura 5.20).

Figura 5.20 - Corte histológico representativo da reação imuno-histoquímica para CD34 em gengiva controle (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X). Pequenos vasos CD34 positivos foram observados em região do conjuntivo próxima ao epitélio, compondo rede vascular densa. Na profundidade da lâmina própria, vasos de parede fina e luz mais ampla estavam presentes

1 dia

Após um dia de contato com a MCA, nota-se profusão de vasos positivos para CD34, com luz de diâmetros variados, por vezes amplas (Figura 5.21A); muitos vasos positivos exibem parede fina e irregular, sendo compatíveis com veias delicadas (Figura 5.21B). Em todos os espécimes, vasos exibindo marginação leucocitária foram evidentes, sugerindo resposta vasoativa de caráter inflamatório. Várias células vizinhas aos vasos CD34 positivos não exibiram positividade para esse marcador (Figura 5.21B).

Figura 5.21 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para CD34 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 1 dia (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Profusão de vasos CD34 positivos por toda lâmina própria, com calibres variados. B: Detalhe da área destacada em A, em que se notam vasos de paredes mais delgadas e delicadas e vasos de paredes mais espessas, ambos positivos para CD34. As células adjacentes a esses vasos eram CD34 negativas

3 dias

Observa-se mudança drástica em relação ao aspecto anterior. Após 3 dias de contato com a MCA, as gengivas exibiram redução da densidade vascular. São visíveis agora vasos CD34 positivos de calibre bem reduzido, por vezes sem luz visível, próximos ao epitélio, incluindo aquele aderido à membrana basal e com número reduzido de camadas (Figura 5.22A). Em áreas focais da profundidade da lâmina própria, próxima à região de interface com a MCA, observam-se concentrações focais de vasos CD34 positivos de maior calibre (Figura 5.22B).

Figura 5.22 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para CD34 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 3 dias (Estreptavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). A: Redução da densidade de vasos CD34 positivos em relação ao período de 1 dia, com a presença de vasos de calibre menor. B: Detalhe de região da gengiva na interface com a membrana corioalantóica, em que se notam vasos calibrosos, com positividade para CD34 na túnica íntima

5 dias

São evidentes pequenos vasos CD34 positivos bem próximos ao epitélio, com densidade um pouco maior daquela observada em 3 dias (Figura 5.23A). Notam-se vasos positivos para esse marcador também na região da gengiva próxima à interface com a MCA, agora um pouco mais calibrosos do que aqueles encontrados mais na superfície da mucosa gengival (Figura 5.23B).

Figura 5.23 - Cortes histológicos representativos da reação imuno-histoquímica para CD34 nas gengivas mantidas na membrana corioalantóica pelo período de 5 dias (Estreptavidina-biotina, aumento original de 400X). A: Região do epitélio aderido à lâmina própria, a qual exibe grande quantidade de brotos capilares CD34 positivos, próximos ao epitélio. B: Vasos de calibre maior CD34 positivos localizados na lâmina própria adjacente à membrana corioalantóica

Na quantificação manual da densidade de vasos CD34 positivos (Figura 5.24), os períodos de 1 dia ($p < 0.05$) e de 5 dias ($p < 0.05$) exibiram densidade significativamente maior em relação ao Controle. O período de 3 dias não exibiu diferenças significativas em relação a nenhum outro grupo, apesar de exibir densidade vascular menor em relação aos demais períodos analisados. Já na quantificação da porcentagem de marcação do DAB (Figura 5.25), observa-se que o período de 1 dia exibiu porcentagem significativamente maior em relação ao Controle e aos períodos de 3 e 5 dias (para todas as situações, $p < 0.05$). Esse último período exibiu porcentagem maior do que o Controle ($p < 0.05$).

Figura 5.24 – Box-plot do número de vasos por campo quantificado em cada grupo experimental. Traço horizontal – mediana; $\diamond$ - média; limite inferior do box – primeiro quartil; limite superior do box – terceiro quartil; whiskers – valores mínimo e máximo; x – outliers. * $p < 0.05$ em relação ao Controle (Teste de Dunn)

Figura 5.25 – Box-plot da área de marcação do CD34 em cada grupo experimental. Traço horizontal – mediana; $\diamond$ - média; limite inferior do box – primeiro quartil; limite superior do box – terceiro quartil; whiskers – valores mínimo e máximo; x – outliers. * $p < 0.05$ (Teste de Dunn)

Interpretando a análise descritiva com a quantificação objetiva da imuno-histoquímica, pode-se inferir que, no período de 5 dias, houve a formação de novos vasos sanguíneos, de calibre reduzido, porém compondo alta densidade vascular, o que explica o maior número de luzes vasculares/campo e a área de DAB ligeiramente aumentada em relação ao Controle nesse período. Já no período de 1 dia, interpretamos que houve vasodilatação dos vasos pré-existentes, ampliando as luzes vasculares e a área da parede vascular, o que acarretou em maior área de DAB, porém sem aumentar o número das luzes vasculares por campo. No período de 3 dias, provavelmente houve a substituição da rede vascular pré-existente por uma nova rede vascular, explicando as reduções de número de vasos/campo, bem como de área de DAB.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, objetivamos avaliar as alterações morfológicas microscópicas presentes na mucosa gengival enxertada na MCA. Pudemos verificar que houve um processo de adaptação das estruturas da gengiva ao microambiente da MCA, tanto no epitélio quanto na lâmina própria, que culminaram com a perda da estratificação epitelial e revascularização do tecido conjuntivo. O fragmento, contudo, manteve-se viável por 5 dias, atestado pela análise de TUNEL. Esse processo de adaptação refletiu nas modificações das expressões das K10 e K14, bem como do CD34, conforme discutido a seguir.

Fizemos ampla busca bibliográfica com relação aos resultados da enxertia de tecidos na MCA, e não encontramos nenhum estudo que tivesse analisado as modificações morfológicas da mucosa oral nesse ambiente. Em função disso, as reflexões a seguir foram construídas com base principalmente nos resultados descritos em pele, cuja estrutura é mais parecida com a da mucosa oral.

Nossa hipótese inicial era de que seria possível manter viável a mucosa gengival, principalmente devido às características funcionais da MCA. Essa membrana possui alta especialidade na condução de gases, principalmente de CO₂, garantindo as trocas gasosas para o embrião (Ribatti, 2016; Ferner; Mess, 2011). Como a mucosa oral possui coeficiente de permeabilidade muito similar à da MCA (Tay et al., 2011), acreditamos que seriam bem facilitadas as trocas gasosas e iônicas entre os dois compartimentos, garantindo a perfusão adequada da mucosa gengival. A rica rede vascular presente na MCA poderia manter os níveis de oxigenação e nutrição adequados para a mucosa oral.

Contudo, verificamos que houve perda da estratificação epitelial, com apoptose e necrose das células das camadas intermediárias e superficiais, mas mantendo viável a camada basal. Também verificamos que houve redução da rede vascular no período de 3 dias, o que provavelmente levou a estados de isquemia na mucosa oral nesse período. Assim, muito possivelmente as estruturas mais superficiais do epitélio não receberam oxigenação e nutrição suficientes, levando à deterioração da estratificação epitelial.

Com base na literatura analisada, parece ser consenso de que, na maioria das situações de inoculação de fragmentos teciduais, a MCA incorpora esses fragmentos

e restitui a vascularização. Esses aspectos foram descritos para osso humano (Moreno-Jiménez et al., 2016), rim de rato (Sariola et al., 1983) e pele (Goodpasture et al., 1938; Ausprunk et al., 1975; Kunzi-Rapp et al., 1999). A restituição vascular pode ser por anastomose da rede vascular do enxerto com a da MCA, ou pela angiogênese provocada diretamente por vasos derivados da MCA (Ausprunk et al., 1975). Provavelmente em nosso estudo, houve substituição da rede vascular da gengiva por outra originária da MCA, já que drástica redução de vasos CD34 positivos foi observada no período de 3 dias, com aumento posterior no período de 5 dias. Assim, houve revascularização das gengivas, suficiente para manter somente a camada basal do epitélio.

Não podemos deixar de considerar que a MCA também é uma estrutura especializada na condução do cálcio da casca para a rede vascular do embrião, mantendo o processo de calcificação deste. O cálcio é necessário para a indução da diferenciação e estratificação de queratinócitos cultivados *in vitro* (Seo et al., 2016), e o ambiente da MCA, rico em cálcio, poderia constituir uma vantagem para a estrutura epitelial da mucosa oral. Contudo, houve perda da estratificação epitelial provavelmente devido ao estado de isquemia e baixa oxigenação, mas também por alterações nos níveis de cálcio induzidas na MCA. A eficácia da condução de cálcio pela MCA depende do íntimo contato dessa superfície com a membrana da casca, interface interrompida no modelo adotado, pois provocamos o descolamento da MCA da casca para introdução dos fragmentos teciduais. Assim, provavelmente, no microambiente do sítio de inoculação da gengiva, o fluxo de cálcio foi interrompido, o que pode ter acarretado a perda dessa suposta vantagem do modelo da MCA. Níveis baixos de cálcio induzem proliferação de queratinócitos, mas não sua diferenciação e estratificação (Seo et al., 2016), e as células da camada basal do epitélio oral não são tão ricas em cálcio como são as células das camadas intermediárias e superficiais (Ashrafi et al., 1989). Provavelmente, a ruptura do equilíbrio na condução do cálcio da MCA gerou um microambiente com teores de íons inadequados, fato que, aliado a momentos de isquemia, provocou a perda da estratificação epitelial. Contudo, esse microambiente foi suficiente para manter viável a camada basal, contribuindo para sua proliferação e pouca diferenciação.

Detectamos diferenças marcantes entre os resultados de enxertia de fragmentos de pele humana, descritos na literatura, e os nossos com fragmentos de gengiva. Nos quatro trabalhos publicados na literatura, os fragmentos de pele mantiveram suas

características microscópicas intactas, sendo totalmente incorporados à MCA, provocando baixa ou nenhuma resposta imunológica de rejeição aos enxertos, e mantendo a arquitetura epitelial (Goodpasture et al., 1938; Kunzi-Rapp et al., 1999; Slodownik et al., 2009; Carre et al., 2012). Acreditamos que vários aspectos podem explicar essa diferença, dentre eles a espessura/tamanho dos espécimes enxertados, a origem dos mesmos e a ausência de saliva. Nos estudos com a pele, a espessura da mesma é bem reduzida, por vezes com descrição da retirada de hipoderme e de parte da derme, antes da inoculação na MCA (Goodpasture et al., 1938). Não fizemos um tratamento prévio das gengivas, ou seja, mantivemos a totalidade do tecido; além disso, caracteristicamente a gengiva da região do trígono retromolar possui epitélio e lâmina própria muito espessos; as dimensões e o grau de queratinização dos fragmentos de pele descritos na literatura foram muito menores se comparados aos nossos. Assim, fragmentos de gengiva mais delgados e com menor espessura epitelial (por exemplo, da mucosa do ventre da língua ou do assoalho bucal) provavelmente forneçam resultados diferentes dos apresentados no presente trabalho, com possibilidade de manutenção da arquitetura epitelial. Vale dizer que variamos os tamanhos das gengivas (entre 2 e 4mm), mas não vimos diferenças importantes nos resultados comparando fragmentos de diferentes tamanhos.

A questão da saliva foi outro aspecto ponderado no presente estudo. A saliva possui múltiplas funções de proteção, renovação e reparo da mucosa oral, em especial dos queratinócitos, pela íntima relação com essas células. A saliva contém inúmeros fatores de crescimento e citocinas (ex. EGF, VEGF, TGF- β , IL-1), peptídeos antimicrobianos (ex. histatinas) e participação direta na imunidade inata, que contribuem para a proliferação dos queratinócitos orais (Häkkinen et al., 2000). Acreditamos que a ausência desse fluido e a manutenção do epitélio em contato direto com o ar atmosférico podem ter prejudicado a manutenção da viabilidade das camadas mais superiores epiteliais. Provavelmente o aprimoramento do modelo, com a adição de saliva ao conjunto, resultem em resultados mais promissores no que tange à manutenção da arquitetura epitelial gengival.

A perda da estratificação epitelial foi acompanhada de modificações na expressão da K10. Essa queratina é expressa com grande diversidade nos epitélios queratinizados da mucosa oral, e indica diferenciação dos queratinócitos, acompanhada de estratificação (Bragulla; Homberger, 2009). Verificamos aumento da expressão da K10 no período de 5 dias de inoculação na MCA, e essa expressão foi

detectada principalmente nas camadas epiteliais desvitalizadas. A K10, em conjunto com a K9, são as duas únicas queratinas do tipo I que não possuem sítios de clivagem por caspases, sendo resistentes à proteólise provocada por essas enzimas (Oshima, 2002; Marceau et al., 2007); provavelmente devido a isso, detectamos uma intensa expressão dessa proteína em células com morfologia sugestiva de apoptose, a qual foi confirmada na análise de TUNEL. Os resultados do presente estudo também evidenciaram que a K10 foi expressa em células da camada basal do epitélio nos períodos de 1 e 3 dias, porém com padrão de marcação não-homogêneo, originando agregados intracitoplasmáticos, por vezes deslocados para a periferia do citoplasma. Há certa evidência de que a K10 restringe a proliferação dos queratinócitos e modula a apoptose (Marceau et al., 2007), e provavelmente a expressão dessa proteína nas células basais pode indicar uma tendência mais de morte celular, com desorganização do citoesqueleto, do que propriamente de proliferação dessa camada. Assim, a K10 nos epitélios das gengivas inoculadas sinalizou um processo de parada da proliferação celular e instalação de apoptose, principalmente nas camadas intermediárias e superficiais.

A K14 também foi expressa intensivamente, principalmente nos períodos de 3 e 5 dias, ocupando todas as camadas do epitélio, incluindo aquelas com evidente perda de vitalidade. A expressão de K14 sugere indiferenciação dos queratinócitos e adesão intercelular e à membrana basal, pela associação desse filamento a desmossomos e hemidesmossomos (Oshima, 2002; Marceau et al., 2007). Em situações de inflamação, a expressão da K14 nas camadas mais superiores pode indicar uma tentativa de renovação epitelial (Bonan et al., 2006). Contudo, em epitélios queratinizados, a K14 pode estar expressa em todas as camadas epiteliais (Rao et al., 2014; Murakami et al., 2014), como ocorreu com um de nossos controles, não tendo uma função de sinalizar propriamente o grau de diferenciação celular; ao mesmo tempo, a expressão dessa queratina varia bastante em situações de cultura organotípica *in vitro* de mucosa oral e pele, sendo frequente sua presença em todas as camadas epiteliais nessas condições (Seo et al., 2016). Acreditamos que a superexpressão da K14 nos espécimes do presente estudo siga mais a tendência de variações de expressão dessa proteína observadas em condições *in vitro*, cujas causas não são elucidadas na literatura, bem como pelo fato de que as células apoptóticas podem expressar os filamentos intermediários até que se complete a solubilização total dos mesmos (Oshima, 2002; Marceau et al., 2007).

Por outro lado, verificamos certa coerência na expressão da K10 e da K14 no epitélio remanescente, formado por até 3 camadas de células, que se manteve aderido à lâmina própria e cuja células foram TUNEL negativas. Nessa camada, a K10 não foi expressa, mas a K14 esteve presente de forma intensa e homogênea em todos os espécimes. A presença da K14 pode indicar que essas células exibem indiferenciação, e a ausência da K10 condiz com a pouca estratificação em camadas. Assim, nesse caso, a expressão da K14, em conjunto com a ausência de células TUNEL negativas, indica tratar-se de um epitélio composto por queratinócitos indiferenciados e vitais. No presente estudo, contudo, não foi possível nos certificarmos de que essas células epiteliais eram integralmente originárias da gengiva ou foram mescladas com as células epiteliais do epitélio coriônico da MCA. Outro estudo com fragmento de pele demonstrou perfeita fusão da epiderme com o ectoderma da MCA, demonstrando completa incorporação da pele à membrana (Goodpasture et al., 1938). A utilização de um marcador que identificasse exclusivamente as células humanas seria interessante para completar essa análise.

As limitações do presente estudo incluem, dentre outros aspectos, um número limitado de espécimes para cada período experimental, em decorrência da dificuldade de se conseguirem gengivas humanas, associada ao alto índice de ovos inviáveis para a condução da pesquisa. Também consideramos uma limitação o fato de termos analisado a densidade vascular de vasos CD34 positivos, porém não termos desenvolvido método para visualizar se a irrigação sanguínea estava eficiente na gengiva, bem como por não termos confirmado a origem dessa rede vascular.

Apesar das dificuldades de se estabelecer o método ideal para a inoculação e a manutenção de fragmentos de gengiva humana na MCA, consideramos que a utilização dessa membrana é um método eficiente para a análise das adaptações da mucosa oral em diferentes microambientes desprovidos de saliva, bem como para a visualização do processo de angiogênese e para o estudo da combinação de estruturas teciduais da mucosa oral com tecidos de espécies diferentes. As aplicações do método podem ser inúmeras, dentre as quais a utilização do modelo para o estudo do reparo da mucosa oral, da toxicidade de medicamentos e do processo de carcinogênese oral, incluindo o crescimento e a invasão intravascular de tumores da cavidade oral.

Em suma, pudemos inferir que a gengiva sofreu um processo de adaptação ao microambiente da MCA, reduzindo suas camadas epiteliais e reorganizando a rede

vascular. Mais estudos são necessários para se aprimorar o modelo, visando a manutenção da integridade da arquitetura tecidual da mucosa oral.

7. CONCLUSÕES

- A manutenção da gengiva na MCA por um período de 5 dias acarretou perda da estratificação epitelial, com apoptose das células das camadas intermediárias e superficiais, manutenção da camada basal e revascularização da lâmina própria.
- Esse processo constituiu uma adaptação da gengiva ao microambiente da MCA, que acarretou modificações na expressão das queratinas K10 e K14, bem como aumento da densidade de vasos CD34 positivos.
- O modelo de MCA de ovos fecundados de galinha é viável para a manutenção da gengiva humana, porém modificações morfológicas podem estar presentes.

REFERÊNCIAS¹

- Akins RE, Tuan RS. Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane. I. Isolation and characterization of chorionic ectoderm cells. *J Cell Sci.* 1993;105 (Pt 2):369-79.
- Ashrafi SH, Eisenmann DR, Zaki AE. Calcium levels in ruffle-ended and smooth-ended maturation ameloblasts. *Scanning Microsc.* 1989;3(2):629-36; discussion 37-8.
- Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Pathol.* 1975;79(3):597-618.
- Beck K, Singh J, Dar MA, Anzar M. Short-term culture of adult bovine ovarian tissues: chorioallantoic membrane (CAM) vs. traditional in vitro culture systems. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):21.
- Bonan PR, Kaminagakura E, Pires FR, Vargas PA, Almeida OP. Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(2):205-11.
- Bonan PRF, Kaminagakura E, Pires FR, Vargas PA, de Almeida OP. Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2006;101(2):205-11.
- Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat.* 2009;214(4):516-59.
- Carre AL, Larson BJ, Knowles JA, Kawai K, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal mouse skin heals scarlessly in a chick chorioallantoic membrane model system. *Ann Plast Surg.* 2012;69(1):85-90.
- Chen J, Cheng X, Merched-Sauvage M, Caulin C, Roop DR, Koch PJ. An unexpected role for keratin 10 end domains in susceptibility to skin cancer. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 24):5067-76.
- Comsa S, Ceausu RA, Popescu R, Cimpean AM, Raica M. The Human Mesenchymal Stem Cells and the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: The Key and the Lock in Revealing Vasculogenesis. *In Vivo.* 2017;31(6):1139-44.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

- Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(6):1119-30.
- Desai RS, Mamatha GS, Khatri MJ, Shetty SJ. Immunohistochemical expression of CD34 for characterization and quantification of mucosal vasculature and its probable role in malignant transformation of atrophic epithelium in oral submucous fibrosis. *Oral Oncol.* 2010;46(7):553-8.
- Ferician O, Cimpean AM, Avram S, Raica M. Endostatin Effects on Tumor Cells and Vascular Network of Human Renal Cell Carcinoma Implanted on Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *Anticancer Res.* 2015;35(12):6521-8.
- Ferner K, Mess A. Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;178(1):39-50.
- Gabrielli MG, 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: 10.1155/2010/94071
- Goodpasture EW, Douglas B, Anderson K. A Study of Human Skin Grafted Upon the Chorio-allantois of Chick Embryos. *J Exp Med.* 1938;68(6):891-904
- Gould J, Aramburo C, Capdevielle M, Scanes CG. Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sci.* 1995;56(8):587-94.
- Häkkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol* 2000. 2000;24:127-52.
- Hansson A, Bloor BK, Haig Y, Morgan PR, Ekstrand J, Grafström RC. Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. *Oral Oncol.* 2001;37(5):419-30.
- Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20(1):82-90.
- Hertig G, Zehnder M, Woloszyk A, Mitsiadis TA, Ivica A, Weber FE. Iodixanol as a Contrast Agent in a Fibrin Hydrogel for Endodontic Applications. *Frontiers in Physiology.* 2017;8.
- Holz JA, Boerwinkel DF, Meijer SL, Visser M, van Leeuwen TG, Bergman JJ, et al. Fluorescence characteristics of human Barrett tissue specimens grafted on chick chorioallantoic membrane. *Lasers Med Sci.* 2016;31(1):137-44

Huang W, Itayama M, Arai F, Furukawa KS, Ushida T, et al. An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on chicken chorioallantoic membrane. *Plos One*. 2017;12(4).

Huxlin KR, Sefton AJ, Furby J. Explantation of fetal murine retinae to the chorioallantoic membrane of the chicken embryo. *J Neurosci Methods*. 1992;41(1):53-64.

Ilyas K, Qureshi SW, Afzal S, Gul R, Yar M, Kaleem M, et al. Microwave-assisted synthesis and evaluation of type 1 collagen–apatite composites for dental tissue regeneration. *J Biomater Appl*. 2018;33(1):103-15.

Inoue M, Roan CH, Abe T, Buery RR, Nagatsuka H, Katase N, et al. Localization and characterization of lymphatic vessels in oral and cervical squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med*. 2011;2(5):793-7.

Isachenko V, Isachenko E, Mallmann P, Rahimi G. Increasing Follicular and Stromal Cell Proliferation in Cryopreserved Human Ovarian Tissue after Long-Term Precooling Prior to Freezing: In Vitro versus Chorioallantoic Membrane (CAM) Xenotransplantation. *Cell Transplantation*. 2013;22(11):2053-61.

Jedelska J, Strehlow B, Bakowsky U, Aigner A, Höbel S, Bette M, et al. The chorioallantoic membrane assay is a promising ex vivo model system for the study of vascular anomalies. *In Vivo*. 2013;27(6):701-5.

Jing Y, Zhou X, Han X, Jing J, von der Mark K, Wang J, et al. Chondrocytes Directly Transform into Bone Cells in Mandibular Condyle Growth. *J Dent Res*. 2015;94(12):1668-75.

Katoh M, Nakada K, Miyazaki JI. Liver regeneration on chicken chorioallantoic membrane. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(2):125-33.

Khan AS, Hussain AN, Sidra L, Sarfraz Z, Khalid H, Khan M, et al. Fabrication and in vivo evaluation of hydroxyapatite/carbon nanotube electrospun fibers for biomedical/dental application. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;80:387-96.

Koike T, Yasuo M, Shimane T, Kobayashi H, Nikaido T, Kurita H. Cultured epithelial grafting using human amniotic membrane: the potential for using human amniotic epithelial cells as a cultured oral epithelium sheet. *Arch Oral Biol*. 2011;56(10):1170-6.

Kunzi-Rapp K, Rück A, Kaufmann R. Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. *Arch Dermatol Res*. 1999;291(5):290-5.

Landini G. Color deconvolution [Internet]. Gabriel Landini; [2015] [citado 23 maio 2018]. Disponível em: <http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>

Liu M, Scanlon CS, Banerjee R, Russo N, Inglehart RC, Willis AL, et al. The Histone Methyltransferase EZH2 Mediates Tumor Progression on the Chick Chorioallantoic Membrane Assay, a Novel Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Transl Oncol.* 2013;6(3):273-81

Luomanen M, Tiitta O, Heikinheimo K, Heinaro I, Happonen RP. Effect of snuff on cytokeratin expression in oral vestibular sulcus epithelium. *J Oral Pathol Med.* 1997;26(3):110-6.

Manjunathan R, Ragunathan M. In ovo administration of human recombinant leptin shows dose dependent angiogenic effect on chicken chorioallantoic membrane. *Biol Res.* 2015;48:29.

Marceau N, Schutte B, Gilbert S, Loranger A, Henfling ME, Broers JL, et al. Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2265-81

Marley JJ, Robinson PA, Hume WJ. Expression of human cytokeratin 14 in normal, premalignant and malignant oral tissue following isolation by plaque differential hybridisation. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994;30B(5):305-11.

Miettinen M. Immunohistochemistry of soft tissue tumours - review with emphasis on 10 markers. *Histopathology.* 2014;64(1):101-18.

Mîndrilă I, Pârvănescu H, Pirici D, Niculescu M, Buteică SA, Taisescu O, et al. The chick chorioallantoic membrane: a model of short-term study of Dupuytren's disease. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(2):377-82.

Moreno-Jiménez I, Hulsart-Billstrom G, Lanham SA, Janeczek AA, Kontouli N, Kanczler JM, et al. The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering. *Scientific Reports.* 2016;6(1).

Moreno-Jiménez I, Lanham SA, Kanczler JM, Hulsart-Billstrom G, Evans ND, Oreffo ROC. Remodelling of human bone on the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken egg: De novo bone formation and resorption. *J Tissue Eng Reg Med.* 2018. Jun 12. Doi:10.1002/Hirm.2711 [Epub ahead print].

Murakami H, Okamura K, Aoki S, Sakagami R, Yamazaki J. Association of caspase-14 and filaggrin expression with keratinization of the oral mucosa and reconstruction culture rat models. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):703-10.

Murphy JB. Transplantability of Tissues to the Embryo of Foreign Species : Its Bearing on Questions of Tissue Specificity and Tumor Immunity. *J Exp Med.* 1913;17(4):482-93.

- Nnadi EN, Enweani IB, Ayanbimpe GM. Infection of Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) as a Model for the Pathogenesis of *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol J*. 2018;59(2):E25-E30.
- Okamura K, Tsuji Y, Shimoji T, Miyake K. Growth of human tumor xenografts on chorioallantoic membrane of chick embryo. *Hinyokika Kiyo*. 1995;41(3):163-70.
- Oshima RG. Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ*. 2002;9(5):486-92.
- Ota I, Masui T, Kurihara M, Yook JI, Mikami S, Kimura T, et al. Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells. *Oncol Rep*. 2016;35(1):261-6.
- Pan X, Hobbs RP, Coulombe PA. The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013;25(1):47-56.
- Qureshi AI, Nussey SS, Bano G, Musonda P, Whitehead SA, Mason HD. Testosterone selectively increases primary follicles in ovarian cortex grafted onto embryonic chick membranes: relevance to polycystic ovaries. *Reproduction*. 2008;136(2):187-94.
- Rao RS, Patil S, Ganavi BS. Oral cytokeratins in health and disease. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15(1):127-36.
- Ribatti D. The first evidence of the tumor-induced angiogenesis in vivo by using the chorioallantoic membrane assay dated 1913. *Leukemia*. 2004;18(8):1350-1
- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*. 2016;141:70-7.
- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res*. 2014;328(2):314-24
- Roman A, Páll E, Mihu CM, Petruțiu AS, Barbu-Tudoran L, Câmpian RS, et al. Tracing CD34+ Stromal Fibroblasts in Palatal Mucosa and Periodontal Granulation Tissue as a Possible Cell Reservoir for Periodontal Regeneration. *Microsc Microanal*. 2015;21(4):837-48.
- Rück A, Böhmeler A, Steiner R. PDT with TOOKAD® studied in the chorioallantoic membrane of fertilized eggs. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2(1):79-90.
- Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001;23(4):291-9.
- Salas PJ, Forteza R, Mashukova A. Multiple roles for keratin intermediate filaments in the regulation of epithelial barrier function and apico-basal polarity. *Tissue Barriers*. 2016;4(3):e1178368.

Sariola H, Ekblom P, Lehtonen E, Saxén L. Differentiation and vascularization of the metanephric kidney grafted on the chorioallantoic membrane. *Dev Biol*. 1983;96(2):427-35.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.

Seo A, Kitagawa N, Matsuura T, Sato H, Inai T. Formation of keratinocyte multilayers on filters under airlifted or submerged culture conditions in medium containing calcium, ascorbic acid, and keratinocyte growth factor. *Histochem Cell Biol*. 2016;146(5):585-97.

Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380-9.

Slodownik D, Grinberg I, Spira RM, Skornik Y, Goldstein RS. The human skin/chick chorioallantoic membrane model accurately predicts the potency of cosmetic allergens. *Exp Dermatol*. 2009;18(4):409-13.

Sys G, Van Bockstal M, Forsyth R, Balke M, Poffyn B, Uyttendaele D, et al. Tumor grafts derived from sarcoma patients retain tumor morphology, viability, and invasion potential and indicate disease outcomes in the chick chorioallantoic membrane model. *Cancer Lett*. 2012;326(1):69-78.

Sys GM, Lapeire L, Stevens N, Favoreel H, Forsyth R, Bracke M, et al. The in ovo CAM-assay as a xenograft model for sarcoma. *J Vis Exp*. 2013(77):e50522.

Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):120-32.

Tay SL, Heng PW, Chan LW. An investigation of the chick chorioallantoic membrane as an alternative model to various biological tissues for permeation studies. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(10):1283-9.

Tornqvist E, Annas A, Granath B, Jalkestén E, Cotgreave I, Oberg M. Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One*. 2014;9(7):e101638.

Uematsu E, Takino S, Okajima H, Tong B, Sugiyama T, Yamada T, et al. Use of in ovo chorioallantoic membrane engraftment to culture testes from neonatal mice. *Comp Med*. 2014;64(4):264-9.

Uloza V, Kuzminiene A, Salomskaite-Davalgienne S, Palubinskiene J, Balnyte I, Uloziene I, et al. Effect of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Tissue Implantation on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: Morphometric Measurements and Vascularity. *Biomed Res Int.* 2015;2015:629754.

Van Tubergen EA, Banerjee R, Liu M, Vander Broek R, Light E, Kuo S, et al. Inactivation or loss of TTP promotes invasion in head and neck cancer via transcript stabilization and secretion of MMP9, MMP2, and IL-6. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1169-79.

Vatanparast M, Khalili MA, Yari N, Omid M, Mohsenzadeh M. Evaluation of sheep ovarian tissue cryopreservation with slow freezing or vitrification after chick embryo chorioallantoic membrane transplantation. *Cryobiology.* 2018;81:178-84.

Vu BT, Shahin SA, 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(1):8524.

Walewska M, Dolka I, Małek A, Wojtalewicz A, Wojtkowska A, Żbikowski A, et al. Experimental tumor growth of canine osteosarcoma cell line on chick embryo chorioallantoic membrane (in vivo studies). *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2017;59(1).

Xuan M, Fang YR, Wato M, Hata S, Tanaka A. Immunohistochemical co-localization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(6):334-9.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fragmentos de gengiva humana cultivados em membrana corioalantóica: análise da viabilidade do método

Pesquisador: Luciana Corrêa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62191916.4.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.006.188

Apresentação do Projeto:

A substituição de modelos animais por métodos alternativos de experimentação tem sido uma tendência em termos mundiais, principalmente na área da saúde. A membrana cório-alantoica (MCA) presente nos ovos de galinhas fecundados é uma alternativa para os modelos animais, pois apresenta uma rede extensa de vasos sanguíneos, permitindo a nutrição do tecido enxertado.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto é verificar a viabilidade da manutenção da morfologia da gengiva humana no modelo de xenotransplante na MCA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os fragmentos de gengiva a serem utilizados nesta pesquisa são normalmente aqueles retirados e descartados após a conclusão da cirurgia, não havendo risco ao paciente doador.

Benefícios:

Este projeto não apresenta benefícios diretos ao doador do fragmento. Os benefícios residem principalmente no fato de se avaliar uma técnica com potencial grande de reduzir o uso de animais de laboratório em experimentos envolvendo tecidos do sistema estomatognático.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.006.188

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e visa validar uma nova metodologia e cultura de tecidos visando a redução de uso de animais de laboratório.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados folha de rosto, cartas de autorização da FO e da FUNDECTO-FFO e TCLE para as 2 instituições.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Abril de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

ANEXO B- Parecer do Comitê de Ética do Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP N° 007/2017 referente ao projeto intitulado: **"Fragmentos de gengiva humana cultivados em membrana corioalantóica: análise da viabilidade do método"** sob a responsabilidade de execução dos autores **Profa. Dra. Luciana Correa** e do aluno **Isaac Huang**, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar material de origem animal: Ovo de galinha fertilizado proveniente de Granja de produtos orgânicos.

São Paulo, 19 de abril de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Presidente da CEUA/FOUSP