

# **Avaliação da toxicidade de formulações comerciais de anestésicos tópicos odontológicos em modelo de membrana corioalantóica (CAM) de embrião de galinha por meio da análise das imagens por software.**

**Palavras-Chave: TOXICIDADE, MEMBRANA CORIOALANTÓICA, ANÁLISE.**

**Autores(as):**

**ALLANA DOMINGUES FERRACIOLI, FOP– UNICAMP**

**Profa. Dra. MICHELLE FRANZ MONTAN BRAGA LEITE (orientadora), FOP – UNICAMP**

**Me. ARTHUR ANTUNES COSTA BEZERRA (co-orientador), FOP- UNICAMP**

---

## **INTRODUÇÃO:**

A necessidade de substituição dos animais experimentais por espécies ou formas filogeneticamente mais baixas possíveis (incluindo modelos *in silico* ou culturas *in vitro*) com capacidade reduzida de sentir dor ou desconforto, ainda é um desafio em muitos campos da pesquisa científica (Nowak-Sliwinska et al, 2014). Outras exigências envolvem a redução, que significa reduzir ao mínimo necessário o número de animais usados como organismos modelo para fins científicos, e o refinamento, que significa protegê-los de sofrimentos desnecessários, garantindo tratamento e vida de acordo com os princípios de bem-estar (Preis et al, 2021).

O ensaio utilizando membrana corioalantóica (CAM) aviária cumpre e respeita todas essas diretrizes e parece ser um modelo conveniente para muitos campos de pesquisa (Kundeková et al, 2021). O HET-CAM é um modelo relativamente simples, rápido e de baixo custo, que permite a triagem de muitas amostras farmacológicas em um curto espaço de tempo. No entanto, de acordo com o protocolo nº 96 do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), conhecido como *Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM), o sistema de pontuação do teste por meio da análise visual de imagens fornece resultados qualitativos com baixa especificidade das amostras analisadas, tendo em vista a amplitude das faixas de pontuação e as suas respectivas classificações (Hagino et al, 1991). Portanto, há a necessidade de se obter artifícios para identificar e quantificar, de forma mais precisa, os efeitos tóxicos presentes nas imagens pós-tratamentos da CAM.

Durante décadas, os cientistas têm utilizado *softwares* para visualizar e interpretar dados obtidos de imagem. O ImageJ é uma plataforma de *software* de análise de imagem de código aberto que tem auxiliado pesquisadores com uma variedade de aplicativos de análise de imagem, impulsionados principalmente por comunidades de desenvolvedores e usuários engajados e colaborativos (Schindelin

et al, 2015). Este *software* possui diversas ferramentas, capazes de suprir diversas necessidades científicas, como mensurar tamanho e área de objetos de interesse presentes nas imagens (Schroeder et al, 2021). A partir desse contexto, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar se é possível desenvolver um método de análise quantitativa dos efeitos irritantes em modelo HET-CAM utilizando-se o ImageJ a fim de se complementar o protocolo nº 96 HET-CAM e como objetivo secundário, comparar a toxicidade de formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico por meio do método desenvolvido.

## **METODOLOGIA:**

### **1- Preparo dos ovos e confecção da janela para exposição da CAM**

Os ovos foram avaliados através do procedimento de ovoscopia (o ovo é colocado contra uma fonte de luz favorecendo a visualização do conteúdo interno) no 10º dia de fertilização e foram descartados aqueles que não apresentaram embrião. Os ovos que tinham embrião tiveram suas câmaras de ar demarcadas com um lápis grafite.

A membrana da casca do ovo, que recobre a membrana corioalantóica, foi umedecida com 1 mL de soro fisiológico e cuidadosamente removida com uma pinça cônica para que ocorresse a exposição da CAM. Após a remoção dessa membrana, realizou-se a inspeção visual da CAM e avaliação de sua integridade e a de seu sistema vascular. As seguintes formulações foram aplicadas: 1) Solução salina a 0,9% - controle negativo; 2) hidróxido de sódio a 0,1 mol/L – controle positivo; 3) Formulações comerciais de anestésicos tópicos odontológicos (Benzotop®, Labcaína®, Lidocaína® e o EMLA®).

As formulações foram aplicadas em 6 ovos, com experimentos realizados em triplicata, em três dias distintos, totalizando n=18 ovos/grupo. Após, os tratamentos (3 min), a CAM foi lavada com soro fisiológico e foi registrado em um estéreo microscópio (Optika, SZX-T) imagens da membrana submetidas aos tratamentos.

### **2- Análise das imagens a partir do ImageJ**

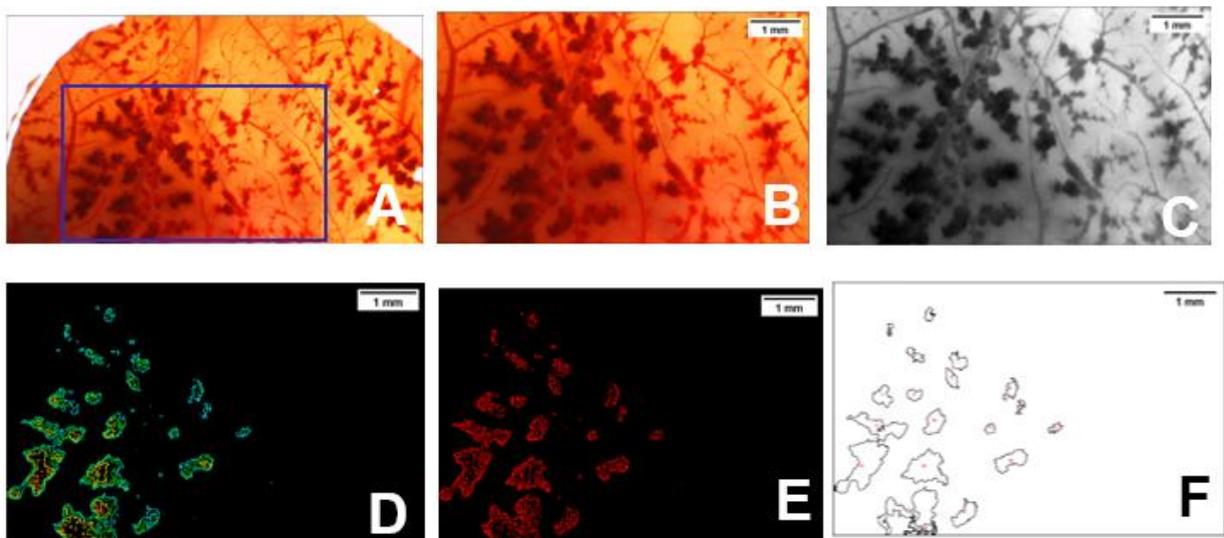
Primeiramente, foi realizado a padronização do tamanho da área a ser analisada nas imagens, priorizando-se aquelas nas quais as substâncias-teste foram aplicadas. Após breve análise de todas as imagens, optou-se por utilizar uma área de 800 x 500 pixels, correspondente a 10,13 x 6,33 mm, considerando-se a área de aplicação das formulações semissólidas sobre a CAM. Essa seleção pode ser visualizada na Figura 1A.

Para serem devidamente processadas pelo ImageJ, as imagens, ainda coloridas e em formato “RGB” (Figura 1B), foram convertidas para o formato “8 bits” e em escala de cinza, com brilho e contraste ajustados pelo modo “automático”, conforme ilustra a Figura 1C.

Em seguida, foi realizada a demarcação das áreas referentes aos coágulos extravasculares utilizando o *plug-in* IsoPhotContour2 do ImageJ, o qual processa a imagem em escala de cinza e cria uma nova imagem, chamada IsoPhot, com até 8 linhas de contorno na faixa de escala de cinza. As

linhas são desenhadas em diferentes cores previamente selecionadas, sinalizando os diferentes níveis de profundidade presentes na imagem, de acordo com os valores de *pixels* (Figura 1D).

Realizou-se, então, o ajuste automático do limiar de cor das imagens, o que resultou na modificação automática de todas as cores para o vermelho, conforme a Figura 1E. Em seguida, mensurou-se o número de partículas sinalizadas nas imagens e o valor de suas áreas, a partir de parâmetros pré-estabelecidos (Figura 1F), as quais correspondiam aos coágulos extravasculares identificados por meio da análise de níveis de profundidade. Preconizou-se por mensurar o número das partículas cuja área fosse igual ou superior a 0,01 mm<sup>2</sup>, a fim de favorecer a sinalização somente de coágulos com dimensões identificáveis a olho nu.



**Figura 1.** Análise do número e área dos coágulos extravasculares a partir do plug-in IsoPhotContour2 do programa ImageJ: (A) seleção da área menor a ser analisada, (B) imagem colorida e em formato “RGB”; (C) imagem convertida para o formato “8-bit”, em escala de cinza e brilho e contraste ajustados automaticamente; (D) imagem obtida a partir da execução do IsoPhotContour2, evidenciando diferentes níveis de profundidade da imagem, a partir de linhas coloridas; (E) imagem com limiar de cor ajustado automaticamente; e (F) imagem final, cuja partículas foram automaticamente enumeradas e suas áreas calculadas pelo ImageJ.

A fim de se confirmar a correta identificação das áreas de coágulos extravasculares das imagens realizada pelo programa utilizando o método padronizado e descrito neste estudo, as imagens da CAM submetidas aos tratamentos foram também quantificadas visualmente para comparação dos resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

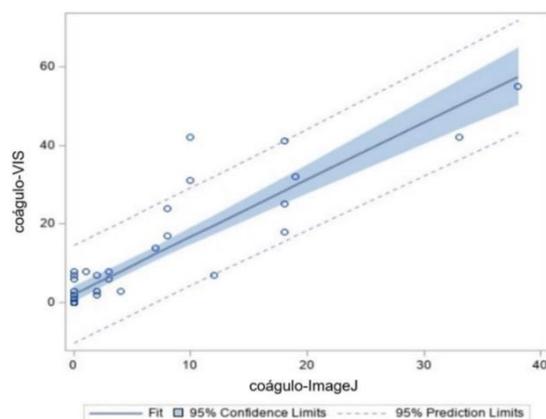
A Tabela 1 ilustra a quantidade de coágulos mensurados nas imagens da CAM submetidas aos diferentes tratamentos utilizando o *software* ImageJ. O controle positivo e a formulação comercial EMLA® apresentaram maior número de coágulos quando comparadas às demais formulações ( $p < 0,05$ ), conseqüentemente foram mais tóxicas que as demais formulações avaliadas. Não houve diferença significativa entre as demais formulações ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Média e erro padrão da média (SEM) da quantidade de coágulos mensurados nas imagens da CAM submetidas às diferentes formulações utilizando o programa ImageJ

Formulações-teste	Média	SEM
Controle positivo	18,37 <sup>a</sup>	14,21
EMLA®	7,40 <sup>a</sup>	3,55
Lidocaína®	0,63 <sup>b</sup>	0,48
Labcaína®	0,45 <sup>b</sup>	0,32
Benzotop®	0,39 <sup>b</sup>	0,28

Além disso, foi realizado uma análise de regressão linear simples e confeccionado um gráfico para avaliar a correlação da análise visual feita pelo operador e da análise do *software*. O valor de R<sup>2</sup> obtido indica que aproximadamente 81% da variação na quantidade de coágulos identificados visualmente pode ser explicada pela variável relacionada à análise utilizando o programa. Assim, uma relação moderadamente forte entre as duas variáveis foi encontrada indicando que a variável "coágulo-ImageJ" foi um bom preditor da quantidade de coágulos identificados visualmente, conforme ilustra a Figura 2.

**Figura 2.** Relação entre a quantidade de coágulos extravasculares nas imagens da CAM submetidas aos diferentes tratamentos, sinalizados por meio do programa ImageJ e da análise visual.



O efeito irritante analisado pelo programa no presente estudo foi a coagulação, tendo em vista que foi o único efeito distinguível e delimitável pelo programa, quando comparado aos demais efeitos (hemorragia e lise), o que permitiu sua quantificação por meio da metodologia proposta. Apesar do método proposto utilizando um *software* ter permitido quantificar efeitos irritantes dos anestésicos tópicos odontológicos comerciais avaliados, também apresentou algumas limitações.

Uma das dificuldades encontradas ao analisar as imagens da CAM do embrião aviário cultivado pelo método *in ovo*, utilizando o ImageJ, foi a sobreposição que existe entre os vasos sanguíneos da membrana com aqueles presentes na superfície da gema. Outro obstáculo foi a ocorrência de áreas de sombreamento da casca diretamente na CAM. Essas limitações foram superadas utilizando os valores dos pixels com o *plug-in* IsoPhotContour2, o qual permitiu destacar e quantificar apenas a coagulação extravascular ocorrida somente nos vasos presentes na CAM.

## CONCLUSÕES:

A avaliação das imagens da CAM submetidas aos tratamentos com as formulações anestésicas a partir de um *software* permitiu uma análise quantitativa dos coágulos extravasculares presentes na CAM após os tratamentos, favorecendo a distinção da toxicidade dentre os anestésicos tópicos. Assim, pode ser considerada uma ferramenta inovadora e complementar importante ao protocolo DB-ALM N°96. Utilizando o método desenvolvido, concluímos que o EMLA foi o anestésico tópico mais tóxico dentre as formulações anestésicas avaliadas.

---

## BIBLIOGRAFIA

ECVAM DB-ALM. Protocol No. 96: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). 2007.

Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, Tanaka M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: Modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. *Toxicol In Vitro*. 1991;5(4):301-4. doi: 10.1016/0887-2333(91)90006-y.

Kundeková B, Máčajová M, Meta M, Čavarga I, Bilčík B. Chorioallantoic Membrane Models of Various Avian Species: Differences and Applications. *Biology (Basel)*. 2021 Apr 6;10(4):301. doi: 10.3390/biology10040301.

Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*. 2014 Oct;17(4):779-804. doi: 10.1007/s10456-014-9440-7.

Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev*. 2015 JulAug;82(7-8):518-29. doi: 10.1002/mrd.22489.

Schroeder AB, Dobson ETA, Rueden CT, Tomancak P, Jug F, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: Open-source programa for image visualization, processing, and analysis. *Protein Sci*. 2021 Jan;30(1):234-249. doi: 10.1002/pro.3993.