

APLICABILIDADE DO MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) DO EMBRIÃO DE GALINHA EM ESTUDOS DE TOXICIDADE DE ANESTÉSICOS TÓPICOS ODONTOLÓGICOS

Palavras-Chave: TOXICIDADE, ANESTÉSICOS TÓPICOS, HET-CAM

Autores(as):

NICOLE MELEGA PIRES, FOP - UNICAMP

MALU BARBOSA DE OLIVEIRA, FOP - UNICAMP

MARIA EDUARDA RAMOS OLIVEIRA, FOP - UNICAMP

ARTHUR ANTUNES COSTA BEZERRA, FOP - UNICAMP

Prof^a. Dra. MICHELLE FRANZ MONTAN (orientadora), FOP - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A eficácia e a segurança de medicamentos precisam ser avaliadas antes destes serem comercializados (Chen et al., 2021), como é o caso das formulações farmacêuticas utilizadas para aliviar a dor causada pela erupção dental em lactentes. Dentre os testes preconizados para avaliar a segurança, estão os de toxicidade realizados em animais mamíferos devido às semelhanças bioquímicas e celulares entre esses seres e os humanos. Entretanto, muitos desses métodos podem causar dor e sofrimento aos animais envolvidos (Meyer, 2003).

Métodos alternativos ao uso de animais têm sido desenvolvidos com o intuito de substituir os testes que causam sofrimento animal. Eles utilizam animais vertebrados, invertebrados ou não animais que visam reduzir o número de mamíferos sacrificados e os custos operacionais, além de acelerar o cronograma de desenvolvimento de medicamentos (Freires et al., 2017). Dentre os métodos desenvolvidos e amplamente estudados, está o modelo da Membrana Corioalantóica (CAM) do embrião de galinha, conhecido como *Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM).

A CAM é um tecido altamente sensível que responde rapidamente a ações químicas ou biológicas de substâncias testadas e medicamentos aplicados em sua superfície (Saw et al., 2008). Este modelo é relativamente simples, rápido e de baixo custo, além de permitir a triagem de uma grande quantidade de amostras farmacológicas em um curto período (Ribatti, 2016).

Diante desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de formulações tópicas para alívio da erupção dental em lactentes a partir do modelo alternativo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha.

METODOLOGIA:

Os experimentos do presente estudo foram realizados seguindo-se o protocolo DB-ALM nº96 – “*Hen’s Egg Test on the Chorioallantoic Membrane*” (HET-CAM), do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM). Não foi necessária a aprovação do Comitê de Ética por este ser um método alternativo ao uso de animais reconhecido internacionalmente. Os ovos fecundados utilizados neste estudo foram fornecidos por produtores locais da cidade de Piracicaba – SP.

Ao chegarem no laboratório, os ovos foram pesados (50-60g), higienizados com álcool 70% e incubados a 37,5 °C e umidade relativa do ar de 55-65% por 10 dias. No décimo dia, foi realizada a ovoscopia (técnica de incidência de luz no ovo em ambiente escuro para visualização do seu conteúdo interno), seguida da abertura dos ovos e exposição da CAM, como mostra a Figura 1.

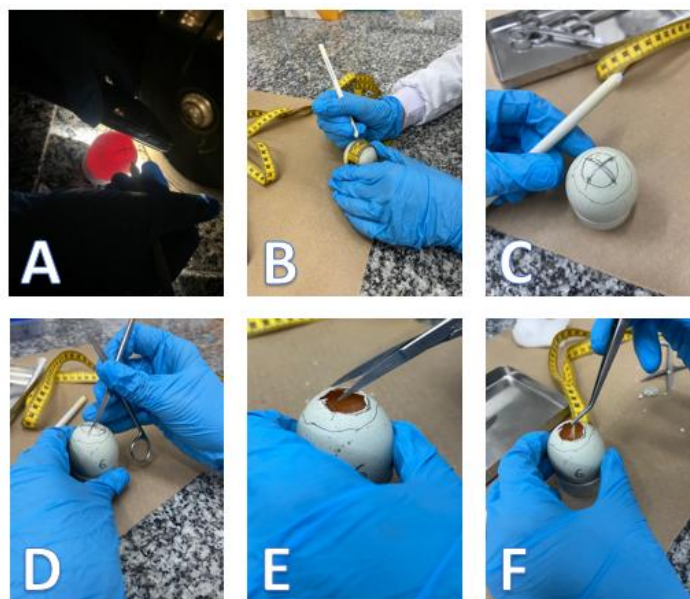


Figura 1. Etapas experimentais do modelo HET-CAM: **A** Ovoscopia; **B-C** Registro das dimensões da janela a ser confeccionada na casca do ovo; **D-E** Recorte da janela com uma tesoura curva; **F** Remoção da membrana da casca do ovo com o auxílio de uma pinça e exposição da CAM.

Avaliou-se a toxicidade das formulações comerciais Nenê Dent®, Gengi Baby® e Ad.Muc® Kids, bem como a dos controles do modelo (positivo – hidróxido de sódio; negativo – solução salina). Cada substância foi avaliada em um total de 24 ovos, divididos em 04 grupos de 06 ovos cada. Foram obtidas imagens da CAM antes e após 3min dos tratamentos, utilizando-se um estereomicroscópio (OPTIKA, modelo SZX-T), com aumento de 6,7x.

Conforme o protocolo utilizado, a análise das imagens obtidas foi feita a partir da atribuição de pontuações aos seguintes efeitos irritantes detectados visualmente: hemorragia, lise (desaparecimento) dos vasos sanguíneos e coagulação. Ao final, obteve-se uma pontuação final para grupo de 06 ovos e, a partir desta, uma classificação final para cada substância testada quanto à sua toxicidade. Nesse sentido, cada substância recebeu 04 classificações finais, como mostra a Tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após a análise das imagens obtidas, o controle negativo foi classificado como não irritante e o controle positivo como severamente irritante. Apesar de apresentarem pontuações finais distintas, como mostra a Tabela 1, todas as formulações comerciais foram classificadas como moderadamente irritantes.

Tabela 1. Classificação final das substâncias testadas em modelo HET-CAM.

Tratamento	Grupo (N-6)	Pontuação final	Classificação final
NenêDent®	1	9	Moderadamente irritante
	2	7	Moderadamente irritante
	3	7	Moderadamente irritante
	4	7	Moderadamente irritante
GengiBaby®	1	6	Moderadamente irritante
	2	6	Moderadamente irritante
	3	6	Moderadamente irritante
	4	6	Moderadamente irritante
Ad.Muc® Kids	1	6	Moderadamente irritante
	2	6	Moderadamente irritante
	3	6	Moderadamente irritante
	4	6	Moderadamente irritante
Controle negativo	1	0	Não irritante
	2	0	Não irritante
	3	0	Não irritante
	4	0	Não irritante
Controle positivo	1	17	Severamente irritante
	2	16	Severamente irritante
	3	16	Severamente irritante
	4	18	Severamente irritante

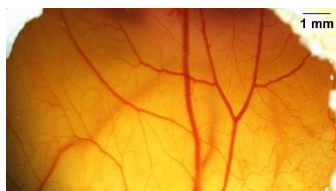
A Figura 2 mostra a CAM antes e após a aplicação das formulações comerciais. Apesar de apresentarem as mesmas classificações finais, é possível notar leves diferenças entre a gravidade dos efeitos irritantes causados pelos tratamentos na CAM, e isso pode ser justificado pela diferença na composição desses medicamentos. A formulação NenêDent® causou uma perceptível lise dos vasos sanguíneos de menor calibre, o que não ocorreu com os outros dois tratamentos. Torna-se necessária a realização de novos estudos para avaliar isoladamente a toxicidade das substâncias que compõem essas formulações, a fim de avaliar seus impactos quando administrados na CAM.

T0

Formulação aplicada

T3

**NenêDent®
(300mg)**



**GengiBaby®
(300mg)**



**Ad.Muc®Kids
(300mg)**



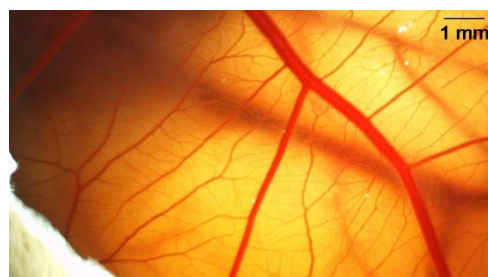
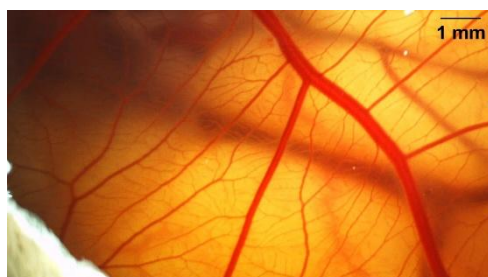
Figura 2. Imagens pré-tratamento (T0 = tempo 0), formulação aplicada sobre a CAM e pós-tratamento (T3 = tempo 3min) da CAM. Substâncias testadas: NenêDent®, GengiBaby® e Ad.Muc® Kids

A Figura 3 mostra algumas imagens pré-tratamento (T0) e pós-tratamentos (T3) obtidas durante os testes dos controles do modelo. É possível observar que há diferença entre os tratamentos realizados, quando considerada a gravidade dos efeitos irritantes encontrados. O controle negativo não causou efeito algum na CAM e o controle positivo causou hemorragia, lise dos vasos e coagulação acentuadas. Esses achados são semelhantes ao encontrados em outros estudos, mostrando que os ensaios foram realizados de maneira adequada (Ma et al., 2020; Rivero et al., 2021).

T0

T3

**Controle
Negativo
(0,3mL)**



**Controle
Positivo
(0,3mL)**

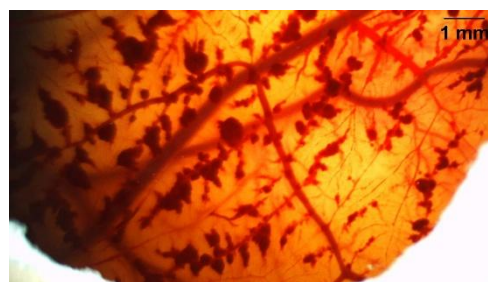


Figura 3. Imagens pré-tratamento (T0 = tempo 0) e pós-tratamento (T3 = tempo 3min) da CAM. Substâncias testadas: controle negativo (solução salina a 0,9%) e controle positivo (hidróxido de sódio a 0,1mol/L).

CONCLUSÕES:

Conclui-se que as formulações comerciais testadas apresentaram irritação moderada no modelo HET-CAM, requerendo cuidado ao serem utilizadas pois podem causar danos à mucosa oral dos lactentes, dependendo da forma e do tempo em que são aplicadas.

BIBLIOGRAFIA

- CHEN, Lei et al. **Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imaging-navigated biomedical research.** Cells, v. 10, n. 2, p. 463, 2021.
- ECVAM DB-ALM. **Protocol No. 96: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).** 2010.
- FREIRES, Irlan Almeida et al. **Alternative animal and non-animal models for drug discovery and development: bonus or burden?** Pharmaceutical research, v. 34, n. 4, p. 681-686, 2017.
- MA, Xue et al. **Skin irritation potential of cosmetic preservatives: An exposure-relevant study.** Journal of Cosmetic Dermatology, v. 20, n. 1, p. 195-203, 2021.
- MEYER, Otto. **Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches.** Toxicology letters, v. 140, p. 21-30, 2003.
- RIBATTI, Domenico. **The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): A multifaceted experimental model.** Mechanisms of development, v. 141, p. 70-77, 2016.
- RIVERO, Martín Nicolás et al. **Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition.** Food and Chemical Toxicology, v. 153, p. 112229, 2021.
- SAW, Constance et al. **Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review.** Drug development and industrial pharmacy, v. 34, n. 11, p. 1168-1177, 2008.