

INFLUÊNCIA DO PESO NA TOXICIDADE DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS EM MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) DO EMBRIÃO DE GALINHA

Palavras-Chave: TOXICIDADE, MEMBRANA CORIOALANTÓICA, HET-CAM

Autores:

ISABELA TRAVAGLINI RIZIGO, FOP – UNICAMP

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

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

INTRODUÇÃO:

O modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha, conhecido como *Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM), vem sendo utilizado para avaliar a toxicidade tanto de substâncias líquidas como de produtos e medicamentos semissólidos. Porém, sabe-se que a CAM é um tecido sensível a fatores como a variação de pH e tensão de oxigênio, além de ser uma membrana delicada com pouca espessura. Entretanto, não há na literatura informações se o peso da formulação analisada pode exercer efeito em sua toxicidade em modelo HET-CAM. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do peso na toxicidade de formulações semissólidas em modelo HET-CAM. Os experimentos ocorreram conforme metodologia descrita no protocolo DB-ALM N° 96 – HET-CAM, do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM). Foi avaliada a influência do peso das formulações na toxicidade utilizando o gel inerte Aristoflex® testado nas faixas de peso de 100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg. Foram obtidas fotografias pré e pós-tratamento da CAM, que foram avaliadas por meio da análise visual proposta pelo protocolo DB-ALM 96.

METODOLOGIA:

Os experimentos foram realizados conforme a metodologia descrita no protocolo DB-ALM N° 96 do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), intitulada "*Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM)" (ECVAM, 2010).

Os ovos utilizados no experimento foram inspecionados, higienizados, pesados e incubados em chocadeira sob temperatura interna de 37 °C e UR de 55-65%, até o décimo dia de desenvolvimento embrionário. No décimo dia foi realizada a ovoscopia dos ovos, a fim de verificar a presença do embrião no interior do ovo, como mostra a Figura 1.



Figura 1. Imagem da ovoscopia realizada no décimo dia de incubação dos ovos. Nesse caso foi possível verificar a presença do embrião e os limites da câmara de ar.

Também foi realizada a preparação das seringas com o gel inerte Aristoflex® para a posterior aplicação sobre a CAM. Nessa etapa foi feita a inserção do gel nas seringas e sua pesagem nas faixas de peso de 100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg. Em seguida, foi feita a confecção de uma janela de 1,8 cm de diâmetro na casca do ovo. Para isso, foi realizada a marcação da câmara de ar e das dimensões da janela de exposição à lápis grafite, seguida da confecção da janela com o auxílio de uma tesoura curva para a devida exposição da CAM, conforme a Figura 2.



Figura 2. Exposição da CAM por meio da janela confeccionada.

Após a exposição da CAM, foi feito seu registro fotográfico pré-tratamento utilizando-se uma câmera acoplada a um estereomicroscópio. Em seguida, foram executados os tratamentos com o gel inerte Aristoflex®, como mostra a Figura 3, e com os controles positivo (hidróxido de sódio a 0,1mol/L) e negativo (solução salina a 0,9%), e cada tratamento foi testado em 24 embriões. O gel foi aplicado sobre a membrana corioalantóica por 3 minutos e, após esse período, foi removido com lavagem com um volume de 20mL de solução salina. Em seguida, foi realizada a fotografia pós-tratamento da membrana. Por fim, foi realizada a eutanásia dos embriões por congelamento a -20°C .



Figura 3. Aplicação do gel inerte sobre a CAM.

Posteriormente, foi realizada a análise visual das imagens da CAM obtidas após os tratamentos por um avaliador de acordo com as orientações descritas no protocolo DB-ALM n°96.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram obtidas imagens pré e pós-tratamento da CAM, como apresentado nas Figuras 4 e 5. A partir da análise visual, os tratamentos receberam classificações finais quanto à toxicidade, como apresentado pelos Tabela 1 e 2.

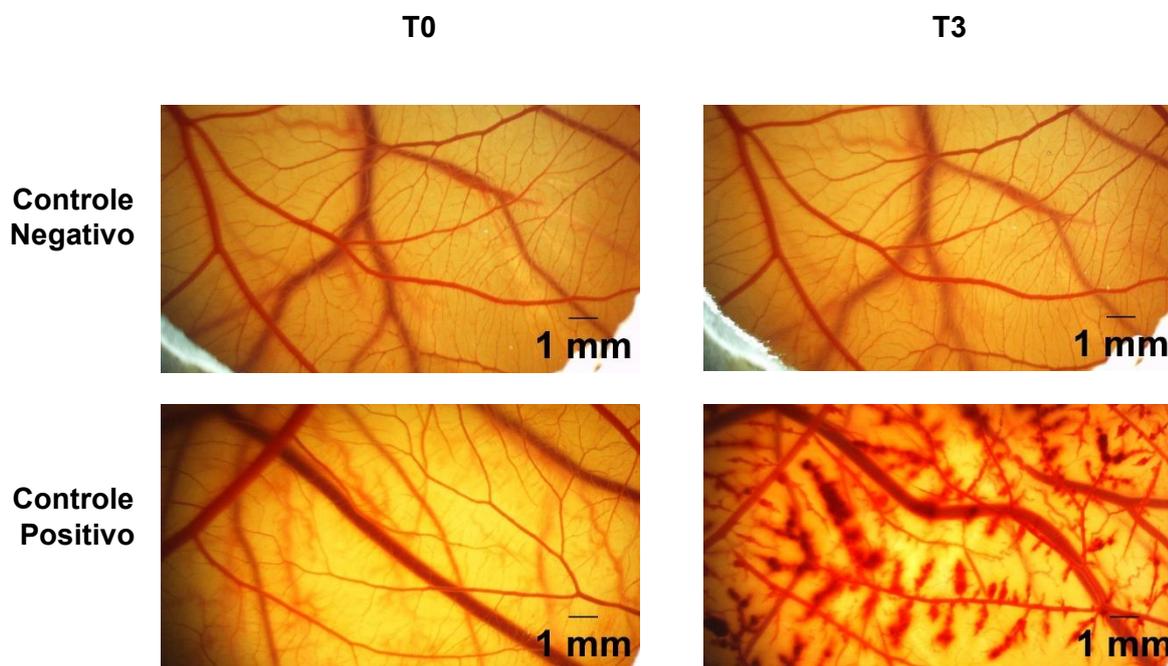
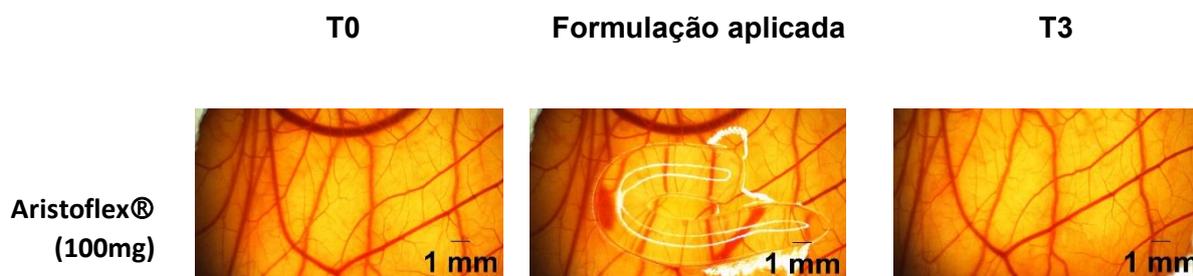


Figura 4. Imagens pré-tratamento (T0 = tempo 0) e pós-tratamento (T3 = tempo 3min) da CAM. Substâncias testadas: controle negativo (solução salina a 0,9%) e controle positivo (hidróxido de sódio a 0,1mol/L).

Tabela 1. Classificação do controle negativo e controle positivo quanto à sua toxicidade.

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



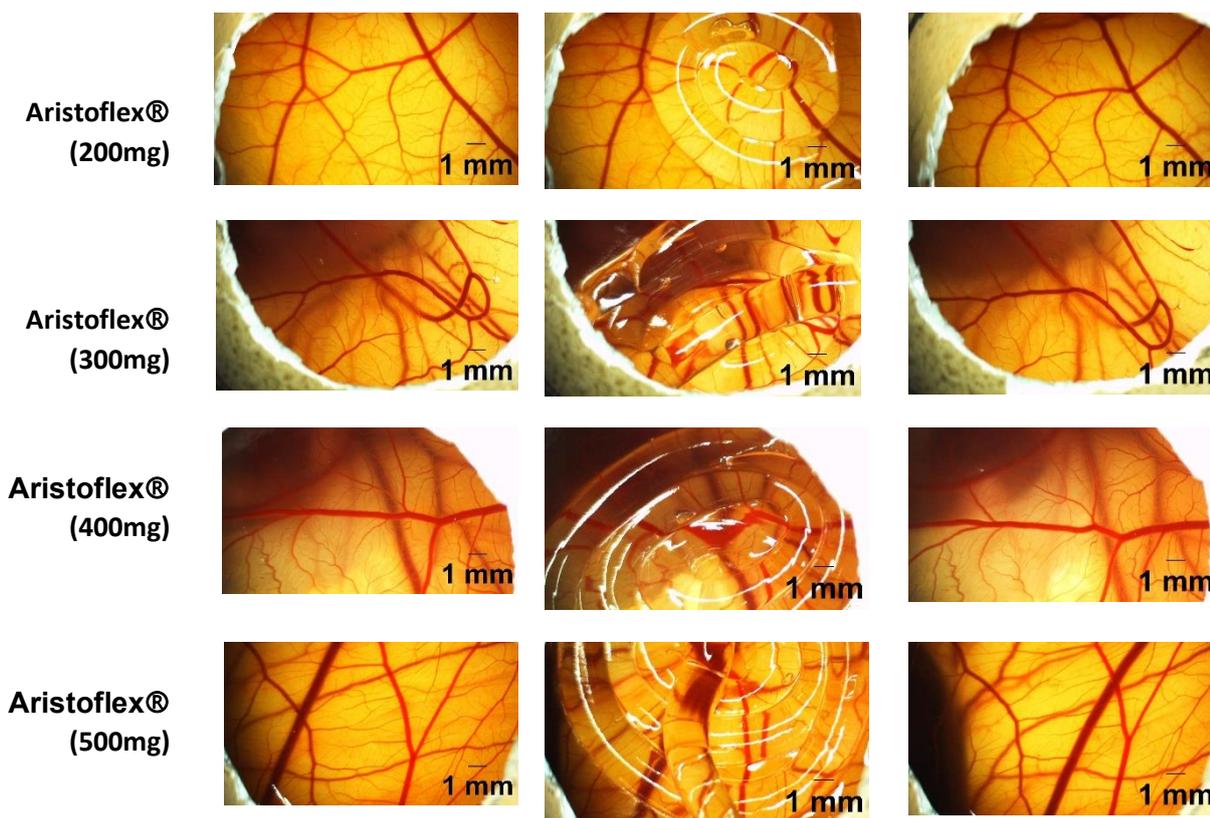


Figura 5. Imagens pré-tratamento (T0 = tempo 0), formulação aplicada sobre a CAM e pós-tratamento (T3 = tempo 3min) da CAM. Substância testada: Aristoflex (100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg).

Tabela 2. Classificação do gel inerte Aristoflex® nas faixas de peso de 100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg quanto à sua toxicidade.

Tratamento	Grupo	Pontuação final	Classificação
Aristoflex® (100mg)	1	0	Não irritante
	2	0	Não irritante
	3	0	Não irritante
	4	0	Não irritante
Aristoflex® (200mg)	1	0	Não irritante
	2	0	Não irritante
	3	0	Não irritante
	4	0	Não irritante
Aristoflex® (300mg)	1	0	Não irritante
	2	0	Não irritante
	3	0	Não irritante
	4	0	Não irritante
Aristoflex® (400mg)	1	0	Não irritante
	2	2	Levemente irritante
	3	1	Levemente irritante
	4	0	Não irritante

Aristoflex® (500mg)	1	2	Levemente irritante
	2	2	Levemente irritante
	3	1	Levemente irritante
	4	1	Levemente irritante

Não há na literatura constatações acerca da influência do peso de formulações nos resultados das análises de toxicidade em modelo HET-CAM. A partir dos resultados encontrados, foi possível perceber que as quantidades de 100mg, 200mg e 300mg parecem não causar influência nos resultados do modelo HET-CAM, visto que foram classificadas como não-irritantes, diferentemente das quantidades de 400mg e 500mg classificadas como levemente irritantes. Esses achados podem ser norteadores para futuros estudos ao estabelecer uma faixa de peso que não influencie nos resultados dos ensaios de toxicidade de formulações semissólidas em modelo HET-CAM.

Por fim, a formulação Aristoflex® apresentou características favoráveis à sua utilização nos ensaios como gel inerte, como a fácil manipulação, aplicação e remoção sob enxágue com soro fisiológico, baixo-custo, aspecto de transparência, permitindo a visualização da CAM durante os ensaios e a não alteração da coloração da membrana. Neste sentido, nosso estudo sugere o uso de Aristoflex® como controle negativo de ensaio de toxicidade de formulações semissólidas em modelo HET-CAM.

CONCLUSÕES:

As faixas de peso de 100mg, 200mg e 300mg foram classificadas como não irritantes nos ensaios em modelo HET-CAM. Assim, em análises futuras de toxicidade de formulações semissólidas utilizando o modelo HET-CAM é indicado utilizar até 300mg da substância para que não ocorra a interferência da massa das substâncias analisadas nos resultados dos ensaios. Além disso, sugere-se o uso do Aristoflex® como controle negativo em ensaios de toxicidade de formulações semissólidas em modelo HET-CAM.

BIBLIOGRAFIA

- Bezerra AAC. Avaliação da toxicidade de anestésicos tópicos de uso odontológico por meio do modelo da membrana corioalantóica do embrião de galinha [dissertação]. Piracicaba. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2023.
- ECVAM DB-ALM. Protocol No. 96: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). 2010.