UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ARTHUR ANTUNES COSTA BEZERRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ANESTÉSICOS TÓPICOS DE USO ODONTOLÓGICO POR MEIO DO MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO EMBRIÃO DE GALINHA

EVALUATION OF THE TOXICITY OF TOPICAL ANESTHETICS FOR DENTAL USE USING THE CHICKEN EMBRYO CHORIOALLANTOIC MEMBRANE MODEL

Piracicaba

2023

ARTHUR ANTUNES COSTA BEZERRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ANESTÉSICOS TÓPICOS DE USO ODONTOLÓGICO POR MEIO DO MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO EMBRIÃO DE GALINHA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO ARTHUR ANTUNES COSTA BEZERRA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MICHELLE FRANZ MONTAN BRAGA LEITE.

Piracicaba

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Bezerra, Arthur Antunes Costa, 1995-
B469a Avaliação da toxicidade de anestésicos tópicos de uso odontológico por meio do modelo da membrana corioalantóica do embrião de galinha / Arthur Antunes Costa Bezerra. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Michelle Franz Montan Braga Leite.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Membrana corioalantóica. 2. Toxicidade. 3. Anestésicos tópicos. 4. Odontologia. I. Franz-Montan, Michelle, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of the toxicity of topical anesthetics for dental use using the chicken embryo chorioallantoic membrane model
Palavras-chave em inglês:
Chorioallantoic membrane
Toxicity
Local anesthetics
Dentistry
Área de concentração: Fisiologia Oral
Titulação: Mestre em Odontologia
Banca examinadora:
Michelle Franz Montan Braga Leite [Orientador]
Octavio Augusto França Presgrave
Pedro Luiz Rosalen
Data de defesa: 11-08-2023
Programa de Pós-Graduação: Odontologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-3813-6945
- Currículo Lattes do autor: https://lattes.cnpq.br/2181852685572369

FOLHA DE APROVAÇÃO

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 11 de agosto de 2023, considerou o candidato Arthur Antunes Costa Bezerra aprovado.

Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

Prof. Dr. Octavio Augusto França Presgrave

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

A ata da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial aos meus pais e irmãos, por todo amor e incentivo durante toda a minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Antônio José de Almeida Meirelles e à **Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)**, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, à Comissão de **Pós-Graduação (CPG) da FOP-UNICAMP,** na pessoa do presidente Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão, à Comissão do **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa do coordenador Prof. Antônio Pedro Ricomini Filho.

Ao **Departamento de Biociências da FOP-UNICAMP**, na pessoa do seu Chefe Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line.

Aos professores da **Área de Fisiologia e Biofísica**, Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes e Prof. Dr. Yuri Martins Costa, pelo apoio em todos os momentos, amizade, conversas e confiança no meu trabalho. Pela equipe maravilhosa que formamos e pela harmoniosa convivência. Ao Prof. Dr. Yuri Costa também pela realização de parte das análises estatísticas dos dados obtidos neste estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho na forma de Auxílio Regular (Processo # 2020/03786-9).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pela bolsa de mestrado concedida.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Michelle Franz Montan Braga Leite**, por todo carinho, atenção e orientações durante o período de mestrado. Além disso, pela amizade construída e pelos bons momentos vividos.

Ao técnico do Laboratório de Fisiologia e Biofísica, **Fábio Padilha** (Fabinho), por toda ajuda durante os experimentos, pela amizade e por sempre estar disponível para nos ajudar nas “idas e vindas” à ESALQ-USP para buscar ovos.

Aos funcionários da CPG da FOP-UNICAMP, **Érica Alessandra Sinhoreti**, **Ana Paula Carone**, **Raquel Quintana Sachi** e **Leandro Viganó**, e à Srta. **Elisa dos Santos,** secretária do PPG-O da FOP-UNICAMP, pela cordialidade, solicitude e presteza de seus serviços, sempre.

À **Universidade de São Paulo (USP)**, na pessoa do Prof. Dr. Gerson Barreto Morão, pelo fornecimento de ovos fertilizados para a pesquisa. Ao Prof. Dr.

Gerson Barreto Mourão também pela realização de parte das análises estatísticas dos dados obtidos neste estudo.

À aluna de graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e bolsista de Iniciação Científica, **Laura Campos Dutra de Morais**, por toda ajuda durante os experimentos e pela análise visual das imagens pós-tratamentos obtidas neste estudo.

Às professoras da Banca Examinadora do Exame de Qualificação de Mestrado (segunda fase), Profa. Dra. **Belchiolina Beatriz Fonseca** (Universidade Federal de Uberlândia - UFU), Profa. Dra. **Hilde Harb Buzzá** (Pontifícia Católica do Chile - UC) e Dra. **Giovana Maria Fioramonti Calixto Balian** (*Formulation Scientist* – EMS), pelas considerações e contribuições científicas a este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Iza Maria Santos Costa e Antônio Ferreira Bezerra, por todo amor, educação, cuidado e motivação. Vocês são minhas referências e fontes de inspiração como pessoas, e também meus principais motivos para seguir em frente.

Aos meus irmãos, Raul de Jesus Costa Bezerra e Izanete Costa Bezerra, por todo amor e companheirismo. Sou muito grato a Deus por tê-los em minha vida.

À toda minha família, pelo amor, ajuda e palavras de motivação que recebi durante a minha jornada acadêmica.

Aos meus amigos, Aylla Mesquita Pestana, Iago Torres Cortês de Sousa, Camilla Karoline de Carvalho Beckman, e Ana Ferreira Souza, por todo amor e carinho, pelos bons momentos de convivência e por todo suporte que recebi durante o período de mestrado.

Aos amigos que conquistei em Piracicaba, Marvin Mateo Pec, Izadora Cunha, Bárbara Assunção, Thaynan Escarião, Iana Gonçalves, Vinícius Sampaio, Luiz Marinho e Vitor Marinho. Vocês tornaram meus dias mais leves e felizes durante esses dois anos.

RESUMO

Formulações de anestésicos tópicos (AT) são utilizadas na Odontologia para diminuir ou eliminar a dor associada à administração de anestésicos locais. Entretanto, novas formulações estão em constante desenvolvimento pois os AT atualmente disponíveis no mercado têm apresentado baixa eficácia anestésica. Dentre os ensaios exigidos para novas formulações antes do seu registro, destaca-se o ensaio de toxicidade. Entretanto, modelos utilizando animais tem sido cada vez menos utilizados considerando a constante preocupação com o sofrimento dos animais envolvidos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade do modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha como método de análise da toxicidade de anestésicos tópicos de uso odontológico. Além disso, desenvolver uma metodologia de análise quantitativa dos efeitos irritantes causados pelas formulações anestésicas a partir das imagens pós-tratamentos da CAM, utilizando um programa computacional. O modelo experimental da CAM empregado nesse estudo seguiu a metodologia descrita no protocolo HET-CAM DB-ALM Nº 96 (ECVAM). Foram utilizados 144 ovos embrionados (n=24/formulação, divididos em quatro réplicas - n=6/réplica), incubados a 37,5 °C e UR de 55-65%, durante 10 dias. No 10° dia, foram realizados os seguintes procedimentos: inspeção dos ovos para constatação do embrião vivo (ovoscopia), confecção da janela de acesso na casca, exposição da CAM, registro de imagem inicial, aplicação de 300 µL dos controles (positivo – hidróxido de sódio; negativo – solução salina) ou 300 mg das formulações-teste (Benzotop®, Labcaína®, Lidocaína® e EMLA®) durante 3 minutos, remoção das formulações com lavagem e registro de imagem final. Os efeitos sobre os vasos da CAM (hemorragia, lise e coagulação) foram avaliados nas imagens obtidas e pontuados segundo o protocolo mencionado, e as formulações foram classificadas dentro das categorias: “não-irritante”, “levemente irritante”, “moderadamente irritante”, “irritante” e “severamente irritante”. Em acréscimo, foi desenvolvido um método de quantificação dos coágulos extravasculares encontrados nas imagens utilizando-se o programa computacional *ImageJ*. O número de coágulos identificados pelo *ImageJ* nas imagens pós-tratamentos da CAM foi comparado utilizando análise de modelos mistos generalizados, utilizando o teste *t* de *Student*, com um nível de significância estabelecido em $p<0.05$. De acordo com o protocolo utilizado, o controle negativo foi classificado como “não-irritante” e a classificação do controle positivo variou de “moderadamente irritante” a “irritante”. Todas formulações comerciais de AT foram

classificadas como “moderadamente irritantes”. Com o uso do *ImageJ*, a média±DP do número de coágulos encontrados nas imagens para o controle positivo, Benzotop®, Labcaína®, Lidocaína® e EMLA® foi 18,37±10,66; 0,39±1,32; 0,45±1; 0,63±0,97 e 7,40 ±6,92, respectivamente. O controle negativo apresentou ausência de coágulos em todas as imagens e, por isso, seus dados foram excluídos desta análise. O controle positivo e o EMLA não diferiram entre si ($p<0,05$), mas apresentaram maior número de coágulos quando comparado às demais formulações comerciais ($p<0,05$). Estas, entretanto, não diferiram entre si ($p<0,05$). O modelo da CAM mostrou ser um método alternativo viável para avaliação da toxicidade de formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico. A análise das imagens utilizando o *ImageJ* demonstrou ser uma ferramenta complementar ao protocolo HET-CAM DB-ALM Nº 96 promissora, pois permitiu a quantificação dos efeitos tóxicos.

Palavras-chave: Membrana corioalantóica. Toxicidade. Anestésicos locais. Odontologia.

ABSTRACT

Topical anesthetic (TA) formulations are used in Dentistry to reduce or eliminate pain associated with the administration of local anesthetics. However, new formulations are constantly being developed as the AT currently available on the market have shown low anesthetic efficacy. Among the tests required for new formulations before their registration, toxicity testing stands out. However, models using animals have been used less and less considering the constant concern about the suffering of the animals involved. Thus, the objective of this study was to evaluate the applicability of the chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) model as a method of analyzing the toxicity of topical anesthetics for dental use. Furthermore, develop a methodology for quantitative analysis of the irritating effects caused by anesthetic formulations based on CAM post-treatment images, using a computer program. The CAM experimental model used in this study followed the methodology described in the HET-CAM DB-ALM Nº 96 (ECVAM) protocol. 144 embryonated eggs were used (n=24/formulation, divided into four replicates - n=6/replica), incubated at 37.5 °C and RH of 55-65%, for 10 days. On the 10th day, the following procedures were carried out: inspection of the eggs to verify the embryo was alive (ovoscopy), creation of the access window in the shell, exposure of the CAM, initial image recording, application of 300 µL of controls (positive – hydroxide sodium; negative – saline solution) or 300 mg of the test formulations (Benzotop®, Labcaína®, Lidocaína® and EMLA®) for 3 minutes, removing the formulations with washing and recording the final image. The effects on CAM vessels (hemorrhage, lysis and coagulation) were evaluated in the images obtained and scored according to the aforementioned protocol, and the formulations were classified within the categories: “non-irritating”, “slightly irritating”, “moderately irritating” , “irritating” and “severely irritating”. In addition, a method for quantifying extravascular clots found in images was developed using the ImageJ computer program. The number of clots identified by ImageJ in post-treatment CAM images was compared using generalized mixed model analysis, using the Student's t test, with a significance level set at $p<0.05$. According to the protocol used, the negative control was classified as “non-irritating” and the positive control classification ranged from “moderately irritating” to “irritating”. All commercial AT formulations were classified as “moderately irritating”. Using ImageJ, the mean±SD number of clots found in the images for the positive control, Benzotop®, Labcaína®, Lidocaína® and EMLA® was 18.37±10.66; 0.39±1.32; 0.45±1; 0.63±0.97 and 7.40 ±6.92, respectively. The negative

control showed the absence of clots in all images and, therefore, its data were excluded from this analysis. The positive control and EMLA did not differ from each other ($p<0.05$), but presented a greater number of clots when compared to the other commercial formulations ($p<0.05$). These, however, did not differ from each other ($p<0.05$). The CAM model proved to be a viable alternative method for evaluating the toxicity of topical anesthetic formulations for dental use. Image analysis using ImageJ proved to be a promising complementary tool to the HET-CAM DB-ALM Nº 96 protocol, as it allowed the quantification of toxic effects.

Keywords: Chorioallantoic membrane. Toxicity. Local anesthetics. Dentistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química de anestésicos locais dos tipos amino-éster e amino-amida 17

Figura 2. Características embriológicas dos animais amniotas.....22

Figura 3. Componentes morfológicos extraembrionários de aves, após o período de formação da CAM 23

Figura 4. Métodos de cultivo de embriões de aves em laboratório: in ovo e ex ovo 25

Figura 5. Ilustração esquemática sobre a aquisição e incubação dos ovos.....32

Figura 6. Procedimento de ovoscopia.....33

Figura 7. Confecção da janela na casca dos ovos 33

Figura 8. Remoção da membrana da casca do ovo e exposição da CAM 34

Figura 9. Aplicação das substâncias-teste 35

Figura 10. Efeitos irritantes a serem avaliados 36

Figura 11. Características da coagulação.....37

Figura 12. Calibração do programa *ImageJ* a partir da correlação entre o número de pixels e o tamanho real das estruturas das imagens 39

Figura 13. Padronização das dimensões da área a ser avaliada pelo programa *ImageJ*.....39

Figura 14. Conversão do formato das fotografias 40

Figura 15. Uso do *plug-in* IsoPhotContour2 40

Figura 16. Ajuste do limiar de cor das imagens e mensuração do número de partículas delimitadas 41

Figura 17. Análise das partículas (coágulos extravasculares) presentes nas imagens 42

Figura 18. Análise do número e área dos coágulos extravasculares a partir do plug-in IsoPhotContour2 do programa *ImageJ* 42

Figura 19. Aplicação dos controles negativo e positivo sobre a CAM 46

Figura 20. Aplicação das formulações comerciais de anestésicos tópicos de uso odontológico sobre a CAM 46

Figura 21. Relação entre a quantidade de coágulos extravasculares observadas nas imagens da CAM submetidas aos diferentes tratamentos, sinalizados por meio do programa *ImageJ* e da análise visual.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas das formulações comerciais tópicas avaliadas.....34

Tabela 2. Classificação das substâncias a partir do método de avaliação do ponto final 38

Tabela 3. Classificações finais das substâncias-teste a partir da análise visual de dois avaliadores.....47

Tabela 4. Quantidade de coágulos extravasculares encontrados nas imagens de CAM's submetidas aos diferentes tratamentos, sinalizados a partir da análise visual e pelo programa *ImageJ* 49

Tabela 5. Média e erro padrão da média (SEM) da quantidade de coágulos mensurados nas imagens da CAM submetidas às diferentes formulações identificados pelo programa *ImageJ* 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL – Anestésicos locais;

AT – Anestésicos tópicos;

CAM – *Chorioallantoic membrane;*

ECVAM - *European Centre for the Validation of Alternative Methods;*

EMLA – *Eutectic mixture of local anesthetics;*

HET-CAM - *Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane*;

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods;*

ISO - *International Organization for Standardization*.

Sumário

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DA LITERATURA 20

2.1. Formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico 20

2.2. Formação da CAM durante o desenvolvimento embrionário 22

2.3. Características morfofisiológicas da CAM do embrião de galinha 24

2.4. Protocolos de cultivo dos embriões - modelos in ovo e ex ovo 25

2.5. Aplicabilidade do modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha 27

3 PROPOSIÇÃO 30

4 MATERIAL E MÉTODOS 31

4.1. Materiais e equipamentos utilizados 31

4.3. Preparo dos ovos e confecção da janela para exposição da CAM de galinha 33

4.4.1. Aplicação dos controles positivo e negativo 35

4.4.2. Aplicação das formulações comerciais de anestésicos tópicos 35

4.4.3. Avaliação e classificação dos efeitos irritantes 36

4.4.4. Pontuações finais e classificação das substâncias 37

4.5. Análise das imagens a partir do programa computacional ImageJ 38

4.5.1. Mensuração da quantidade e da área dos coágulos extravasculares 39

4.6. Eutanásia dos embriões 43

4.7. Análise estatística 43

5 RESULTADOS 46

5.1. Estudo de confiabilidade 46

5.2. Toxicidade das formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico de acordo com protocolo HET-CAM 46

5.3. Confirmação da identificação das áreas de coágulos extravasculares das imagens realizada pelo programa ImageJ 49

5.4. Toxicidade das formulações avaliadas utilizando o programa ImageJ 51

6 DISCUSSÃO 53

7 CONCLUSÃO 59

8 REFERÊNCIAS 60

Anexo 1 – CARTA DE DOAÇÃO DOS OVOS 73

Anexo 2 – ANÁLISE DO ESTUDO PELA CEUA-UNICAMP 74

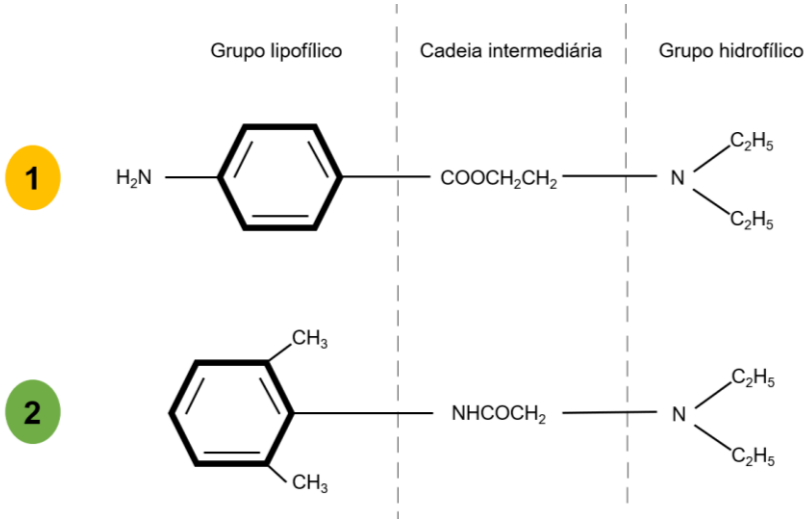
Anexo 3 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO 76

1 INTRODUÇÃO

O medo e a ansiedade frequentemente associados a agulhas e injeções são fatores que afetam a busca de muitos pacientes por tratamento odontológico regular (Boyce *et al.*, 2016). Uma estratégia adotada com a finalidade de reduzir a dor durante a inserção da agulha e injeção da solução de anestésico local (AL) foi o desenvolvimento de formulações de anestésicos tópicos (AT), os quais são comercializados em diferentes formas farmacêuticas, como gel, creme, pomada, líquido, spray ou loção (Mundiya e Woodbine, 2022; Franz-Montan *et al*., 2017).

A concentração do AL na formulação tópica bucal é tipicamente maior que a da forma injetável, a fim de garantir a penetração de quantidade suficiente do fármaco na mucosa para obtenção do efeito anestésico. Entretanto, altas concentrações de fármacos também aumentam o risco de toxicidade local aos tecidos circundantes ao sítio de aplicação e sistêmica, se o fármaco for eficientemente absorvido (Malamed, 2021). Os AL podem ser classificados como amino-ésteres ou amino-amidas, dependendo de sua estrutura química, conforme ilustrado na **Figura 1** (Lee, 2016).

Figura 1. Estrutura química de anestésicos locais dos tipos amino-éster (1) e amino-amida (2).



Fonte: Adaptado de Wannmacher (2007).

Os AL como o cloridrato de tetracaína, a prilocaína e o butambém, ambos em baixa concentração, são comumente incorporados a formulações de AT de uso odontológico. Porém, a benzocaína e a lidocaína são os AL mais amplamente

utilizados. Existem diferentes formulações, combinações e marcas de AT (Boyce *et al*, 2016; Mundiya e Woodbine, 2022). Entretanto, a eficácia clínica das formulações atualmente comercializadas tem sido controversa na literatura (Franz-Montan *et al.*, 2017). Diante deste contexto, novas formulações têm sido desenvolvidas e propostas objetivando uma melhor eficácia clínica.

Dentre as etapas preconizadas pelas autoridades reguladoras durante o desenvolvimento farmacêutico, destacam-se os ensaios de toxicidade, que têm como objetivo detectar ou identificar possíveis efeitos adversos em seres humanos quando expostos ao produto em questão (Chen *et al.*, 2021). Os modelos de ensaios de toxicidade em animais sempre foram os mais utilizados para identificar potenciais riscos toxicológicos de substâncias, devido às semelhanças celulares e bioquímicas que existem entre os animais e os seres humanos (Meyer, 1993; Meyer, 2003).

Entretanto, o uso de animais em pesquisas tem sido motivo de intensos debates devido à necessidade de um grande número de amostras nos processos investigativos e ao sofrimento causado aos animais envolvidos, especialmente nos estudos de toxicidade aguda (Cazarin *et al.*, 2004). Com a preocupação crescente com o bem-estar animal, em 1959, Russell e Burch publicaram o livro intitulado "*The Principles of Humane Experimental Technique*", onde propuseram três princípios básicos conhecidos como “3R's”: substituição, redução e refinamento (*Replacement, Reduction e Refinement*), em busca de reduzir o sofrimento na prática da experimentação animal. Esses princípios éticos podem ser aplicados em qualquer experimento envolvendo animais por pesquisadores e órgãos que buscam conduzir esses estudos de maneira mais humanitária possível (Parker e Browne, 2014).

No intuito de promover os princípios dos 3R’s, a comunidade científica em âmbito nacional e internacional vem desenvolvendo e validando novas abordagens científicas conhecidas como métodos alternativos. Os métodos alternativos em pesquisa científica 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).

O modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha é um dos modelos alternativos já desenvolvidos e amplamente utilizados para avaliação da toxicidade de formulações tópicas com diversas finalidades. 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 de tempo (Ribatti, 2016). Ademais, pode ser utilizada como uma valiosa conexão entre os modelos *in vitro* e *in vivo* para pesquisas pré-clínicas (Moreno-Jiménez *et al.*, 2017).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico

A anestesia tópica, também conhecida como anestesia de superfície, atua controlando as sensações de dor ao bloquear os sinais transmitidos pelas fibras nervosas sensoriais periféricas localizadas logo abaixo da camada epitelial (lâmina própria). Contudo, seu efeito é restrito a tecidos superficiais (2 a 3 mm). A eficácia de um anestésico tópico depende de diversos fatores, tais como a composição da formulação (que pode incluir um ou mais anestésicos locais), a concentração do anestésico utilizado e as condições de contato com a mucosa, incluindo a forma farmacêutica empregada e a duração do contato, além do sítio de aplicação (Malamed, 2021; Tirupathi e Rajasekhar, 2022).

O papel dos AT na odontologia é reduzir os estímulos dolorosos ou amenizar os efeitos de procedimentos superficiais em tecidos moles, como a administração de anestésicos locais, colocação de bandas ortodônticas, reflexo de vômito, tratamento de mucosite oral, colocação de grampos e raspagem periodontal (Meechan, 2000). Os AT podem ser aplicados em diversas formas, como géis, pomadas, pós, sprays ou cremes (Pochapski *et al*., 2012; Lee, 2016; Mundiya e Woodbine, 2022). Na odontopediatria, as formulações de AT são utilizadas previamente à aplicação de anestésicos locais, preparos de cavidade, uso de grampos para isolamento absoluto, exodontia de dentes decíduos com mobilidade acentuada e procedimentos ortodônticos (Tirupathi e Rajasekhar, 2022).

Os AT podem ser de dois tipos: hidrofílicos e lipofílicos. As formulações hidrofílicas normalmente incluem o AL na forma de sal como cloridrato de tetracaína, cloridrato de lidocaína ou álcool benzílico. Já os anestésicos tópicos lipofílicos, contêm o AL na forma de base como benzocaína, prilocaína ou lidocaína (Lee, 2016). Estes últimos são os anestésicos locais mais frequentemente utilizados em formulações tópicas utilizadas pelos cirurgiões-dentistas (Mundiya e Woodbine, 2022). Sendo a prilocaína encontrada na forma de mistura eutética de lidocaína e prilocaína (EMLA®), a qual também tem sido empregada por dentistas, embora o fabricante não recomende seu uso na mucosa da cavidade bucal (Bula do medicamento, acessada em 26/07/2023 EMLA, 2022).

Em formulações tópicas, a concentração do anestésico local é geralmente maior do que na forma injetável para promover a difusão do fármaco pela mucosa, tipicamente pela lei de *Fick.* No entanto, isso também aumenta o risco de toxicidade local no sítio de aplicação e, se o fármaco for absorvido eficientemente, pode representar um risco sistêmico (Malamed, 2021). Portanto, a avaliação da toxicidade dessas formulações é necessária para garantir a integridade da saúde humana após uma exposição. Alguns estudos avaliaram a toxicidade de AL por meio de ensaios *in vitro* de viabilidade de alguns tipos celulares, como queratinócitos e fibroblastos humanos, utilizando técnicas como XTT e MTT (Perez-Castro *et al*., 2009; Ferreira *et al*., 2016; Batista *et al.*, 2021) ou ainda utilizando células neuronais de ratos (Gold *et al.,* 1998). Porém, o modelo animal ainda é o mais empregado para essa finalidade (Cazarin *et al*., 2004).

Para avaliar o potencial irritante de substâncias na mucosa oral humana, o teste de irritação da mucosa oral em hamsters é o método padrão-ouro recomendado pela *International Organization for Standardization* - ISO e descrito no protocolo ISO 10993-10:2010 (International Organization for Standardization, 2010). De acordo com o protocolo, a substância-teste deve ser aplicada quatro vezes, durante 5 min/aplicação, na mucosa da bolsa gutural dos animais, com intervalo de uma hora entre as aplicações. Vinte e quatro horas após o término da última aplicação, os animais são submetidos à eutanásia e a mucosa exposta às formulações são removidas para confecção de lâminas histológicas seguida da análise por um patologista, seguindo as diretrizes e pontuações recomendadas no protocolo. Com base nessa análise, são atribuídas pontuações aos achados histológicos, resultando em uma pontuação final. Esta é utilizada para classificar a substância-teste quanto ao índice de irritação, em 5 classificações variando de "não-irritante" a "severo".

Outros modelos animais têm sido empregados na avaliação da toxicidade de anestésico tópicos. Pochapski *et al.* (2012) avaliaram o potencial irritativo de dois anestésicos tópicos utilizados previamente à raspagem periodontal, a partir da análise da permeabilidade vascular em ratos. O corante azul de Evans a 2% foi administrado pela via intravenosa na veia caudal lateral e as formulações de AT foram injetadas em dois sítios por via intradérmica. A permeabilidade vascular foi avaliada pela medida da área de extravasamento do corante nos sítios de aplicação das formulações testadas. Lee *et al*. (2023) realizaram o teste de irritação da mucosa oral causada por

um anestésico tópico na forma de um adesivo a partir de sua aplicação na mucosa sublingual de coelhos. O eritema na superfície do local de teste foi registrado e avaliado de acordo com um sistema de graduação para resposta oral. Além disso, os tecidos dos sítios de aplicação foram submetidos à análise histopatológica, na qual foram avaliados danos epiteliais, infiltração de glóbulos brancos, congestão vascular e edema. Já Zhu *et al*. (2022) avaliaram a irritação local de um adesivo de microagulhas composto por pontas carregadas com cloridrato de lidocaína a partir de sua aplicação na mucosa oral de camundongos. Após a remoção das microagulhas, os tecidos dos sítios de aplicação foram submetidos à análise histológica para avaliar os possíveis danos causados pela formulação anestésica.

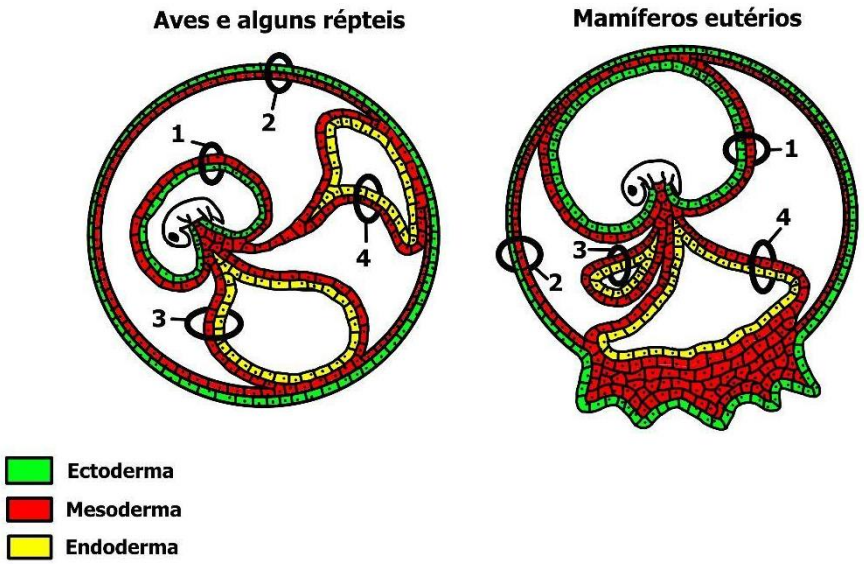
Entretanto, dependendo do nível de toxicidade das formulações avaliadas, os animais submetidos a estes tipos de ensaios podem sofrer injúrias. Nesse sentido, novos modelos para estudo de toxicidade de formulações tópicas têm sido propostos e avaliados com o intuito de substituir métodos que causam sofrimento animal. Dentre eles, está o modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha, o qual vem se tornando um modelo amplamente empregado em diversos campos de pesquisa, devido às suas numerosas vantagens e aplicações versáteis. Dentre as espécies de aves utilizadas, destacam-se codornas, perus e patos; no entanto, a mais frequentemente empregada é a galinha da espécie *Gallus gallus* (Kundeková *et al.*, 2021; Butler *et al.*, 2022).

2.2. Formação da CAM durante o desenvolvimento embrionário

Os mamíferos, as aves e os répteis pertencem ao grupo dos amniotas, que são vertebrados que se reproduzem em ambiente terrestre. Essa característica reprodutiva está associada a dois elementos fundamentais no desenvolvimento dos amniotas: fertilização interna e formação de tecidos extraembrionários. No caso das aves e alguns répteis, esses tecidos se desenvolvem no interior de ovos. Todos os amniotas possuem quatro componentes extraembrionários essenciais: âmnio, córion, saco vitelino e alantoide. Esses tecidos extraembrionários, assim como os tecidos intraembrionários, são compostos por células representativas das três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma (**Figura 2**) (Sheng e Foley, 2012).

Figura 2. Características embriológicas dos animais amniotas. Imagem da esquerda: visão esquemática da organização de aves e alguns répteis. Imagem da direita: visão esquemática

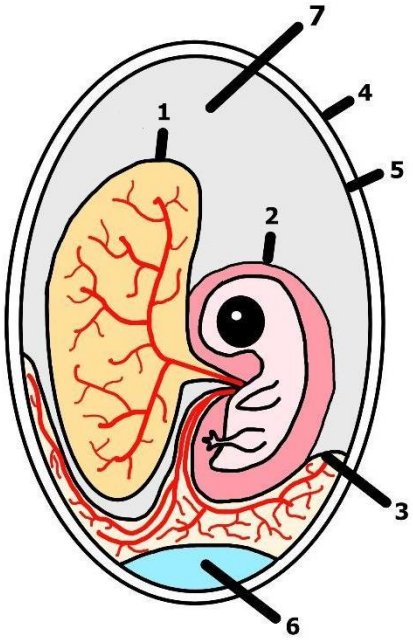
da organização em mamíferos eutérios. (1) âmnio; (2) córion; (3) saco vitelino; (4) alantoide. As camadas germinativas são codificadas por cores: verde = ectoderma; vermelho = mesoderma; amarelo = endoderma).



Fonte: Adaptada de Sheng e Foley,2012.

O saco vitelino é a membrana que envolve a gema, enquanto o âmnio é o saco que protege o embrião (**Figura 3**). Este último tem a capacidade de secretar líquido para amortecer o embrião e evitar a desidratação (Bellairs e Osmond, 2005). A CAM é formada a partir da fusão do córion e do alantoide em embriões de aves e répteis, e apresenta uma rede vascular densa (**Figura 3**). O alantoide é um divertículo do intestino posterior que serve como reservatório para resíduos metabólicos, e o córion delimita o limite externo do embrião. Em embriões de galinha, a fusão entre esses dois tecidos ocorre entre o terceiro e o quarto dia de vida embrionária (Nagai *et al.*, 2022). A CAM desempenha o papel equivalente à placenta em mamíferos devido à semelhança da origem embrionária dessas estruturas (Makanya *et al.*, 2016).

Figura 3. Componentes morfológicos extraembrionários de aves, após o período de formação da CAM. Observa-se, na imagem, os tecidos extraembrionários de aves: (1) saco vitelino, (2) âmnio e (3) membrana corioalantóica. Além disso, estão sinalizadas (4) a casca do ovo, (5) a membrana da casca do ovo, (6) a câmara de ar e (7) a albumina.



Fonte: elaborada pelo autor.

2.3. Características morfofisiológicas da CAM do embrião de galinha

Cada uma das três camadas distintas da CAM possui componentes estruturais definidos e desempenham funções específicas. O córion, de origem ectodérmica, é composto por células da cavidade vilosa (VC), células de cobertura capilar (CC) e células endoteliais (CE) que circundam o lúmen dos capilares coriônicos (Gabrielli *et al*., 2001). Por outro lado, o alantoide do embrião é de origem endodérmica e se desenvolve aproximadamente aos 3,5 dias de incubação como uma evaginação da parede ventral do intestino posterior endodérmico. A camada mesenquimal da CAM desenvolve a partir da fusão do mesoderma esplâncnico do alantoide com o do córion e contém vasos sanguíneos e estroma (Gabrielli e Accili, 2010).

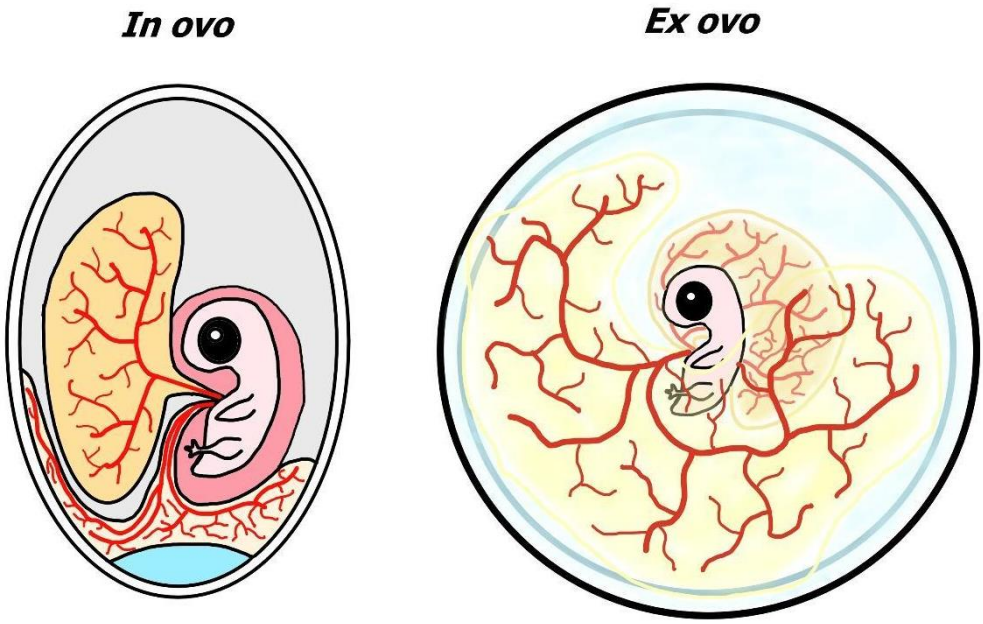
Entre o 10º e o 12º dias de desenvolvimento embrionário, os capilares da CAM estão localizados próximos à superfície do epitélio coriônico, e os vasos mesodérmicos se diferenciam em arteríolas e vênulas distintas (Chen *et al.*, 2021). As paredes das arteríolas consistem em uma ou duas camadas de células mesenquimais e apresentam maior quantidade de tecido conjuntivo circundante. As vênulas são envolvidas por um revestimento incompleto de células mesenquimais, que estão se diferenciando em células musculares lisas. As paredes das arteríolas também desenvolvem uma adventícia distinta que contém células semelhantes a fibroblastos (Ribatti, 2016).

A CAM desempenha diversas funções vitais, incluindo a troca de gases entre o embrião e o meio externo, o transporte de cálcio da casca do ovo para o embrião, a manutenção da homeostase ácido-base no embrião e a reabsorção de íons e água do líquido alantoide. Essas funções são realizadas pelos epitélios do córion e do alantoide, que apresentam uma ampla gama de peculiaridades estruturais e moleculares, tornando os epitélios altamente especializados no transporte de íons (Gabrielli e Accili, 2010).

2.4. Protocolos de cultivo dos embriões - modelos *in ovo* e *ex ovo*

Em geral, há duas possibilidades de cultivo dos embriões de aves em investigações científicas: modelos *in ovo* ou *ex ovo* (**Figura 4**). Há uma variedade de protocolos disponíveis para a cultura de embriões aviários, sendo a escolha do protocolo direcionada pelo tipo de experimento a ser realizado (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014).

Figura 4. Métodos de cultivo de embriões de aves em laboratório: *in ovo* e *ex ovo.*



Fonte: elaborada pelo autor.

A metodologia empregada na técnica *in ovo* pode variar de acordo com o protocolo utilizado. No protocolo proposto por Zwilling (1959), por exemplo, os ovos são cultivados em uma incubadora por três dias. No terceiro dia, é feito um pequeno orifício no ápice dos ovos para remover cerca de 2 a 3 mL de albumina e uma janela na casca para expor a CAM. Em seguida, o orifício e a janela são selados e os ovos

retornam para a incubadora, onde permanecerão até o dia dos experimentos. Em outro protocolo, os ovos são incubados por 10 dias e uma janela é confeccionada na casca, na região relacionada à câmara de ar do ovo. A partir dessa janela, realiza-se a exposição da CAM para prosseguir com o experimento (Steiling *et al.*, 1999). Uma vantagem deste protocolo é que não há intervenção humana nos ovos até o dia dos experimentos.

Destaca-se que a técnica *in ovo* é um método de cultivo minimamente invasivo quanto ao embrião de galinha em crescimento, proporcionando um ambiente relativamente inalterado para o seu crescimento e, geralmente, resultando em uma melhor taxa de sobrevivência dos embriões para fins experimentais (Kennedy *et al.*, 2021).

No modelo *ex ovo*, a casca é gentilmente quebrada e o conteúdo do ovo é transferido para um recipiente com perfurações em suas paredes que permitam as trocas gasosas entre o embrião e o meio externo. O embrião é então cultivado em uma incubadora com alta umidade e a CAM em desenvolvimento cresce próxima à superfície (O'Dwyer *et al.*, 2021; De Magalhães *et al.*, 2010). O momento da transferência é crítico para a sobrevivência embrionária e é idealmente realizada após 60 a 72 h após o início da incubação. Nesse estágio embrionário inicial, a CAM ainda não está presa à casca, o que garante maior sobrevida ao embrião. Entretanto, após esse período, a taxa de sobrevivência do embrião diminui drasticamente, pois o saco vitelino tende a aderir à CAM, aumentando o risco de rompimento durante a abertura da casca (Dohle *et al.*, 2009).

O risco de contaminação é uma questão importante tanto para o modelo *in ovo* quanto para o *ex ovo*, porém, é maior para o último, devido às manipulações extras associadas à técnica e maior exposição da superfície do conteúdo do ovo (Merckx *et al.*, 2020). Por outro lado, a técnica *in ovo* apresenta limitações significativas em relação à acessibilidade e visualização da CAM, quando comparada com a técnica *ex ovo* (Dohle *et al.*, 2009).

2.5. Aplicabilidade do modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha

A CAM vem sendo utilizada como uma plataforma *in vivo* para experimentação há mais de 50 anos (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014). Este modelo possui características que o tornam adequado para uma ampla gama de aplicações científicas, incluindo estudos do desenvolvimento vascular e angiogênese (Ponce e Kleinmann, 2003; Ribatti, 2008; Ames *et al.*, 2016; Gatne *et al.*, 2016), crescimento tumoral e metástase (Cimpean *et al.*, 2008; Ribatti, 2014; Herrmann *et al.*, 2016; Komatsu *et al.*, 2019; Miebach *et al.*, 2022), efeito antiangiogênico de substâncias (Victorelli *et al*., 2021; Victorelli *et al*., 2022), xenoenxerto de células tumorais (Kohl *et al.*, 2022; Ranjan *et al*., 2023) e de tecidos humanos (DeBord *et al.*, 2018; Ribatti, 2023; Villanueva e Sikora, 2022), além do estudo da cicatrização de feridas (Kilarski *et al.*, 2009).

Além disso, o modelo da CAM possui outras aplicações importantes, como a avaliação da toxicidade ou irritação local de diferentes materiais e produtos químicos. Em 1985, Luepke propôs um método alternativo utilizando o modelo da CAM do embrião de galinha para predizer o potencial irritante de substâncias, e comparou com os resultados encontrados a partir do teste de irritação ocular de Drazy, proposto em 1994 e que avalia o potencial irritante de substâncias a partir de sua aplicação na superfície ocular de coelhos. Esse método, conhecido como *Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM), consiste na aplicação tópica de uma substância na superfície da CAM e na constatação visual do surgimento dos efeitos irritantes, como hiperemia, coagulação e hemorragia, durante um período de 5 minutos. As pontuações atribuídas aos efeitos variam de acordo com o momento em que surgem. Este teste é realizado utilizando embriões no 10º dia de incubação (Luepke, 1985). Ao final do teste, efetua-se a soma das pontuações atribuídas aos três efeitos e se obtêm uma pontuação final, a qual é utilizada para classificar o potencial irritante das substâncias, que pode ser insignificante (<1.0), leve (1.0 - 4.9), moderado (5.0 – 8.9) ou forte (9.0 – 21.0).

Com base nesse método, outros protocolos HET-CAM foram elaborados e estão descritos na literatura (Spielmann *et al.*, 1991; INVITTOX, 1992; France, 1996; Steiling *et al.*, 1999; ECVAM, 2007; ICCVAM, 2010). Na maioria desses protocolos, as soluções de NaOH (0,1 M) e NaCl (0,9%) são utilizadas como controles positivo e

negativo, respectivamente (Fraguas-Sánchez *et al.*, 2022). Entretanto, esses protocolos diferenciam-se quanto ao tempo de exposição da CAM à substância-teste e à forma como os fenômenos de irritação visualmente identificados são quantificados. Embora a maioria dos protocolos estabeleça um tempo de exposição máximo das substâncias de 300 s, os produtos podem permanecer em contato com a CAM durante todo o tempo ou serem removidos em intervalos de tempo menores, e o momento do surgimento do efeito é registrado (Rivero *et al.*, 2021).

Embora os protocolos HET-CAM tenham sido desenvolvidos para estudos de irritação ocular, eles também têm sido empregados para avaliar a toxicidade de outros tipos de substâncias. Dentre elas, podemos mencionar pesticidas (Kishore *et al.*, 2008), dentifrícios (Corrado *et al.*, 2012), adjuvantes de vacinas (Batista-Duharte *et al.*, 2016), formulações antifúngicas (Kaewbanjong *et al.*, 2017), produtos de uso vaginal (Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2018; Reis *et al*., 2022; Tomás *et al.*, 2023), hidrogéis para terapia antimicrobiana (Goergen *et al.*, 2019), veneno de cobras (Knight *et al*., 2019; Polláková *et al*., 2021) e conservantes de produtos cosméticos (Ma *et al.*, 2021).

Nesse sentido, a CAM do embrião de galinha tem sido amplamente utilizada como um teste de avaliação da toxicidade e eficácia de novos medicamentos em desenvolvimento. Esse tecido demonstra ser sensível e capaz de responder de forma relativamente rápida às ações químicas ou biológicas de diferentes materiais e fármacos (Saw *et al.*, 2008), além de desempenhar um papel intermediário entre os ensaios celulares *in vitro* e os modelos pré-clínicos em mamíferos (Vargas *et al.*, 2007).

Entretanto, os métodos de pontuações utilizados nos protocolos HET-CAM apresentam como limitação a subjetividade nos resultados, carecendo de uma metodologia para obtenção de dados quantitativos após os tratamentos da CAM, inviabilizando comparações estatísticas (Hagino *et al*., 1991; Vinardell e García, 2000). Nesse sentido, programas computacionais têm sido utilizados para essa finalidade. O *ImageJ* é um programa de código aberto amplamente utilizado que permite aos usuários visualizar, inspecionar, quantificar e validar dados de imagens científicas (Schroeder *et al*., 2021).

O uso de programas computacionais favorece a rapidez na execução de tarefas repetitivas e a obtenção de resultados quantitativos, permitindo comparações estatísticas, e consequentemente com maior poder científico que dados qualitativos (Schindelin *et al.*, 2015). O *ImageJ* já foi utilizado para avaliar eventos presentes em imagens de CAM submetidas à diferentes tratamentos para avaliação da angiogênese (Mirando *et al*., 2017; Patel *et al*., 2017; Sabaner *et al*., 2021) e a hemorragia dos vasos (McKenzie *et al*., 2015).

Até o momento, não foram encontrados estudos na literatura que utilizaram o modelo da CAM para avaliar a toxicidade de formulações de anestésicos tópicos usados em odontologia. Assim, a primeira hipótese deste estudo é que é possível utilizar o modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha para avaliar a toxicidade de formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico, sendo um método de rápida execução, de baixo custo e sem sofrimento animal promissor a ser utilizado durante o desenvolvimento de novas formulações, contribuindo para a otimização do tempo necessário para o desenvolvimento. A segunda hipótese é que é possível desenvolver uma metodologia de análise das imagens da CAM submetidas aos tratamentos a fim de se quantificar os efeitos irritantes vasculares induzidos pelos anestésicos tópicos avaliados através do uso de um programa computacional.

3 **PROPOSIÇÃO**

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a aplicabilidade do modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha como método de análise da toxicidade de anestésicos tópicos de uso odontológico e desenvolver uma metodologia de análise quantitativa dos efeitos irritantes causados pelas formulações anestésicas a partir das imagens obtidas após os tratamentos sobre CAM utilizando um programa computacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais e equipamentos utilizados

- Incubadora com luz e dispositivo rotativo automático (Galinha Choca Chocadeiras, Galinha Choca Chocadeiras & Acessórios, São Bernardo do Campo – SP, Brasil);
- Lâmpada incandescente, de luz alógena, com potência de 42 W (específica para realização de ovoscopia) – Ourolux, São Paulo – SP, Brasil);
- Ovos embrionados, advindos de galinhas da espécie *Gallus gallus* (Aviário da ESALQ-USP, Piracicaba – SP, Brasil);
- Água destilada e ultrapurificada (MilliQ, Direct-Q 3, Millipore - Massachsetts, EUA);
- Álcool 70% (Prolink, Guapiaçu – SP, Brasil);
- Pinça clínica odontológica, (Quinelato, Rio Claro - SP, Brasil);
- Tesoura íris curva odontológica. Tamanho: 11,5 cm (Quinelato, Rio Claro - SP, Brasil);
- Cabo de bisturi n°3 (Golgran, São Caetano do Sul - SP, Brasil);
- Seringas descartáveis de 1 mL (Wiltex, Santana de Parnaíba – SP, Brasil, lote 190519);
- Seringas descartáveis de 20 mL (Procare, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, lote 2022015);
- NaCl cristal P.A-ACS, (Êxodo Cientifica Química Fina Indústria e Comércio LTDA, Sumaré - SP, Brasil);
- Hidróxido de sódio (NaOH) P.A-ACS (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba - SP, Brasil);
- Estereomicroscópio com câmera fotográfica acoplada (OPTIKA, modelo SZX-T, Ponteranica - Bérgamo, Itália);
- Programa computacional *ImageJ*, versão 1.54b (Java versão 1.8.0) – desenvolvido por Wayne Rasband (1987) - National Institute of Health, USA.
- Formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico comercialmente disponíveis: Benzotop® gel (Benzocaína a 20%, DFL, Rio de Janeiro - RJ, Brasil),

EMLA® creme (Mistura eutética de lidocaína a 2,5% e prilocaína a 2,5%, AspenPharma, Serra - ES, Brasil), Labcaína® pomada (Lidocaína a 5%, Pharlab, Lagoa da Prata - MG, Brasil) e Lidocaína® pomada 50mg/g (Lidocaína a 5%, EMS, Hortolândia -SP, Brasil).

4.2. Aspectos éticos, aquisição e processo de incubação dos ovos

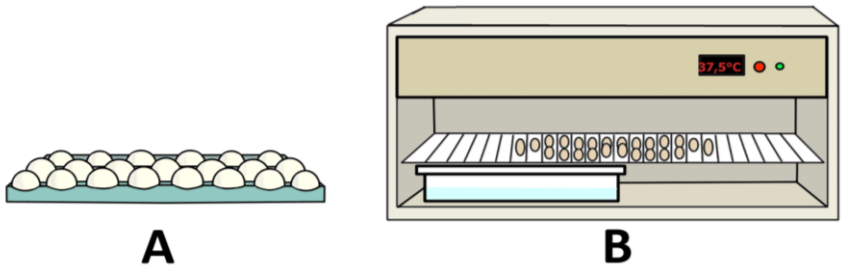
O modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha foi utilizado conforme metodologia descrita no protocolo DB-ALM Nº 96 do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), intitulada "*Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)".* Os ovos galados utilizados neste estudo foram fornecidos, como doação, pelo Aviário da ESALQ-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão, do Laboratório de Melhoramento, Genética, Genômica e Desenho Experimental (**Anexo 1**).

Este estudo foi submetido à apreciação pela CEUA/UNICAMP e foi dispensada sua análise por se tratar de um método alternativo, e por ter sido realizado antes da metade do período embrionário e sem a manutenção do embrião vivo após esse período (**Anexo 2**).

Três dias após a inseminação das galinhas, os ovos foram retirados na ESALQ-USP e inspecionados visualmente para se avaliar a integridade de suas cascas. Em seguida, os ovos foram pesados em uma balança analítica e selecionados apenas aqueles com peso entre 50-60 g. Foi utilizado um total de 144 ovos embrionados neste estudo.

Após a seleção inicial, os ovos foram delicadamente higienizados utilizando-se gaze embebida com álcool 70% e incubados a 37,5±0,5 °C e UR de 55-65% em uma chocadeira, com um ciclo de viragem automático de 8 s a cada uma hora (**Figura 5**).

Figura 5. Ilustração esquemática sobre a aquisição e incubação dos ovos. (A) ovos recebidos em cartelas de papel; (B) incubados a 37,5±0,5 ºC e UR de 55-65%.

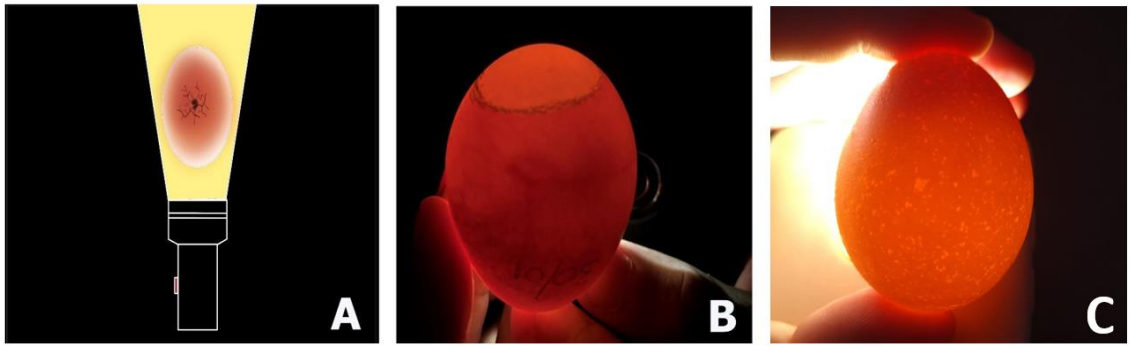


Fonte: elaborada pelo autor.

4.3. Preparo dos ovos e confecção da janela para exposição da CAM de galinha

No 10º dia de incubação, os ovos foram avaliados por meio da ovoscopia (técnica de inspeção do ovo contra uma fonte de luz para verificação do seu conteúdo interno) (**Figura 6A**) e delimitação das câmaras de ar utilizando um lápis grafite (**Figura 6B**). Os ovos que não desenvolveram embrião, conforme ilustrado na **Figura 6C**, foram descartados do estudo.

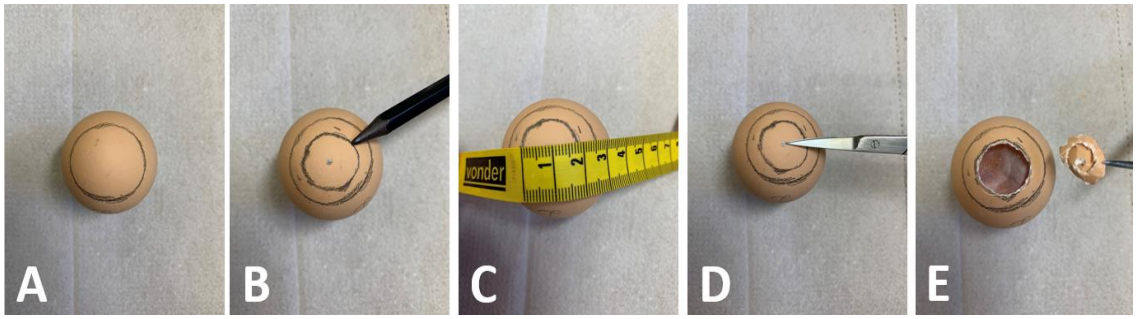
Figura 6. Procedimento de ovoscopia. (A) constatação do embrião vivo; (B) sinalização, à lápis, dos limites da câmara de ar; e (C) ausência de embrião no ovo.



Fonte: Lab. De Fisiologia Oral – FOP/UNICAMP.

Foi realizado a demarcação de área circular de 1,8 cm de diâmetro (**Figuras 7B** e **7C**) interiormente à câmara de ar previamente registrada (**Figura 7A**). Essa medida foi definida num estudo preliminar, a fim de garantir o acesso à CAM, sem causar danos ou extravasamento do conteúdo interno do ovo. Em seguida, foi realizada a abertura da janela com o auxílio de uma tesoura íris curva, conforme ilustram as **Figuras 7D** e **7E**.

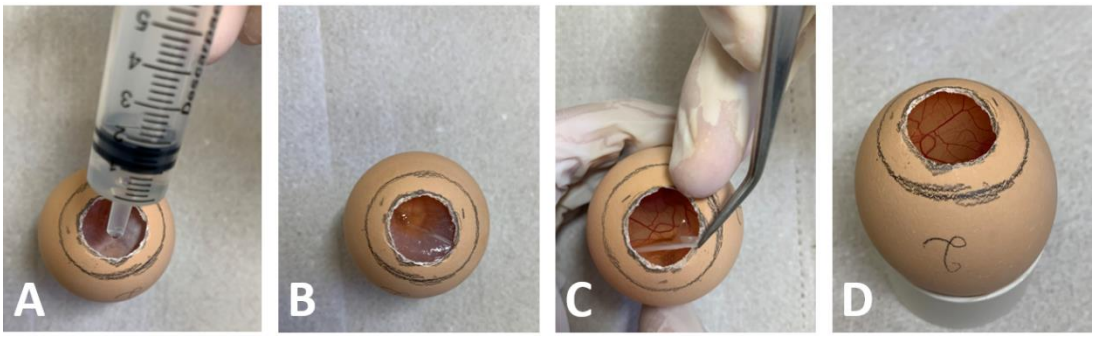
Figura 7. Confecção da janela na casca dos ovos. (A) limites da câmara de ar; (B) sinalização da área da janela com lápis grafite; (C) janela de 1,8 cm; (D) recorte da janela com uma tesoura curva; (E) recorte da janela finalizado.



Fonte: Lab. De Fisiologia Oral – FOP/UNICAMP.

A membrana da casca do ovo, que recobre a CAM foi então umedecida com 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) (**Figuras 8A** e **8B**) e delicadamente removida com o auxílio de uma pinça clínica cônica (**Figura 8C**), resultando na exposição completa da CAM (**Figura 8D**).

Figura 8. Remoção da membrana da casca do ovo e exposição da CAM. (A) membrana da casca sendo umedecida com 1 mL de soro fisiológico; (B) visualização da membrana úmida; (C) remoção da membrana com o auxílio de uma pinça clínica; (D) CAM devidamente exposta.



Fonte: Lab. De Fisiologia Oral – FOP/UNICAMP.

A CAM do embrião de galinha e seu sistema vascular foram pré-avaliados visualmente, e somente os ovos que apresentaram as estruturas íntegras foram utilizados. Cada substância-teste foi aplicada em um total de 24 ovos, divididos em quatro réplicas (n=6/réplica).

As seguintes formulações foram avaliadas: Benzotop® gel, EMLA® creme, Labcaína® pomada, Lidocaína® pomada, hidróxido de sódio a 0,1 mol/L (controle positivo) e cloreto de sódio a 0,9% (controle negativo). Os valores de pH das substâncias-teste foram avaliados e estão apresentados na **Tabela 1**, a seguir:

Tabela 1. Características físico-químicas das formulações comerciais tópicas avaliadas.

Substância	Forma farmacêutica	pH	AL da composição e sua concentração (%)	Lote
Cloreto de sódio a 0,9%	Solução	6,2	-	CS25483RA
Hidróxido de sódio a 0,1mol/L	Solução	13,1	-	66157
Benzotop®	Gel	6,5	Benzocaína a 20%	2011T0087
EMLA®	Creme	9,0	Lidocaína a 2,5% e prilocaína a 2,5%	121001
Lidocaína®	Pomada	7,0	Lidocaína a 5%	2R4672
Labcaína®	Pomada	6,8	Lidocaína a 5%	21000256

4.4. Análise visual dos possíveis efeitos tóxicos das formulações sobre a CAM

O registro da imagem da CAM antes e após os tratamentos foi realizado utilizando um estereomicroscópio (OPTIKA, modelo SZX-T), com aumento de 6,7x da imagem, para posterior análise. A avaliação da toxicidade das formulações pelo modelo da CAM foi realizada pelo método de "avaliação do ponto final", conforme o protocolo DB-ALM N°96 e descrito a seguir.

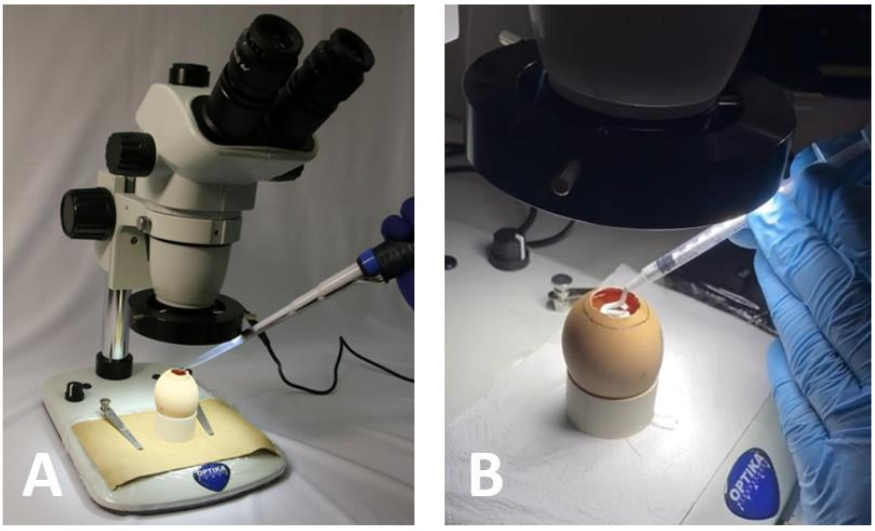
4.4.1. Aplicação dos controles positivo e negativo

Após a obtenção da imagem da CAM antes dos tratamentos (tempo zero), 0,3 mL das soluções dos controles positivo e negativo foram aplicados diretamente sobre a CAM, permaneceram em contato com a CAM durante 180 s (**Figura 9A**). Após este período, uma nova imagem da CAM foi obtida para posterior análise.

4.4.2. Aplicação das formulações comerciais de anestésicos tópicos

Após o registro inicial da CAM, cerca de 0,3 g das formulações semissólidas foram pesadas em uma seringa de 1mL e aplicadas sobre a membrana corioalantóica, conforme ilustra a **Figura 9B**. Decorrido o tempo de aplicação (180 s), as substâncias-teste foram cuidadosamente enxaguadas com o auxílio de 20 mL de soro fisiológico. O registro fotográfico final da CAM foi obtido somente 30 s após o final do enxágue.

Figura 9. Aplicação das substâncias-teste. (A) aplicação dos controles positivo e negativo (0,3 mL); (B) aplicação das formulações comerciais (300 mg).

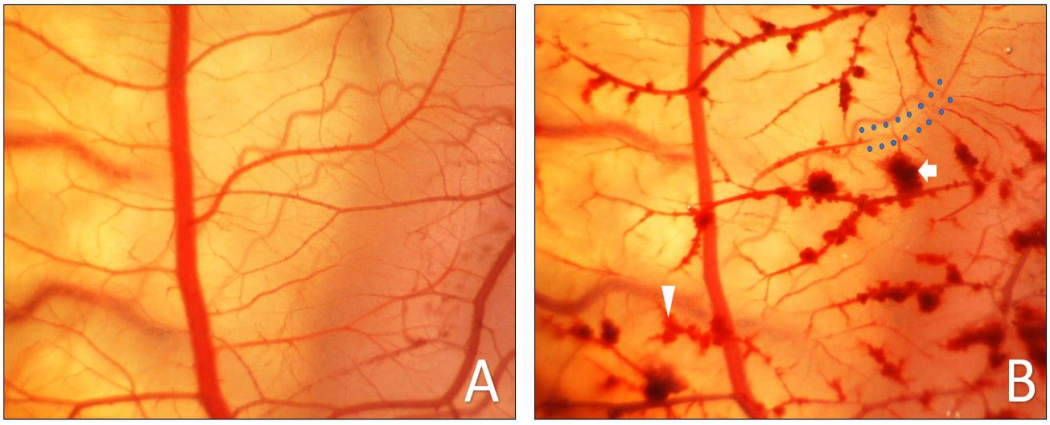


Fonte: Lab. De Fisiologia Oral – FOP/UNICAMP.

4.4.3. Avaliação e classificação dos efeitos irritantes

Os efeitos irritantes previstos no protocolo DB-ALM N° 96 do ECVAM (hemorragia, coagulação e lise dos vasos sanguíneos) estão evidenciados na **Figura 10B**.

Figura 10: Efeitos irritantes a serem avaliados. Possíveis efeitos irritantes encontrados a partir do teste de toxicidade descrito no protocolo N°96 do ECVAM: (A) imagem inicial da CAM (antes da aplicação da substâncias-teste; neste caso, o controle positivo); (B) imagem final (após 180 s da aplicação do controle positivo). Efeitos irritantes: hemorragia (triângulo invertido), coagulação extravascular (seta) e lise de vasos sanguíneos (circundado por pontos azuis).



Fonte: Lab. De Fisiologia Oral – FOP/UNICAMP.

As imagens da CAM obtidas após os tratamentos foram analisadas quanto aos efeitos possíveis (hemorragia, lise e coagulação) de acordo com as orientações descritas no protocolo DB-ALM n°96 e pontuados, independentemente, em cada um dos ovos. A análise foi realizada por dois avaliadores independentes. Todos os efeitos possíveis (hemorragia, lise e coagulação) foram classificados em ausente, fraco, moderado ou forte, recebendo as pontuações de 0, 1, 2 ou 3. As características de cada pontuação estão descritas abaixo.

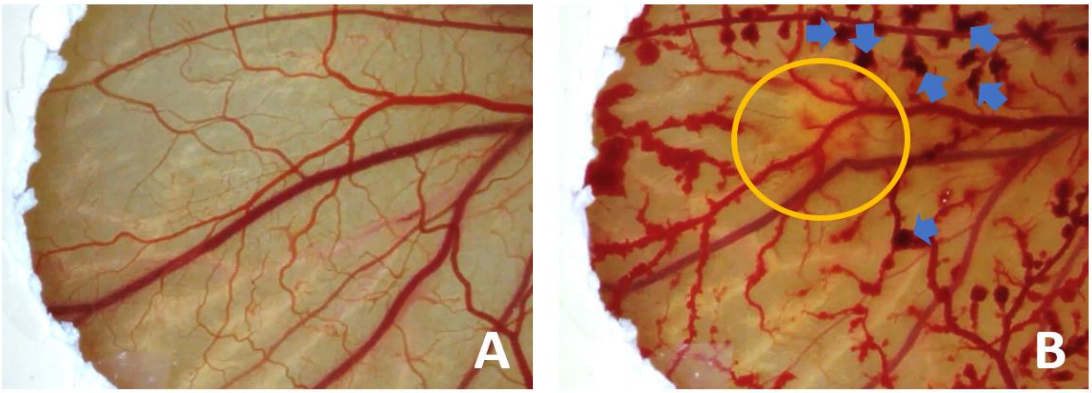
A **hemorragia,** caracterizada como extravasamento de sangue dos vasos sanguíneos, sendo: 1) fraca: apenas vasos sanguíneos finos estão sangrando e apenas pequenas quantidades de fluxo de sangue; 2) moderada: vasos sanguíneos finos e sangramento de vasos maiores e quantidade distinta de sangue fluindo; 3) forte: quase todos os vasos sanguíneos sangram, com quantidade considerável de sangue fluindo.

A **lise**, caracterizada como desaparecimento de vasos sanguíneos, sendo: 1) fraca: apenas lise de pequenos vasos sanguíneos; 2) moderada: lise de vasos

sanguíneos pequenos e grandes; 3) forte: grandes vasos sanguíneos e lise de cordões inteiros de vasos.

A **coagulação**, caracterizada pela presença de coágulos (manchas escuras) intra e/ou extravasculares e/ou com aumento na opacidade da CAM, sendo: 1) fraca: apenas fraca coagulação intra e/ou extravascular e/ou ligeiro aumento na opacidade da CAM é observável; 2) moderada: coagulação extravascular moderada e/ou aumento moderado na opacidade da CAM é observável; 3) forte: coagulação extravascular distinta severa e/ou aumento severo na opacidade da CAM é as pontuações de 1, 2 e 3, respectivamente. Características da reação de coagulação nos vasos da CAM são ilustradas na **Figura 11**.

Figura 11. Características da coagulação: (A) imagem de uma CAM saudável *in vivo*; (B) imagem da mesma CAM, após a aplicação do controle positivo. Note a presença de trombos extravasculares (manchas escuras sinalizados pelas setas azuis) e uma mudança na opacidade da membrana (sinalizada pelo círculo amarelo).



Fonte: Lab. De Fisiologia Oral – FOP/UNICAMP.

4.4.4. Pontuações finais e classificação das substâncias

As pontuações finais e as classificações das substâncias-teste quanto à toxicidade foram obtidas de acordo com o protocolo DB-ALM N°96. Cada substância foi aplicada num total de 24 (vinte e quatro) ovos, divididos em quatro réplicas (n=6/réplica).

- Os valores atribuídos aos efeitos observados nos 6 ovos de cada réplica foram somados. Os efeitos (hemorragia, lise e coagulação) foram pontuados independentemente, totalizando 3 pontuações por réplica (1 pontuação para cada um dos efeitos).

- A maior pontuação obtida entre os efeitos de cada réplica foi selecionada e considerada como a pontuação final da substância para cada uma delas. A partir da pontuação final, as substâncias foram classificadas de acordo com a **Tabela 2**. Assim, cada formulação recebeu 4 classificações finais (1 classificação para cada réplica, n=6).

Tabela 2. Classificação das substâncias a partir do método de avaliação do ponto final (Brantom *et al*., 1997).

Pontuação final	Classificação
-	Não-irritante
<6	Levemente irritante
6≤P≤12	Moderadamente irritante
12<P<16	Irritante
≥16	Severamente irritante

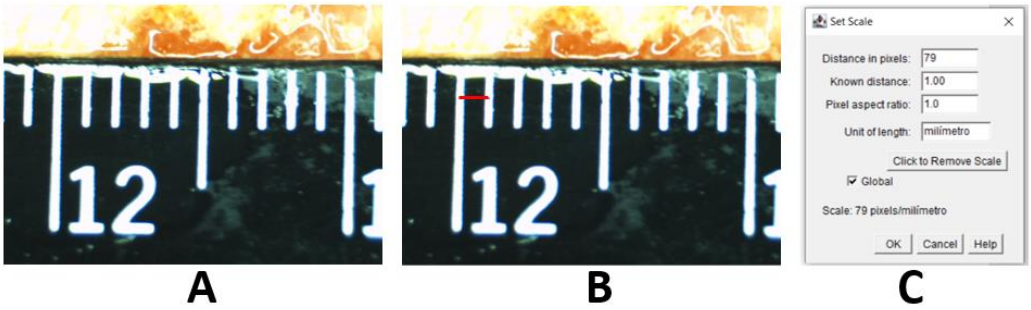
4.5. Análise das imagens a partir do programa computacional *ImageJ*

As imagens obtidas após os tratamentos dos ovos foram processadas utilizando o programa computacional *ImageJ* versão 1.54b (Java versão 1.8.0). Foi utilizado o *plug-in* IsoPhotContour, o qual avalia os diferentes níveis de profundidade de uma imagem com base nos valores de *pixels* (px), com o objetivo de destacar e quantificar os efeitos irritantes. Foi possível destacar e quantificar apenas o efeito de coagulação extravascular, uma vez que os valores de *pixels* associados a esse efeito eram distintos dos encontrados nos contornos dos vasos sanguíneos da CAM. A hemorragia e a lise apresentaram valores de *pixels* semelhantes aos dos vasos sanguíneos, impossibilitando, assim, a sua distinção e quantificação.

Inicialmente, foi realizada a calibração do programa a partir da correlação do número de *pixels* (px) com a medida real das estruturas da imagem em milímetros (mm). Para isso, uma régua foi posicionada sobre uma CAM exposta, simulando as mesmas condições experimentais (mesma lente de aumento e mesma distância entre a membrana e a lente do estereomicroscópio). Em seguida, foi registrada uma imagem, conforme ilustra a **Figura 12A**. A partir desta imagem, com o auxílio da ferramenta “linha reta” do programa, foi calculado o número de *pixels* em um comprimento de 1 mm (**Figura 12B**), encontrando-se o valor de 79 px. A partir deste

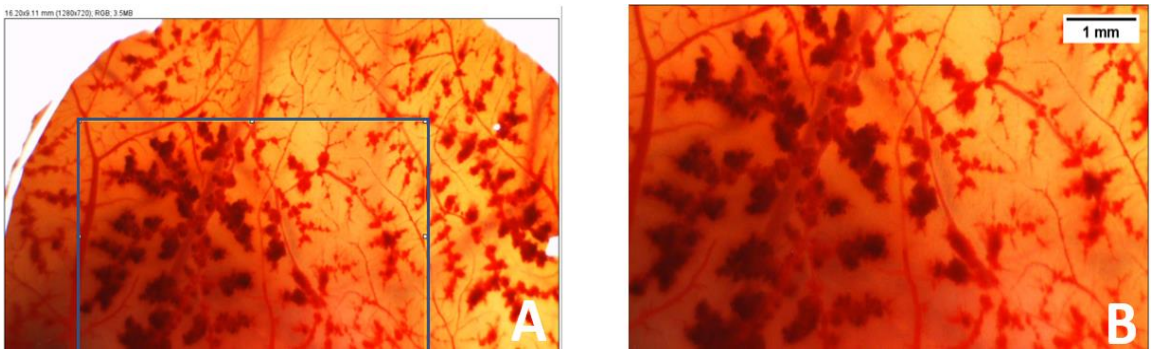
valor, o programa foi calibrado a considerar a medida de 79 px para cada 1 mm em todas as imagens do estudo (**Figura 12C**).

Figura 12. Calibração do *ImageJ* a partir da correlação entre o número de *pixels* e o tamanho real das estruturas das imagens: (A) régua posicionada sobre a CAM; (B) mensuração do número de *pixels* correspondentes a 1 mm, a partir do uso de uma linha reta (em vermelho); e (C) calibração do programa, a partir da correlação encontrada entre número de *pixels* e distância em milímetros.



A etapa seguinte consistiu na padronização da área a ser analisada nas imagens, destacando 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 px, 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 13**.

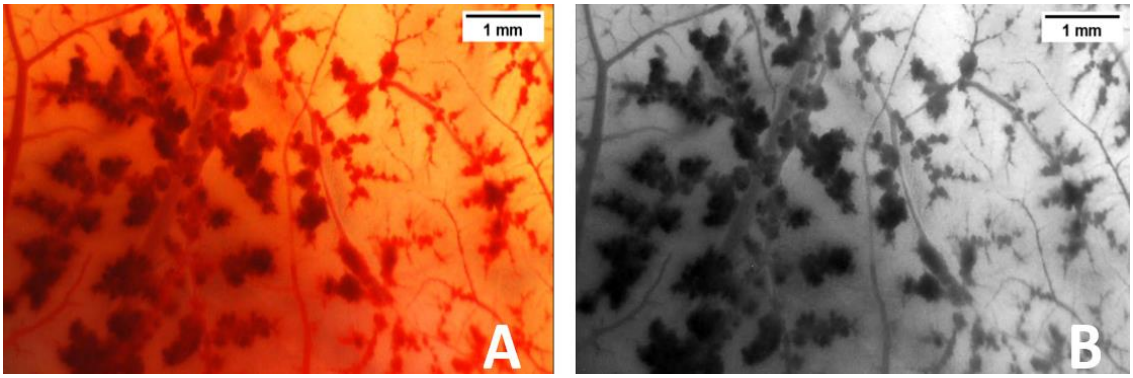
Figura 13. Padronização das dimensões da área a ser avaliada pelo *ImageJ*: (A) sinalização da área na imagem (retângulo azul), nas dimensões de 10,13 x 6,33 mm; e (B) imagem já nas dimensões determinadas.



4.5.1. Mensuração da quantidade e da área dos coágulos extravasculares

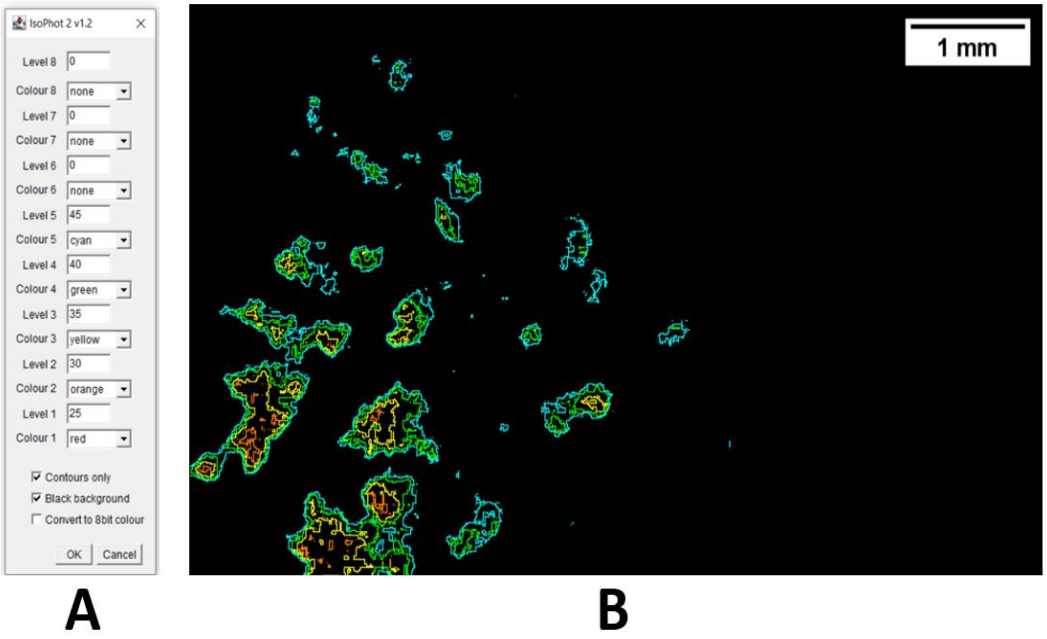
Para serem devidamente processadas pelo *ImageJ*, as imagens, ainda coloridas e em formato “RGB” (**Figura 14A**), foram convertidas para o formato “8 bits” e em escala de cinza, com brilho e contraste ajustados pelo modo “automático”, conforme ilustra a **Figura 14B**.

Figura 14. Conversão do formato das fotografias: (A) fotografia colorida e em formato “RGB”; e (B) fotografia convertida para o formato “8 bits” e em escala de cinza.



Em seguida, foi realizada a demarcação das áreas referentes aos coágulos extravasculares utilizando o *plug-in* IsoPhotContour2 do programa *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 15A**). Além disso, há a opção de tornar o fundo da imagem na cor preta, destacando as linhas coloridas (**Figura 15B**).

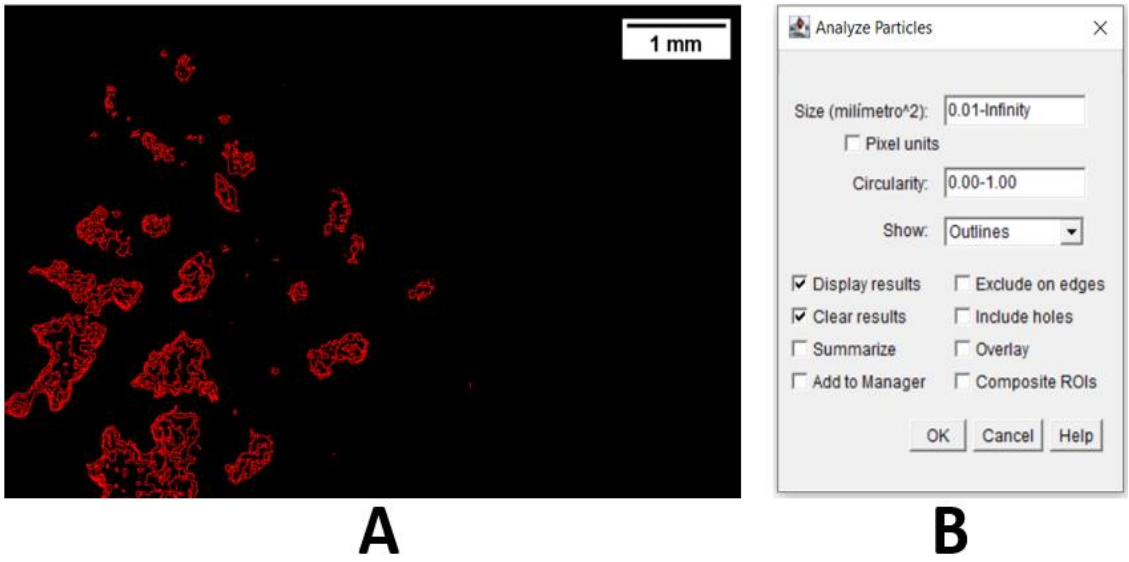
Figura 15. Uso do *plug-in* IsoPhotContour2: (A) interface do IsoPhtoContour2, ilustrando como ocorre a determinação dos parâmetros (cores das linhas, níveis de profundidade, fundo preto); e (B) imagem final (IsoPhot), com fundo preto e as linhas coloridas em destaque, diferenciando os níveis de profundidades da imagem.



Inicialmente foram realizadas simulações utilizando as imagens da CAM submetidas aos controles positivo e negativo, a fim de se padronizar os níveis de profundidades a serem considerados na análise. A faixa de profundidade estabelecida foi de 25 px a 45 px, considerando que abaixo de 25 px, o *plug-in* destacava regiões de sombra na imagem, e, acima de 45 px, destacava o contorno de vasos sanguíneos.

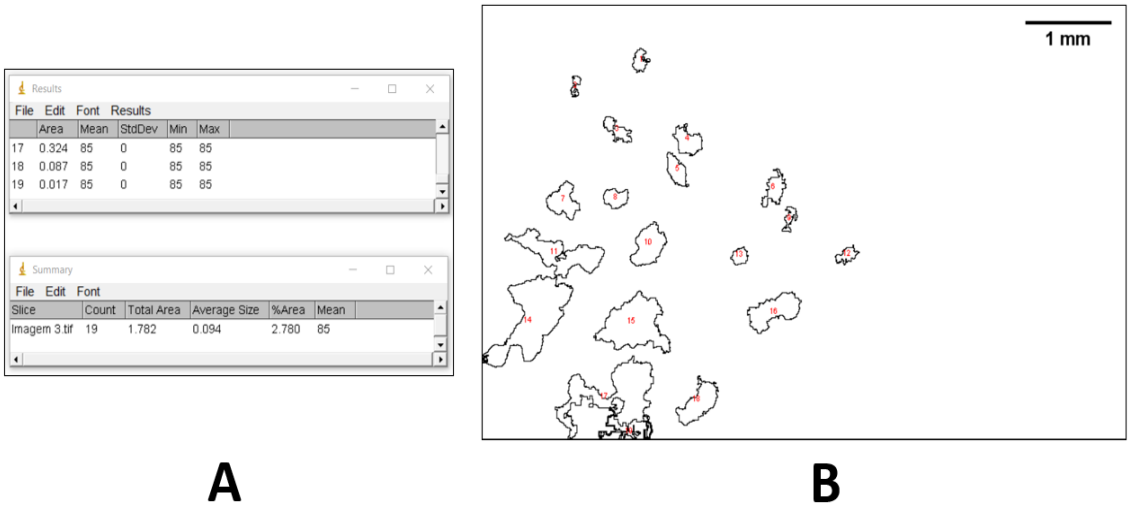
Realizou-se então o ajuste automático do limiar de cor das imagens, o que resultou na modificação automática de todas as cores para o vermelho, conforme a **Figura 16A**. Em seguida, mensurou-se o número de partículas sinalizadas nas imagens e o valor de suas áreas, a partir de parâmetros pré-estabelecidos (**Figura 16B**), 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^2, a fim de favorecer a sinalização somente de coágulos com dimensões identificáveis a olho nu.

Figura 16. Ajuste do limiar de cor das imagens e mensuração do número de partículas delimitadas: (A) ajuste automático do limiar de corda imagem; e (B) interface do *ImageJ*, mostrando como ocorre a determinação dos parâmetros para mensurar o número e a área das partículas (coágulos extravasculares).



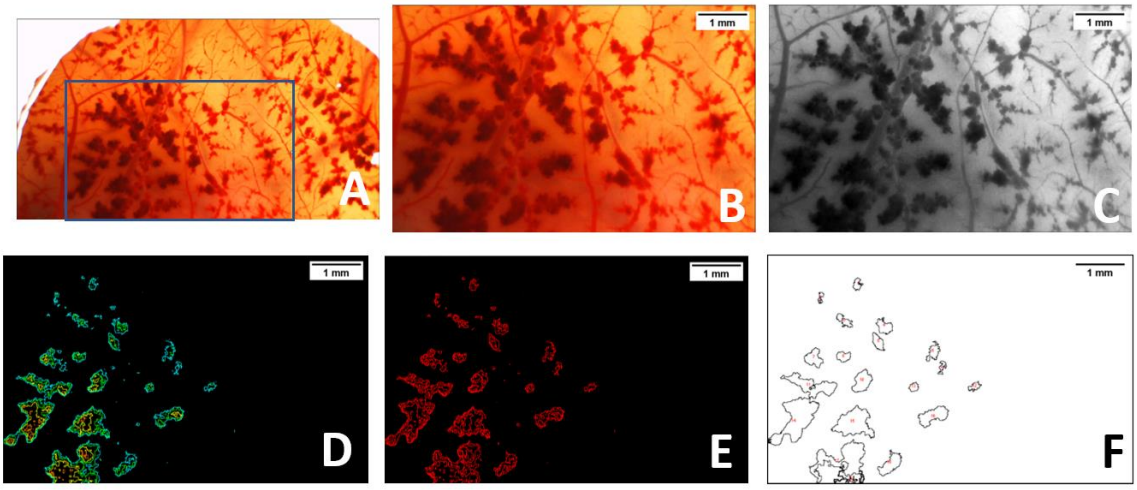
O programa gerou como resultado da análise das partículas, um documento contendo o número de partículas selecionadas e o valor de suas respectivas áreas, em mm (**Figura 17A**). Além disso, também gerou uma nova imagem (**Figura 17B**), apresentando as partículas sinalizadas e enumeradas segundo o arquivo mencionado anteriormente.

Figura 17. Análise das partículas (coágulos extravasculares) presentes nas imagens: (A) interface do *ImageJ*, evidenciando a forma como os resultados da análise são fornecidos; e (B) nova imagem gerada a partir da análise das partículas.



Para cada formulação-teste, foram analisadas 8 imagens da CAM submetidas aos tratamentos, incluindo os controles positivo e negativo. As etapas necessárias para analisar o número e área referentes aos coágulos extravasculares presentes nas imagens da CAM submetidas aos diferentes tratamentos estão resumidas na **Figura 18**.

Figura 18. 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*.



Durante a aplicação das formulações-tese sobre a CAM, alguns cuidados foram necessários para garantir a correta identificação dos coágulos extravasculares a partir da análise proposta utilizando o programa *ImageJ*, como por exemplo, evitar a aplicação das substâncias-teste e o registro de suas imagens em áreas de sombreamento (causado pela casca), pois essas regiões podem gerar resultados falsos positivos por apresentarem valores de *pixels* semelhantes aos das áreas de coágulos extravasculares; ajustar corretamente o foco do estereomicroscópio antes de registrar as imagens da CAM submetidas aos tratamentos, pois o valor de *pixels* associado às áreas de coágulos extravasculares pode sofrer alterações, comprometendo a confiabilidade da análise.

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.

4.6. Eutanásia dos embriões

Todos os ovos que foram excluídos durante o período experimental ou após o término dos experimentos foram submetidos à eutanásia, seguindo-se as normas da AVMA *Guidelines for the Euthanasia of Animals* (2020), por meio de congelamento a -20 ºC e posterior descarte.

4.7. Análise estatística

A análise das imagens da CAM submetidas aos tratamentos foi realizada por dois avaliadores independentes que atribuíram pontuações aos efeitos irritantes de acordo com o método preconizado no protocolo DB-ALM N°96. Inicialmente foi verificado a confiabilidade Inter examinador, considerando os valores finais dos efeitos (hemorragia, lise e coagulação) em cada réplica e as pontuações finais das substâncias obtidas a partir da análise visual dos dois avaliadores, utilizando o coeficiente de concordância Kappa (Viera e Garrett, 2005). A confiabilidade relativa Inter examinador dos valores finais dos efeitos e as pontuações finais utilizadas para classificar as substâncias foi estimada usando o coeficiente de correlação intraclasse (ICC, na siga em inglês) e seu intervalo de confiança (IC) de 95%. A magnitude do ICC foi classificada como ruim (<0,4), razoável (0,4 - 0,59), boa (0,6 - 0,75) ou

excelente (> 0,75) (Shrout e Fleiss, 1979). Os IC 95% não sobrepostos foram considerados significativamente diferentes (Costa, 2019).

A quantidade de coágulos extravasculares identificados nas imagens da CAM submetidas aos tratamentos identificada visualmente foi comparada àquela obtida pela análise com o programa *ImageJ* utilizando a análise de regressão linear simples para investigar a relação entre as variáveis "coágulos-VIS" e "coágulos-*ImageJ*". O modelo utilizado pode ser representado matematicamente como:

$$\text{coágulos-VIS} = \beta 0 + \beta 1 * \text{coágulos-}ImageJ + \varepsilon,$$

onde “coágulos-VIS**”** é a variável dependente que representa o número de coágulos extravasculares encontrados nas imagens a partir da análise visual humana, “coágulos-*ImageJ***”** é a variável independente que representa o número de coágulos extravasculares identificados a partir da análise das imagens pelo programa *ImageJ*, β0 e β1 são os coeficientes de intercepto e inclinação, respectivamente, e ε é o termo de erro aleatório. Em seguida, uma análise de modelos mistos generalizados foi realizada a fim de obter a correlação e distribuição dos dados obtidos nas duas formas de avaliação. Nesta etapa, foram excluídos os dados referentes às análises do controle negativo, por estes apresentarem, de forma unânime, valor 0, indicando ausência dos efeitos irritantes, tanto na análise visual humana quanto na análise pelo *ImageJ*.

Para a variável "coágulos-*ImageJ*", que representou o número de coágulos extravasculares identificados pelo programa, foi utilizada a distribuição de Poisson. O modelo utilizado pode ser representado matematicamente como:

$$\log(E(y)) = \beta 0 + \beta 1 * \text{trat} + \beta 2 * \text{exp} + \beta 3 * \text{avaliador} + \varepsilon,$$

onde E(y) é o valor esperado da variável "coágulos-*ImageJ*", “trat” é a variável categórica que representa o tratamento, “exp” é a variável categórica que representa o experimento, “avaliador” é a variável categórica que representa o avaliador, β0, β1, β2 e β3 são os coeficientes a serem estimados e ε é o termo de erro. A comparação entre os números de coágulos identificados pelo *ImageJ* nas imagens da CAM submetidas aos tratamentos com as substâncias-teste foi realizada utilizando o teste t de *Student*, com um nível de significância estabelecido em $p<0.05$.

Em todas as análises, a variável "tratamentos" foi considerada como variável categórica, e os efeitos aleatórios foram modelados para “experimento(avaliador)". Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (*Statistical Analysis System*, versão 9.4).

5 RESULTADOS

5.1. Estudo de confiabilidade

A confiabilidade Inter examinador para avaliação dos efeitos foram: hemorragia (kappa=0,91), lise (kappa=0,45) e coagulação (kappa=0,83) ambos com intervalo de confiança (IC) de 95% e p<0,001. Isso mostra que houve uma boa confiabilidade entre as pontuações atribuídas pelos dois avaliadores aos efeitos de hemorragia e coagulação, diferentemente da lise dos vasos, cujo resultado de confiabilidade foi inferior aos dos demais efeitos. Já a confiabilidade Inter examinador para as pontuações finais das substâncias-teste foi de kappa=0,92, com IC de 95% e p<0,001, sendo considerado um resultado de alta confiabilidade.

5.2. Toxicidade das formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico de acordo com protocolo HET-CAM

As **Figuras 19** e **20** ilustram imagens da CAM registradas após as aplicações dos controles negativo e positivo e dos anestésicos tópicos, respectivamente. É possível verificar que a presença ou ausência de efeitos, bem como sua intensidade variou de acordo com a substância em teste.

Figura 19. Aplicação dos controles negativo e positivo sobre a CAM. (1) Controle negativo e (2) controle positivo; sendo (A) imagem inicial, obtida previamente às aplicações, (B) imagem obtida após a aplicação das formulações sobre a CAM.

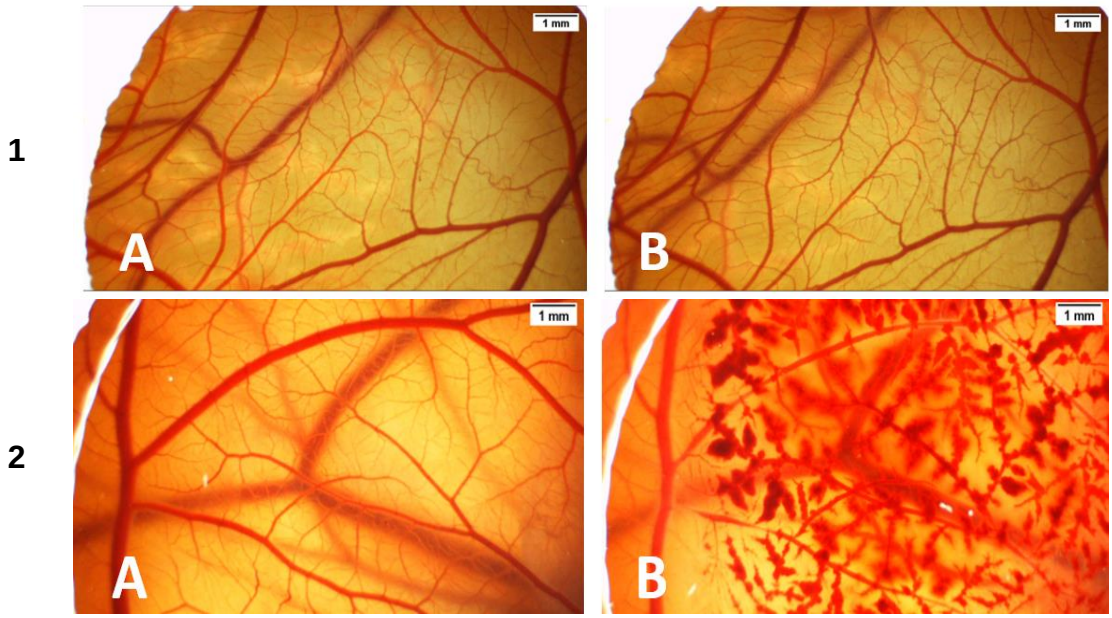
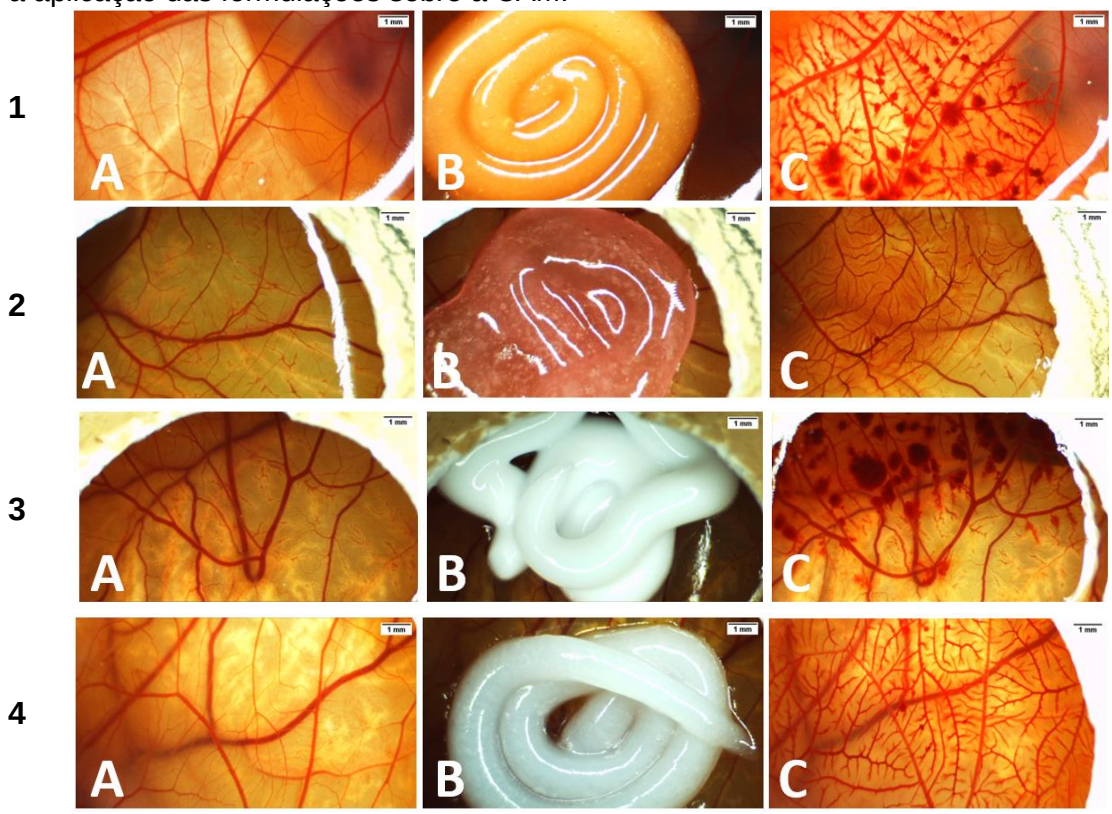


Figura 20. Aplicação das formulações comerciais de anestésicos tópicos de uso odontológico sobre a CAM. (1) Lidocaína®, (2) Benzotop®, (3) EMLA® e (4) Labcaína®; sendo **(A)** imagem

inicial, **(B)** imagem obtida durante a aplicação das formulações semissólidas e **(C)** imagem após a aplicação das formulações sobre a CAM.



A **Tabela 3** apresenta a classificação das formulações quanto ao potencial de toxicidade de acordo com o protocolo HET-CAM obtidos a partir da análise realizada por dois avaliadores. As formulações avaliadas apresentaram a mesma classificação nas quatro réplicas, com exceção do controle positivo, cuja classificação final variou entre “moderadamente irritante” e “irritante”. Ambos os avaliadores classificaram as formulações comerciais como “moderadamente irritante” e o controle negativo como “não-irritante”.

Tabela 3. Classificações finais das substâncias-teste a partir da análise visual realizada por dois avaliadores.

Substância-teste	Réplica	Avaliador	Pontuações finais das réplicas	Classificação final da substância-teste
Controle negativo	1	1	0	Não-irritante
	1	2	0	Não-irritante
	2	1	0	Não-irritante
	2	2	0	Não-irritante
	3	1	0	Não-irritante
	3	2	0	Não-irritante

	4	1	0	Não-irritante
	4	2	0	Não-irritante
Controle positivo	1	1	12	Moderadamente irritante
	1	2	14	Irritante
	2	1	12	Moderadamente irritante
	2	2	15	Irritante
	3	1	13	Irritante
	3	2	16	Irritante
	4	1	12	Moderadamente irritante
	4	2	12	Moderadamente irritante
Benzotop®	1	1	7	Moderadamente irritante
	1	2	6	Moderadamente irritante
	2	1	6	Moderadamente irritante
	2	2	6	Moderadamente irritante
	3	1	6	Moderadamente irritante
	3	2	6	Moderadamente irritante
	4	1	6	Moderadamente irritante
	4	2	6	Moderadamente irritante
EMLA®	1	1	7	Moderadamente irritante
	1	2	12	Moderadamente irritante
	2	1	9	Moderadamente irritante
	2	2	8	Moderadamente irritante
	3	1	7	Moderadamente irritante
	3	2	7	Moderadamente irritante
	4	1	9	Moderadamente irritante
	4	2	8	Moderadamente irritante
Lidocaína®	1	1	7	Moderadamente irritante
	1	2	7	Moderadamente irritante
	2	1	6	Moderadamente irritante

	2	2	8	Moderadamente irritante
	3	1	7	Moderadamente irritante
	3	2	7	Moderadamente irritante
	4	1	6	Moderadamente irritante
	4	2	7	Moderadamente irritante
Labcaína®	1	1	6	Moderadamente irritante
	1	2	8	Moderadamente irritante
	2	1	6	Moderadamente irritante
	2	2	6	Moderadamente irritante
	3	1	6	Moderadamente irritante
	3	2	7	Moderadamente irritante
	4	1	6	Moderadamente irritante
	4	2	6	Moderadamente irritante

5.3. Confirmação da identificação das áreas de coágulos extravasculares das imagens realizada pelo programa *ImageJ*

A **Tabela 4** ilustra a quantidade de coágulos encontrados nas imagens da CAM submetidas aos diferentes tratamentos a partir do programa *ImageJ* e da contagem visual.

Tabela 4. Quantidade de coágulos extravasculares encontrados nas imagens da CAM submetidas aos diferentes tratamentos a partir da análise visual e do programa *ImageJ*.

Substância	Réplica	Ovo	N° de coágulos extravasculares - Análise *ImageJ*	N° de coágulos extravasculares – Análise humana
Controle Negativo	1	1	0	0
		2	0	0
	2	1	0	0
		2	0	0
	3	1	0	0
		2	0	0
	4	1	0	0
		2	0	0
	1	1	33	42

		2	38	55
Controle Positivo	2	1	10	31
		2	18	41
	3	1	10	42
		2	19	32
	4	1	12	7
		2	7	14
Benzotop®	1	1	0	0
		2	4	3
	2	1	0	0
		2	0	0
	3	1	0	0
		2	0	0
	4	1	0	0
		2	0	0
EMLA®	1	1	18	25
		2	3	6
	2	1	18	18
		2	8	17
	3	1	2	7
		2	0	3
	4	1	8	24
		2	0	1
Lidocaína®	1	1	0	7
		2	2	3
	2	1	2	2
		2	0	6
	3	1	0	2
		2	0	0
	4	1	2	3
		2	0	0
Labcaína®	1	1	0	0
		2	0	2
	2	1	0	1
		2	1	8
	3	1	3	8
		2	0	3
	4	1	0	8
		2	0	0

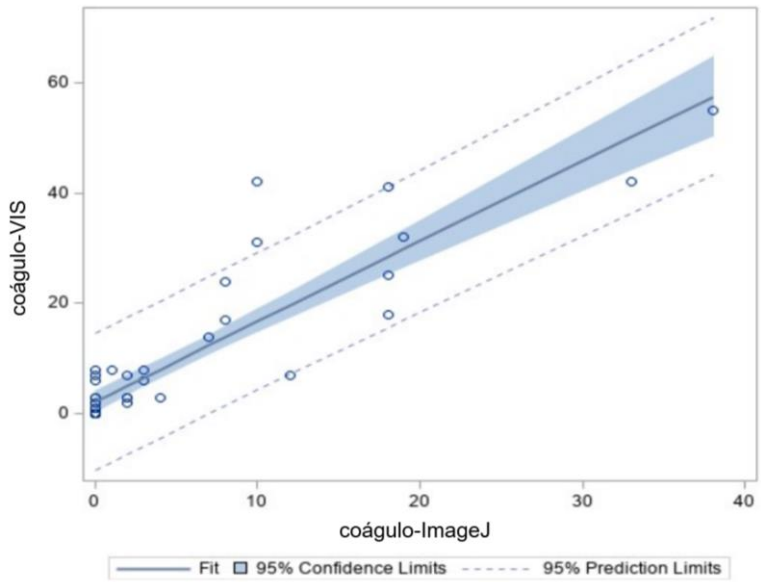
A equação obtida a partir da análise de regressão linear simples, utilizando o número de coágulos encontrados a partir das análises pelo programa *ImageJ* e pelo

avaliador, sugere que a variável "coágulo-VIS" pode ser prevista utilizando a variável "coágulo-*ImageJ*" conforme ilustra a equação abaixo (coeficiente de determinação R^2 = 0.81):

pred(coágulo-VIS) = 2.16371 +1.45478 * coágulo-*ImageJ*.

O coeficiente de determinação mede a proporção da variabilidade na variável dependente (coágulo-VIS) que pode ser explicada pela variável independente (coágulo-*ImageJ*). O valor de R^2 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 21**.

Figura 21. 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.



5.4. Toxicidade das formulações avaliadas utilizando o programa *ImageJ*

A **Tabela 5** ilustra a quantidade de coágulos mensurados nas imagens da CAM submetidas aos diferentes tratamentos utilizando o programa *ImageJ*. O controle positivo e a formulação comercial EMLA® apresentaram maior número de coágulos quando comparadas às demais formulações ($p<0,05$), consequentemente foram mais

tóxicas que as demais formulações avaliadas. Não houve diferença significativa entre as demais formulações ($p>0,05$).

Tabela 5. 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[a]	14,21
EMLA®	7,40 [a]	3,55
Lidocaína®	0,63 [b]	0,48
Labcaína®	0,45 [b]	0,32
Benzotop®	0,39 [b]	0,28

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível verificar que o modelo da CAM de embrião de galinha empregando-se o protocolo DB-ALM N°96 demonstrou ser uma ferramenta viável para a avaliação da toxicidade de formulações de anestésicos tópicos utilizados na odontologia, o que torna um modelo *in vivo* valioso durante a avaliação da toxicidade de novas formulações, oferecendo uma abordagem prática e de baixo custo, além de ser uma alternativa ao uso de animais.

Considerando o protocolo escolhido para a realização deste estudo, as substâncias-controle positivo e negativo empregadas (cloreto de sódio a 0,9% e o hidróxido de sódio a 0,1 mol/L ou 0,1 N) são tipicamente as mesmas utilizadas na maioria dos protocolos HET-CAM descritas na literatura (Fraguas-Sánchez *et al.*, 2022). Os resultados de toxicidade obtidos com esses controles no presente estudo, permitiram confirmar que o modelo foi realizado corretamente, tendo em vista que essas soluções apresentaram respostas semelhantes (não-irritante e irritante, respectivamente) às já descritas na literatura utilizando o mesmo protocolo (Ma *et al*., 2020; Rivero *et al*., 2021).

Vale ressaltar que não foi realizado um controle negativo com uma formulação semissólida sem anestésico local tendo em vista que as formulações anestésicas avaliadas são formulações comerciais de diferentes composições farmacêuticas sem descrição exata fornecida pelos fabricantes. Assim, optou-se pela escolha de um único controle negativo utilizando a solução de cloreto de sódio, que é tipicamente empregada na maioria dos protocolos HET-CAM para avaliação da toxicidade de outras formulações tópicas (Fraguas-Sánchez *et al.*, 2022).

Destaca-se que, embora tenham utilizado outros protocolos HET-CAM (Luepke, 1985; 1985; INVITTOX, 1992), outros estudos avaliaram a toxicidade do cloreto de sódio e o classificaram como "não irritante" (Mahboobian *et al*., 2019; Zafar *et al*., 2022), corroborando os resultados do presente estudo. Esses resultados são esperados tendo em vista que o NaCl a 0,9% é uma solução isotônica e não altera o volume das células (Goodhead e MacMillan, 2017), e, portanto, é esperado que não cause reações nos vasos sanguíneos da CAM. Já o controle positivo, é uma solução já conhecida por causar irritação significativa nas estruturas da CAM, resultando em hemorragia, lise de vasos e coagulação acentuadas (Alany *et al.*, 2006; Lorenzo-Veiga

et al., 2019; Alsaidan *et al.*, 2022; Kassaee *et al.*, 2022), conforme observado no presente estudo.

A escolha de um protocolo específico utilizando o modelo da CAM do embrião de galinha para avaliar os efeitos irritantes de diferentes substâncias é extremamente complexa, devido à variedade metodológica dos protocolos descritos na literatura (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014), o que dificulta também a comparação entre os resultados. Esses protocolos divergem quanto ao tempo de exposição da CAM aos tratamentos, a idade dos embriões, os tipos de efeitos irritantes avaliados, a estrutura química das substâncias investigadas, a metodologia de pontuação dos efeitos e a classificação final das substâncias (Bagley *et al*., 1991).

Dentre as opções de protocolos encontrados e considerando as propriedades das formulações testadas em nosso estudo, i.e. semissólidos, o protocolo DB-ALM N°96 foi selecionado tendo em vista que apresenta um método de análise viável para substâncias não-transparentes (ECVAM, 2007). Alguns protocolos, como o proposto por Luepke (1985), o protocolo do governo francês (1996) e o ICCVAM (2010), recomendam a avaliação dos efeitos irritantes a partir de pontuações pré-estabelecidas, atribuídas de acordo com o tempo em que os efeitos surgem. Já o protocolo INVITTOX N°47, recomenda como método de análise a identificação do momento exato em segundos em que os efeitos surgem na CAM a partir do início da aplicação das substâncias testadas e a aplicação dessa informação em uma fórmula matemática pré-estabelecida (INVITTOX, 1992). No entanto, as formulações de anestésicos tópicos avaliados neste estudo não são transparentes, impossibilitando a visualização contínua da CAM durante a sua exposição aos tratamentos e a constatação do surgimento dos efeitos irritantes.

Em acréscimo, tendo em vista a opacidade das formulações anestésicas deste estudo para avaliação dos efeitos sobre a CAM, é necessária a completa remoção das formulações para o registro dos efeitos irritantes. De uma maneira geral, as formulações-teste foram facilmente removidas com o enxágue de soro fisiológico, e não causaram alterações permanentes na cor da membrana. Essas são características essenciais que uma substância deve apresentar para ser testada neste modelo (ECVAM, 2007), viabilizando o uso do mesmo para a proposta do estudo.

Vale ressaltar que as formulações avaliadas no presente estudo também não poderiam ser submetidas a protocolos HET-CAM que apresentam como desfecho a avaliação da hiperemia dos vasos, tendo em vista as propriedades vasodilatadoras intrínsecas dos anestésicos locais (Malamed, 2021). Conforme já reportado anteriormente (Auerbach *et al*., 2000), qualquer substância capaz de promover vasodilatação tornaria visíveis os pequenos capilares que não eram detectáveis antes do tratamento. Isso reforça a escolha do protocolo DB-ALM N°96, que avalia apenas hemorragia, lise e coagulação dos vasos sanguíneos.

O critério de escolha das formulações comerciais avaliadas no presente estudo foi a popularidade dos anestésicos na clínica odontológica. Os anestésicos tópicos mais comumente utilizados são aqueles à base de benzocaína e lidocaína (Mundiya e Woodbine, 2022). Assim, foram selecionadas as formulações para uso tópico bucal disponíveis comercialmente, à base desses anestésicos locais: Benzotop® (benzocaína a 20%), Labcaína® (lidocaína a 5%) e Lidocaína® (lidocaína a 5%) registros na ANVISA (números de registros: 1017700270035, 141070056 e 1134301750013, respectivamente). Ainda, também foi utilizado a formulação comercial EMLA® (mistura eutética de lidocaína a 2,5% e prilocaína a 2,5% (número de registro da ANVISA: 137640156), pois apesar de não ser uma formulação indicada para uso em mucosa oral, é amplamente utilizada pelos dentistas e considerada uma das formulações mais eficazes (McMillan *et al*., 2000; Pandit et al., 2010; Derman et al., 2014; Boyce *et al*., 2016; Daneshkazemi *et al*., 2016).

Utilizando o método de avaliação visual proposto pelo protocolo utilizado, as diferentes formulações comerciais avaliadas sobre a CAM foram igualmente classificadas em “moderadamente irritante”, apesar de terem apresentado diferentes pontuações finais e, visualmente, terem diferido quanto à gravidade dos efeitos encontrados. Isso pode ser atribuído à amplitude de valores utilizados na classificação das substâncias e a subjetividade dos resultados (Hagino *et al*., 1991; Vinardell e García, 2000). Embora apresentem boa reprodutibilidade e confiabilidade, os protocolos HET-CAM carecem de resultados quantitativos (Tavakoli *et al*., 2021), impedindo a distinção entre tratamentos avaliados, conforme também observado no presente estudo.

Alguns estudos têm explorado o uso de programas computacionais para analisar características da CAM por meio de imagens, visando quantificar eventos

específicos, como a angiogênese por exemplo, e reduzir a subjetividade das análises (Zudaire *et al*., 2011; Shi *et al*., 2014; Marinaccio e Ribatti, 2015; Baldavira *et al*., 2021; Annese *et al*., 2023). Nesse sentido, a segunda hipótese do presente estudo, era que, considerando que o protocolo HET-CAM testado permitia avaliar a toxicidade de formulações de anestésicos tópicos usados em odontologia, seria viável realizar a análise quantitativa das imagens utilizando um programa computacional, neste caso, o *ImageJ*, a fim de se obter a quantificação dos efeitos irritantes vasculares das formulações avaliadas.

Nosso estudo demonstrou que o programa computacional *ImageJ* permitiu realizar a análise quantitativa da coagulação extravascular decorrente da aplicação dos anestésicos tópicos odontológicos, confirmando a hipótese apresentada. Utilizando a metodologia de análise com o programa proposta, foi possível distinguir a toxicidade entre as formulações anestésicas, diferença não detectada empregando o protocolo original empregado. Outros estudos já demonstraram que este programa de análise de imagem de código aberto é viável para realização de diversas aplicações de análise de imagem em pesquisa científica (Schindelin *et al*., 2015), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Destaca-se que o programa *ImageJ* oferece uma ampla gama de recursos, incluindo componentes relevantes para desenvolvedores e uma extensa coleção de *plug-ins* voltados para o usuário (Schroeder *et al*., 2021). Para nossa análise, utilizamos o *plug-in* IsoPhotCountour2, que permitiu sinalizar objetos ou estruturas presentes nas imagens com base nos valores dos *pixels* (px), conforme já reportado em outros estudos que utilizaram o mesmo *plug-in* (Filadi *et al*., 2015; Qin *et al*., 2020; Wang *et al*., 2020).

O efeito irritante analisado por este programa no presente estudo foi a coagulação, tendo em vista que foi o único efeito distinguível e delimitável pelo *ImageJ*, quando comparado aos demais efeitos (hemorragia e lise), permitindo sua quantificação por meio da metodologia proposta. Entretanto, McKenzie *et al*. (2015) demonstraram ser possível empregar o *ImageJ* para quantificar a hemorragia nas imagens de CAM tratadas com uma solução oftálmica de cisteamina utilizando outro método de tratamento das imagens. Considerando que o efeito de coagulação foi um dos efeitos determinantes na classificação das formulações utilizando o protocolo

HET-CAM 96, o método proposto foi suficiente para identificar a capacidade irritante das formulações de anestésicos tópicos utilizadas neste estudo.

Utilizando o método proposto com o *ImageJ*, foi possível verificar que, das formulações de anestésicos tópicos comerciais avaliadas no presente estudo, o EMLA® foi a formulação mais irritante para a CAM, em comparação às demais formulações anestésicas. Curiosamente, esta formulação foi capaz de induzir ulceração em mucosa bucal de quatro voluntárias saudáveis após aplicação por 30 minutos (Franz-Montan *et al.*, 2008). Ressalta-se que não há relatos clínicos semelhantes para os demais anestésicos avaliados no presente estudo. Possivelmente, essas diferenças quanto à toxicidade das formulações observadas no presente estudo podem estar relacionadas às suas variações de pH: sendo o EMLA® a única formulação com característica altamente alcalina (pH=9,0) e as demais formulações estarem mais próximas ao pH fisiológico (pH= 6,2 a 7,0).

É conhecido que a CAM é extremamente sensível a alterações ambientais, como variações na tensão de oxigênio e pH (Ribatti, 2016). A menor variação de pH pode ser citotóxica para as células endoteliais da CAM, por exemplo, quando cultivadas *in vitro* (Auerbach *et al.*, 2000). Esses fatores podem ter contribuído para o EMLA apresentassem um maior número de coágulos, uma vez que esta formulação apresentou o pH mais elevado dentre as formulações testadas, resultando em alterações morfológicas mais pronunciadas nas células da CAM.

Apesar do método proposto utilizado um programa computacional ter permitido quantificar efeitos irritantes dos anestésicos tópicos odontológicos comerciais avaliados, também apresenta suas 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. Outra dificuldade durante o desenvolvimento da metodologia proposta foi a ocorrência de áreas de sombreamento da casca diretamente na CAM. Essas dificuldades 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.

Finalmente, o uso do programa computacional *ImageJ* proposto neste estudo para avaliar a toxicidade dos anestésicos tópicos odontológicos à CAM apresentou como principais vantagens a redução do viés inerente de uma análise subjetiva humana e a obtenção de resultados quantitativos quando comparado ao método tradicional proposto no protocolo HET-CAM 96,conforme relatado por McKenzie *et al*. (2015).

7 CONCLUSÃO

O modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha foi viável como método de avaliação da toxicidade de anestésicos tópicos de uso odontológico, entretanto o protocolo não permitiu distinguir a toxicidade entre as formulações avaliadas. A avaliação das imagens da CAM submetidas aos tratamentos com as formulações anestésicas a partir de um programa computacional 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.

8 REFERÊNCIAS*

Alany RG, Rades T, Nicoll J, Tucker IG, Davies NM. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. J Control Release. 2006 Mar 10;111(1-2):145-52. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.11.020.

Alsaidan OA, Zafar A, Yasir M, Alzarea SI, Alqinyah M, Khalid M. Development of Ciprofloxacin-Loaded Bilosomes In-Situ Gel for Ocular Delivery: Optimization, In-Vitro Characterization, Ex-Vivo Permeation, and Antimicrobial Study. Gels. 2022 Oct 25;8(11):687. doi: 10.3390/gels8110687.

Ames JJ, Henderson T, Liaw L, Brooks PC. Methods for Analyzing Tumor Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane Model. Methods Mol Biol. 2016;1406:255-69. doi: 10.1007/978-1-4939-3444-7_22.

Annese T, Tamma R, Ribatti D. IKOSA® CAM Assay Application to Quantify Blood Vessels on Chick Chorioallantoic Membrane (CAM). Methods Mol Biol. 2023;2572:129-139. doi: 10.1007/978-1-0716-2703-7_10.

Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, Shinners BL. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. Cancer Metastasis Rev. 2000;19(1-2):167-72. doi: 10.1023/a:1026574416001.

Bagley DM, Rizvi PY, Kong BM, De Salva SJ. (1991). Factors affecting use of the hen's egg chorioallantoic membrane as a model for predicting eye irritation potential: I. Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology, 10(1-2), 95–104. doi:10.3109/15569529109057906.

Baldavira CM, Gomes LF, Cruz LT, Maria DA, Capelozzi VL. In vivo evidence of angiogenesis inhibition by β2-glycoprotein I subfractions in the chorioallantoic membrane of chicken embryos. Braz J Med Biol Res. 2021 Jan 15;54(3):e10291. doi: 10.1590/1414-431X202010291.

Batista da Silva C, Volpato MC, Muniz BV, Dos Santos CP, Serpe L, Ferreira LEN et al. Promising potential of articaine-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapules for intraoral topical anesthesia. PLoS One. 2021 Feb 11;16(2):e0246760. doi: 10.1371/journal.pone.0246760.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Batista-Duharte A, Jorge Murillo G, Pérez UM, Tur EN, Portuondo DF, Martínez BT, Téllez-Martínez D, Betancourt JE, Pérez O. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants. Int J Toxicol. 2016 Nov;35(6):627-633. doi: 10.1177/1091581816672187.

Bellairs R, Osmond M. Atlas of chick development. Elsevier, 2005.

Boyce RA, Kirpalani T, Mohan N. Updates of Topical and Local Anesthesia Agents. Dent Clin North Am. 2016 Apr;60(2):445-71. doi: 10.1016/j.cden.2015.12.001. Erratum in: Dent Clin North Am. 2017 Apr;61(2):xiii.

Butler KS, Brinker CJ, Leong HS. Bridging the In Vitro to In Vivo gap: Using the Chick Embryo Model to Accelerate Nanoparticle Validation and Qualification for In Vivo studies. ACS Nano 2022 16 (12), 19626-19650. DOI: 10.1021/acsnano.2c03990.

Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone, FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas [online]. 2004, v. 40, n. 3.

Cimpean AM, Ribatti D, Raica M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. Angiogenesis. 2008;11(4):311-9. doi: 10.1007/s10456-008-9117-1.

Chen L, Wang S, Feng Y, Zhang J, Du Y, Zhang J, Ongeval CV, Ni Y, Li Y. Utilisation of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model Platform for Imaging-Navigated Biomedical Research. Cells. 2021 Feb 22;10(2):463. doi: 10.3390/cells10020463.

Corrado, M. C. et al. Potencial tóxico de dentifrícios: avaliação comparativa entre o teste de irritação da mucosa oral em hamsters e o método HET-CAM. Analytica São Paulo, v. 11, n. 61, p. 48-57, out./nov. 2012.

Costa YM, de Araújo-Júnior ENS, Fiedler LS, de Souza PRJ, Silva LLCP, Ferreira DMAO et al. Reproducibility of quantitative sensory testing applied to musculoskeletal orofacial region: Site and sex differences. European journal of pain (London, England). 2019, 23(1), 81–90.

Daneshkazemi A, Abrisham SM, Daneshkazemi P, Davoudi A. The efficacy of eutectic mixture of local anesthetics as a topical anesthetic agent used for dental procedures:

A brief review. Anesth Essays Res. 2016 Sep-Dec;10(3):383-387. doi: 10.4103/0259-1162.172342.

DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu HC, Harrington DA, Yu W, Lewis MT, Sikora AG. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. Am J Cancer Res. 2018 Aug 1;8(8):1642-1660.

De Magalhaes N, Liaw LL, Berns M. An instruction on the in vivo shell-less chorioallantoic membrane 3-dimensional tumor spheroid model. Cytotechnology, v. 62, p. 279-283, 2010.

Derman SH, Lowden CE, Kaus P, Noack MJ. Pocket-depths-related effectiveness of an intrapocket anaesthesia gel in periodontal maintenance patients. Int J Dent Hyg. 2014 May;12(2):141-4. doi: 10.1111/idh.12036.

Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP, Dünker N. Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. J Vis Exp. 2009 Nov 30;(33):1620. doi: 10.3791/1620.

Draize J, Woodard G, Calvery H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics. 1944;82:377–390.

ECVAM DB-ALM. Protocol No. 96: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). 2007. Disponível em: http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrcopendata/EURLECVAM/datasets/DBALM/VER20/online/DBALM_docs/96_P_Hen's%20Egg%20Test%20on%20the%20Chorioallantoic%20Membrane%20(HET-CAM).pdf

Ferreira LE, Muniz BV, Dos Santos CP, Volpato MC, de Paula E, Groppo FC. Comparison of liposomal and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin-lidocaine on cell viability and inflammatory response in human keratinocytes and gingival fibroblasts. J Pharm Pharmacol. 2016 Jun;68(6):791-802. doi: 10.1111/jphp.12552.

Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 28;112(17):E2174-81. doi: 10.1073/pnas.1504880112.

Fraguas-Sánchez AI, Martín-Sabroso C, Torres-Suárez AI. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Model: A Research Approach for Ex Vivo and In Vivo Experiments. Curr Med Chem. 2022;29(10):1702-1717. doi: 10.2174/0929867328666210625105438.

France, 26 Dec. 1996. ARRETˆ E ´ du 29 novembre 1996 relatif aux m´ethodes officielles d'analyse n´ecessaires aux controles ˆ des cosm´etiques produits. J. Off. Republ. Française 19137–19138. Paris, n. 300.

Franz-Montan M, Ribeiro LNM, Volpato MC, et al. (2017). Recent advan-ces and perspectives in topical oral anesthesia. Expert Opin DrugDeliv 14:673–84.

Freires IA, Sardi JC, de Castro RD, Rosalen PL. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? Pharm Res. 2017 Apr;34(4):681-686. doi: 10.1007/s11095-016-2069-z.

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: 10.1155/2010/940741.

Gabrielli MG, Materazzi G, Cox JV, Menghi G. Specialised cell types in the chorioallantoic membrane express carbonic anhydrase during chick embryogenesis. J Anat. 2001 Feb;198(Pt 2):229-38. doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19820229.x.

Gatne DP, Mungekar S, Addepalli V, Mohanraj K, Ghone SA, Rege NN. Development of collateral vessels: A new paradigm in CAM angiogenesis model. Microvasc Res. 2016 Jan;103:11-3. doi: 10.1016/j.mvr.2015.09.002.

Goergen N, Wojcik M, Drescher S, Pinnapireddy SR, Brüßler J, Bakowsky U, Jedelská J. The Use of Artificial Gel Forming Bolalipids as Novel Formulations in Antimicrobial and Antifungal Therapy. Pharmaceutics. 2019 Jul 1;11(7):307. doi: 10.3390/pharmaceutics11070307.

Gold MS, Reichling DB, Hampl KF, Drasner K, Levine JD. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. J Pharmacol Exp Ther. 1998 May;285(2):413-21.

Goodhead LK, MacMillan FM. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. Adv Physiol Educ. 2017 Jun 1;41(2):298-305. doi: 10.1152/advan.00083.2016. Erratum in: Adv Physiol Educ. 2018 Sep 1;42(3):527.

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.

Herrmann A, Moss D, Sée V. The Chorioallantoic Membrane of the Chick Embryo to Assess Tumor Formation and Metastasis. Methods Mol Biol. 2016;1464:97-105. doi: 10.1007/978-1-4939-3999-2_9.

ICCVAM, 2010. Background Review Document Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. National Toxicology Program.

INVITTOX, 1992. Protocol No. 47: HET-CAM Test. http://ecvam-sis.jrc.it/invittox/published/indexed_47.html.

Kaewbanjong J, Wan Sia Heng P, Boonme P. Clotrimazole microemulsion and microemulsion-based gel: evaluation of buccal drug delivery and irritancy using chick chorioallantoic membrane as the model. J Pharm Pharmacol. 2017 Dec;69(12):1716-1723. doi: 10.1111/jphp.12809.

Kassaee SN, Mahboobian MM. Besifloxacin-loaded ocular nanoemulsions: design, formulation and efficacy evaluation. Drug Deliv Transl Res. 2022 Jan;12(1):229-239. doi: 10.1007/s13346-021-00902-z.

Kennedy DC, Coen B, Wheatley AM, McCullagh KJA. Microvascular Experimentation in the Chick Chorioallantoic Membrane as a Model for Screening Angiogenic Agents including from Gene-Modified Cells. Int J Mol Sci. 2021 Dec 31;23(1):452. doi: 10.3390/ijms23010452.

Knight RB, Dvorcakova S, Luptakova L, Vdoviakova K, Petrilla V, Petrovova E. Evaluation of vasoactivity after haemotoxic snake venom administration. Toxicon. 2019 Feb;158:69-76. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.11.430.

Kishore AS, Surekha PA, Sekhar PV, Srinivas A, Murthy PB. Hen egg chorioallantoic membrane bioassay: an in vitro alternative to draize eye irritation test for pesticide screening. Int J Toxicol. 2008 Nov;27(6):449-53. doi: 10.1080/10915810802656996.

Kohl C, Aung T, Haerteis S, Ignatov A, Ortmann O, Papathemelis T. The 3D in vivo chorioallantoic membrane model and its role in breast cancer research. J Cancer Res Clin Oncol. 2022 May;148(5):1033-1043. doi: 10.1007/s00432-022-03936-z.

Komatsu A, Higashi Y, Matsumoto K. Various CAM tumor models. Enzymes. 2019;46:37-57. doi: 10.1016/bs.enz.2019.10.001.

Kilarski WW, Samolov B, Petersson L, Kvanta A, Gerwins P. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. Nature medicine, v. 15, n. 6, p. 657-664, 2009.

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.

Lee HS. Recent advances in topical anesthesia. J Dent Anesth Pain Med. 2016 Dec;16(4):237-244. doi: 10.17245/jdapm.2016.16.4.237.

Lee H, Min HS, Jang M, Kang G, Gong S, Lee C, Song YW, Jung UW, Lee S, Ryu HY, Yang H, Jung H. Lidocaine-loaded dissolving microneedle for safe local anesthesia on oral mucosa for dental procedure. Expert Opin Drug Deliv. 2023 Jun;20(6):851-861. doi: 10.1080/17425247.2023.2216450.

Lokman NA, Elder ASF, Ricciardelli C, Oehler MK. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. Int J Mol Sci. 2012;13(8):9959-9970. doi: 10.3390/ijms13089959.

Lorenzo-Veiga B, Sigurdsson HH, Loftsson T, Alvarez-Lorenzo C. Cyclodextrin⁻Amphiphilic Copolymer Supramolecular Assemblies for the Ocular Delivery of Natamycin. Nanomaterials (Basel). 2019 May 15;9(5):745. doi: 10.3390/nano9050745.

Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. Food Chem Toxicol. 1985 Feb;23(2):287-91. doi: 10.1016/0278-6915(85)90030-4.

Ma X, Wang H, Song Y, Pan Y. Skin irritation potential of cosmetic preservatives: An exposure-relevant study. J. Cosmet. Dermatol. 2020, 20, 195–203.

Mahboobian MM, Seyfoddin A, Aboofazeli R, Foroutan SM, Rupenthal ID. Brinzolamide-loaded nanoemulsions: ex vivo transcorneal permeation, cell viability and ocular irritation tests. Pharm Dev Technol. 2019 Jun;24(5):600-606. doi: 10.1080/10837450.2018.1547748.

Makanya AN, Dimova I, Koller T, Styp-Rekowska B, Djonov V. Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. PLoS One. 2016 Apr 5;11(4):e0152821. doi: 10.1371/journal.pone.0152821.

Malamed SF. Manual de Anestesia Local. Disponível em: Minha Biblioteca, (7th edição). Grupo GEN, 2021.

Marinaccio C, Ribatti D. A simple method of image analysis to estimate CAM vascularization by APERIO ImageScope programa. Int J Dev Biol. 2015;59(4-6):217-9. doi: 10.1387/ijdb.150025dr.

McKenzie B, Kay G, Matthews KH, Knott RM, Cairns D. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. Int J Pharm. 2015 Jul 25;490(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.023.

McMillan AS, Walshaw D, Meechan JG. The efficacy of Emla and 5% lignocaine gel for anaesthesia of human gingival mucosa. Br J Oral Maxillofac Surg. 2000 Feb;38(1):58-61. doi: 10.1054/bjom.1999.0143.

Meechan JG. Intra-oral topical anaesthetics: a review. J Dent. 2000 Jan;28(1):3-14. doi: 10.1016/s0300-5712(99)00041-x.

Merckx G, Tay H, Lo Monaco M, van Zandvoort M, De Spiegelaere W, Lambrichts I, Bronckaers A. Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue Engineering: Focus on Stem Cells. Tissue Eng Part B Rev. 2020 Dec;26(6):519-539. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0048.

Meyer O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. Toxicol Lett. 2003 Apr 11;140-141:21-30. doi: 10.1016/s0378-4274(02)00492-7.

Miebach L, Berner J, Bekeschus S. In ovo model in cancer research and tumor immunology. Front Immunol. 2022 Sep 29;13:1006064. doi: 10.3389/fimmu.2022.1006064.

Mirando AC, Abdi K, Wo P, Lounsbury KM. Assessing the effects of threonyl-tRNA synthetase on angiogenesis-related responses. Methods. 2017 Jan 15;113:132-138. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.11.007.

Mohammadi M, Elahimehr Z, Mahboobian MM. Acyclovir-Loaded Nanoemulsions: Preparation, Characterization and Irritancy Studies for Ophthalmic Delivery. Curr Eye Res. 2021 Nov;46(11):1646-1652. doi: 10.1080/02713683.2021.1929328.

Moreno-Jiménez I, Kanczler JM, Hulsart-Billstrom G, Inglis S, Oreffo ROC. * The Chorioallantoic Membrane Assay for Biomaterial Testing in Tissue Engineering: A Short-Term In Vivo Preclinical Model. Tissue Eng Part C Methods. 2017 Dec;23(12):938-952.

Mundiya J, Woodbine E. Updates on Topical and Local Anesthesia Agents. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2022 Feb;34(1):147-155. doi: 10.1016/j.coms.2021.08.003.

Nagai H, Tanoue Y, Nakamura T, Chan CJJ, Yamada S, Saitou M, Fukuda T, Sheng G. Mesothelial fusion mediates chorioallantoic membrane formation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2022 Dec 5;377(1865):20210263. doi: 10.1098/rstb.2021.0263.

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.

O'Dwyer J, Murphy R, González-Vázquez A, Kovarova L, Pravda M, Velebny V, Heise A, Duffy GP, Cryan SA. Translational Studies on the Potential of a VEGF Nanoparticle-Loaded Hyaluronic Acid Hydrogel. Pharmaceutics. 2021 May 22;13(6):779. doi: 10.3390/pharmaceutics13060779.

Palmeira-de-Oliveira R, Monteiro Machado R, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A. Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. ALTEX. 2018;35(4):495-503. doi: 10.14573/altex.1710091.

Pandit N, Gupta R, Chandoke U, Gugnani S. Comparative evaluation of topical and electronic anesthesia during scaling and root planing. J Periodontol. 2010 Jul;81(7):1035-40. doi: 10.1902/jop.2010.090702.

Parker RM, Browne WJ. The place of experimental design and statistics in the 3Rs. ILAR J. 2014;55(3):477-85. doi: 10.1093/ilar/ilu044.

Patel B, Das R, Gautam A, Tiwari M, Acharya S, Kumar S. Evaluation of vascular effect of arsenic using in vivo assays. Environ Sci Pollut Res Int. 2017 Jun;24(18):15521-15527. doi: 10.1007/s11356-017-9156-5.

Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhang J et al. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. Anesth Analg. 2009 Mar;108(3):997-1007. doi: 10.1213/ane.0b013e31819385e1.

Pochapski MT, Neto JL, Jassen JL, Farago PV, Santos FA. Effect of lidocaine- and prilocaine-based topical anesthetics on the inflammatory exudates in subcutaneous tissue of rats. Anesth Prog. 2012 Summer;59(2):57-61. doi: 10.2344/11-23.1.

Polláková M, Petrilla V, Andrejčáková Z, Petrillová M, Sopková D, Petrovová E. Spitting cobras: Experimental assay employing the model of chicken embryo and the chick chorioallantoic membrane for imaging and evaluation of effects of venom from African and Asian species (Naja ashei, Naja nigricollis, Naja siamensis, Naja sumatrana). Toxicon. 2021 Jan 15;189:79-90. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.10.025.

Ponce ML, Kleinmann HK. The chick chorioallantoic membrane as an in vivo angiogenesis model. Curr Protoc Cell Biol. 2003 May;Chapter 19:Unit 19.5. doi: 10.1002/0471143030.cb1905s18.

Qin, J., Guo, Y., Xue, B. et al. ER-mitochondria contacts promote mtDNA nucleoids active transportation via mitochondrial dynamic tubulation. Nat Commun 11, 4471 (2020). https://doi.org/10.1038/s41467-020-18202-4

Ranjan RA, Muenzner JK, Kunze P, Geppert CI, Ruebner M, Huebner H, Fasching PA, Beckmann MW, Bäuerle T, Hartmann A, Walther W, Eckstein M, Erber R,

Schneider-Stock R. The Chorioallantoic Membrane Xenograft Assay as a Reliable Model for Investigating the Biology of Breast Cancer. Cancers (Basel). 2023 Mar 10;15(6):1704. doi: 10.3390/cancers15061704.

Reis FPD, Rigo GV, Nogueira CW, Tasca T, Sari MHM, Cruz L. Locust Bean Gum Nano-Based Hydrogel for Vaginal Delivery of Diphenyl Diselenide in the Treatment of Trichomoniasis: Formulation Characterization and In Vitro Biological Evaluation. Pharmaceutics. 2022 Oct 3;14(10):2112. doi: 10.3390/pharmaceutics14102112.

Ribatti D, Frigeri A, Nico B, Nicchia GP, De Giorgis M, Roncali L, Svelto M. Aquaporin-1 expression in the chick embryo chorioallantoic membrane. Anat Rec. 2002 Oct 1;268(2):85-9. doi: 10.1002/ar.10123.

Ribatti D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. Int Rev Cell Mol Biol. 2008;270:181-224. doi: 10.1016/S1937-6448(08)01405-6.

Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. Exp Cell Res. 2014 Nov 1;328(2):314-24. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.010.

Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. Mech Dev. 2016 Aug;141:70-77. doi: 10.1016/j.mod.2016.05.003.

Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane patient-derived xenograft (PDX) model. Pathol Res Pract. 2023 Mar;243:154367. doi: 10.1016/j.prp.2023.154367.

Rivero MN, Lenze M, Izaguirre M, Pérez Damonte SH, Aguilar A, Wikinski S, Gutiérrez ML. 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 Chem Toxicol. 2021 Jul;153:112229. doi: 10.1016/j.fct.2021.112229.

Russell WMS; Burch RL. The principles of humane experimental technique. Methuen, 1959.

Sabaner MC, Duman R, Vurmaz A, Ertekin T. Effects of topical prostaglandin drops on angiogenesis in an in ovo chick chorioallantoic membrane model. Cutan Ocul Toxicol. 2021 Mar;40(1):54-60. doi: 10.1080/15569527.2021.1874009.

Samimi MS, Mahboobian MM, Mohammadi M. Ocular toxicity assessment of nanoemulsion in-situ gel formulation of fluconazole. Hum Exp Toxicol. 2021 Dec;40(12):2039-2047. doi: 10.1177/09603271211017314.

Saw CL, Heng PW, Liew CV. Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review. Drug Dev Ind Pharm. 2008 Nov;34(11):1168-77. doi: 10.1080/03639040801974295.

Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. Mol Reprod Dev. 2015 Jul-Aug;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.

Sheng G, Foley AC. Diversification and conservation of the extraembryonic tissues in mediating nutrient uptake during amniote development. Ann N Y Acad Sci. 2012 Oct;1271(1):97-103. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06726.x.

Shi P, Hong J, Huang Y, Zhang Z, Zhang M, Zhang L. Automated computational framework of blood vessel quantification in chick chorioallantoic membrane angiogenesis. J Biomed Opt. 2014;19(10):106005. doi: 10.1117/1.JBO.19.10.106005.

Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. Psychological bulletin. 1979, 86(2), 420–428.

Spielmann H, Gerner I, Kalweit S, Moog R, Wirnsberger T, Krauser K, Kreiling R, Kreuzer H, Lüpke NP, Miltenburger HG, Müller N, Mürmann P, Pape W, Siegemund B, Spengler J, Steiling W, Wiebel FJ. Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. Toxicol In Vitro. 1991;5(5-6):539-42. doi: 10.1016/0887-2333(91)90089-v.

Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, de Silva O. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. Toxicol In Vitro. 1999 Apr;13(2):375-84. doi: 10.1016/s0887-2333(98)00091-5.

Tavakoli M, Mahboobian MM, Nouri F, Mohammadi M. Studying the ophthalmic toxicity potential of developed ketoconazole loaded nanoemulsion in situ gel formulation for ophthalmic administration. Toxicol Mech Methods. 2021 Oct;31(8):572-580. doi: 10.1080/15376516.2021.1941461.

Tomás M, Sousa LGV, Oliveira AS, Gomes CP, Palmeira-de-Oliveira A, Cavaleiro C, Salgueiro L, Cerca N, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. Vaginal Sheets with Thymbra capitata Essential Oil for the Treatment of Bacterial Vaginosis: Design, Characterization and In Vitro Evaluation of Efficacy and Safety. Gels. 2023 Apr 2;9(4):293. doi: 10.3390/gels9040293.

Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Sep 30;59(11):1162-76. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.019.

Victorelli FD, Calixto GMF, dos Santos KC et al. Curcumin-loaded Polyethyleneimine and chitosan polymer-based Mucoadhesive liquid crystalline systems as a potential platform in the treatment of cervical Cancer. Journal of Molecular Liquids. 2021 v. 325, p. 115080.

Victorelli FD, Salvati Manni L, Biffi S, Bortot B, Buzzá HH, Lutz-Bueno V, Handschin S, Calixto G, Murgia S, Chorilli M, Mezzenga R. Potential of curcumin-loaded cubosomes for topical treatment of cervical cancer. J Colloid Interface Sci. 2022 Aug 15;620:419-430. doi: 10.1016/j.jcis.2022.04.031.

Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Family medicine. 2005, 37(5), 360–363.

Villanueva H, Sikora AG. The Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM): A Versatile Tool for the Study of Patient-Derived Xenografts. Methods Mol Biol. 2

Vinardell MP, García L. The quantitive chlorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. Toxicol In Vitro. 2000 Dec;14(6):551-5. doi: 10.1016/s0887-2333(00)00050-3. 022;2471:209-220. doi: 10.1007/978-1-0716-2193-6_11.

Wang L, McAlonan K, Goldstein S, Gerfen CR, Krauzlis RJ. A Causal Role for Mouse Superior Colliculus in Visual Perceptual Decision-Making. J Neurosci. 2020 May 6;40(19):3768-3782. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2642-19.2020.

Wannmacher L. Farmacologia clínica para dentistas. Coautoria de Maria Beatriz Cardoso Ferreira. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2007 [citado 2023 Jun 11]. Disponível em: https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/978-85-277-2052-6.

Zafar A, Alsaidan OA, Imam SS, Yasir M, Alharbi KS, Khalid M. Formulation and Evaluation of Moxifloxacin Loaded Bilosomes In-Situ Gel: Optimization to Antibacterial Evaluation. Gels. 2022 Jul 4;8(7):418. doi: 10.3390/gels8070418.

Zhu T, Yu X, Yi X, Guo X, Li L, Hao Y, Wang W. Lidocaine-Loaded Hyaluronic Acid Adhesive Microneedle Patch for Oral Mucosal Topical Anesthesia. Pharmaceutics. 2022 Mar 22;14(4):686. doi: 10.3390/pharmaceutics14040686.

Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. PLoS One. 2011;6(11):e27385. doi: 10.1371/journal.pone.0027385.

Zwilling E. A modified chorioallantoic grafting procedure. Transplant Bull. 1959 Jan;6(1):115-6. doi: 10.1097/00006534-195901000-00046.

Anexo 1 – CARTA DE DOAÇÃO DOS OVOS

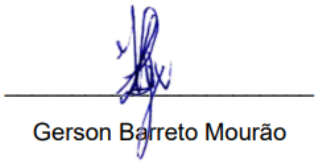
ESALQ
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo

GΣ²MA
GRUPO DE ESTUDOS EM ESTATÍSTICA E MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL
ESALQ - USP

Carta de Doação

Eu, Prof° Dr° Gerson Barreto Mourão, responsável pelo setor de Melhoramento Genético Animal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), venho por meio desta, informar que estou cinte e de acordo com a realização de pesquisa do projeto intitulado "Uso do método da membrana corioalantóica do embrião de galinha na avaliação do potencial tóxico de anestésicos tópicos odontológicos", sob responsabilidade da Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite – Laboratório de Fisiologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), adicionalmente contribuindo para este projeto com a doação de ovos férteis, a ser realizada quinzenalmente, sendo doados 60 ovos férteis periodicamente.

Piracicaba, 10 de fevereiro de 2022.



Gerson Barreto Mourão

Anexo 2 – ANÁLISE DO ESTUDO PELA CEUA-UNICAMP

INFORMAÇÃO CEUA nº 10/2022

UNICAMP

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CEUA/Unicamp

I N F O R M A Ç Ã O

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP – CEUA/UNICAMP – esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa **"USO DO MODELO ALTERNATIVO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO EMBRIÃO DE GALINHA (CAM) NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE FORMULAÇÕES DE ANESTÉSICOS TÓPICOS ODONTOLÓGICOS"**, de responsabilidade da Profa. Dra. Michelle Franz-Montan Braga Leite e dos executores: Arthur Antunes Costa Bezerra e Laura Campos Dutra de Morais, para análise desta comissão.

Justificativa: O protocolo em questão propõe a utilização dos ovos embrionados no dia 10° de incubação. Portanto, antes da metade da incubação. Também não prevê a manutenção do embrião vivo. Assim, como método alternativo, e ensaio in vitro realizado antes da metade do período de incubação e sem a manutenção do embrião vivo. Não haverá manipulação *in vivo* na Unicamp.

Campinas, 16 de fevereiro de 2022.

Profa. Dra. Cínthia Baú Betim Cazarin
Presidente em exercício
CEUA/UNICAMP

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva
CEUA/UNICAMP

CEUA/UNICAMP
Rua Monteiro Lobato, 255
13083-862
Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_principal

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 42338862 127E4A0C 83CE6EEF 700A142D

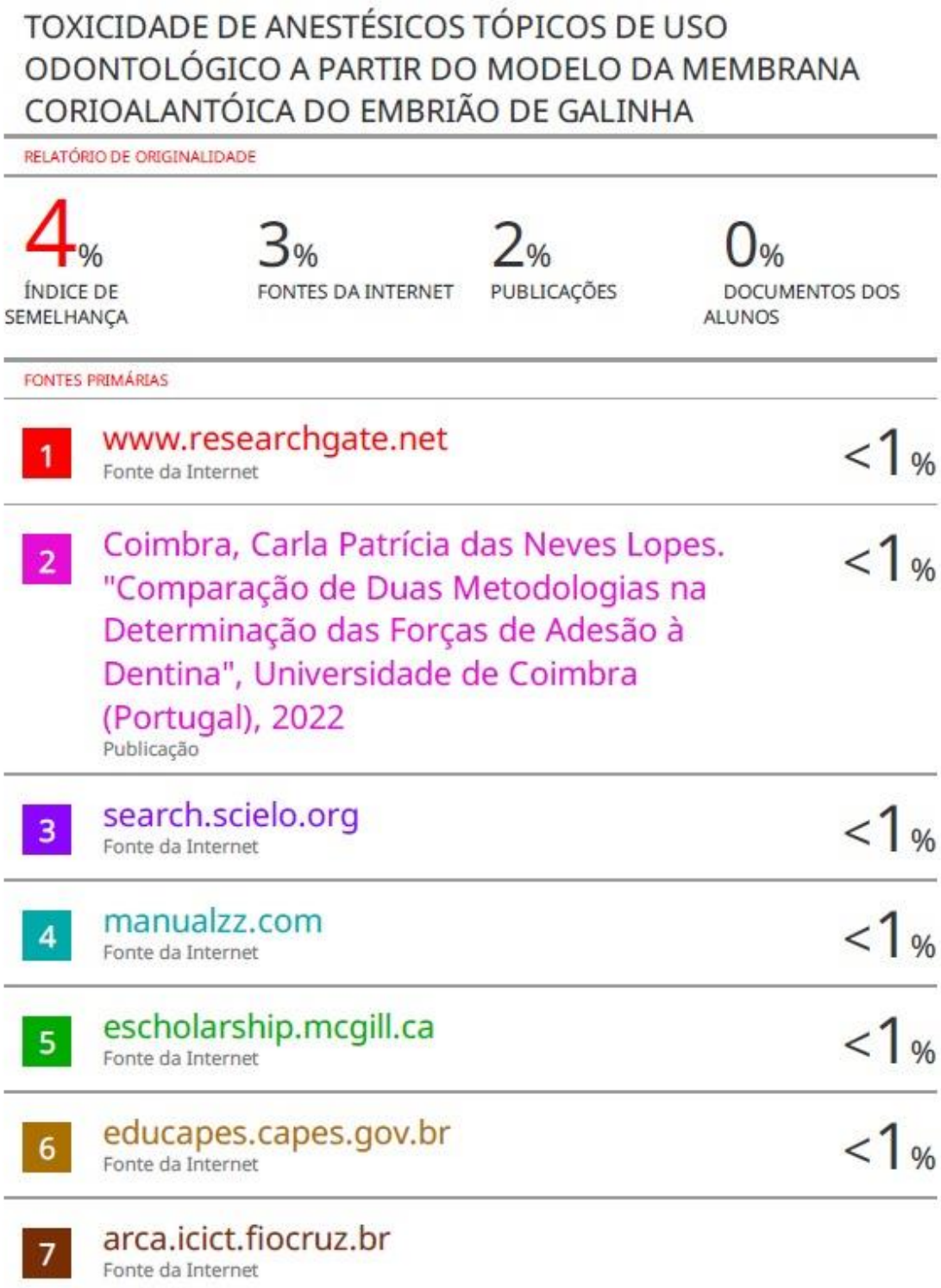
Documento assinado eletronicamente por **CÍNTHIA BAÚ BETIM CAZARIN**, **PRESIDENTE EM EXERCÍCIO CEUA/UNICAMP**, em 16/02/2022, às 16:17 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS**, **SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 16/02/2022, às 16:36 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
42338862 127E4A0C 83CE6EEF 700A142D

UNICAMP
SIGAD

Anexo 3 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO



TOXICIDADE DE ANESTÉSICOS TÓPICOS DE USO ODONTOLÓGICO A PARTIR DO MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO EMBRIÃO DE GALINHA

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

4%	3%	2%	0%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	www.researchgate.net Fonte da Internet	<1%
2	Coimbra, Carla Patrícia das Neves Lopes. "Comparação de Duas Metodologias na Determinação das Forças de Adesão à Dentina", Universidade de Coimbra (Portugal), 2022 Publicação	<1%
3	search.scielo.org Fonte da Internet	<1%
4	manualzz.com Fonte da Internet	<1%
5	escholarship.mcgill.ca Fonte da Internet	<1%
6	educapes.capes.gov.br Fonte da Internet	<1%
7	arca.icict.fiocruz.br Fonte da Internet	