

MODELO EMBRIOTÓXICO *IN VITRO* PARA CONTAMINANTES AMBIENTAIS VOLÁTEIS DE ANESTÉSICO HALOGENADO

Raiane Cristina Fratini de Castro¹; Guilherme Barizão²; Giovanna Rafael Fernandes da Silva³; Isabelle Picada Emanuelli⁴

¹Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/FA-ICETI-UniCesumar. raianecfratini@gmail.com

²Mestrando do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas – UNICESUMAR, Maringá/PR. guilherme.zao@gmail.com

³Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR.

giovannarfs1@gmail.com

⁴Docente do Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas, Universidade, UNICESUMAR. Bolsista Produtividade e Pesquisadora do Instituto UniCesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação - ICETI. isabelle.emanuelli@docentes.unicesumar.edu.br

RESUMO

O uso de anestésicos voláteis é realizado diariamente em ambiente hospitalar, em decorrência da rotina de procedimentos cirúrgicos, expondo os profissionais presentes no referido local de trabalho. Há carência de estudos que demonstrem riscos embriotóxicos em mulheres gestantes e a necessidade de elucidar os danos causados por tais poluentes ambientais sem utilizar modelos animais vivos. Desta forma, seria interessante desenvolver modelos *in vitro* para testes embriotóxicos em fases iniciais do desenvolvimento. O objetivo do estudo será caracterizar e validar um modelo *in vitro* de embriotoxicidade para anestésicos voláteis, utilizando o isoflurano no desenvolvimento inicial de embriões bovinos. A pesquisa trata-se de um estudo de desenvolvimento metodológico que explora, observa, e descreve um modelo de teste toxicológico *in vitro* para exposição assistida a anestésicos halogenados durante o cultivo embrionário. Para obtenção dos oócitos serão utilizados ovários bovinos coletados em abatedouro. A presente metodologia, irá se apresentar nas seguintes seções: (1) Protocolo de produção *in vitro*; (2) Caracterização do modelo embriotóxico; (3) Análise da eficiência técnica do modelo desenvolvido e validação do método. Espera-se definir um modelo embriotóxico *in vitro* em embriões expostos ao isoflurano no período pré-implantacional visando propiciar uma metodologia adequada para futuros trabalhos sobre os riscos ocasionados aos embriões pela exposição a anestésico inalatório. O intuito é contribuir para a segurança em ambientes laborais para as gestantes expostas aos agentes anestésicos voláteis, permitindo prever os possíveis danos causados aos embriões no período pré-implantacional.

PALAVRAS-CHAVE: Anestesia inalatória; Embriotoxicidade; Isoflurano; Modelo animal.

1 INTRODUÇÃO

A anestesia pode ser definida como um fenômeno que impede a percepção e consciência de estímulos externos, dentro dessa prática a anestesia inalatória vem sendo difundida diariamente. Os anestésicos inalatórios (AI) produzem rapidamente o efeito esperado com mínimos efeitos indesejáveis, e facilmente reversíveis. São administrados pela via pulmonar com o auxílio de um aparelho de anestesia. Para exercer seu efeito, é carregado pelo sangue até o sistema nervoso central, porém, embora utilizados há mais de 150 anos, possuem mecanismo de ação desconhecido para esclarecer a ausência de resposta a procedimentos cirúrgicos e outros estímulos nocivos. Dentre os anestésicos inalatórios halogenados, o isoflurano é o que menos sofre metabolização por tecidos (LUMB *et al.*, 2019).

Os gases anestésicos possuem um potencial de impacto ao aquecimento global centenas a milhares de vezes maior que o dióxido de carbono, devido a sua meia vida e peso molecular. Diariamente os agentes da saúde se expõem por longos períodos aos resíduos destes gases anestésicos, em centros cirúrgicos, enfermarias ou salas de preparo, aumentando consideravelmente os sinais de dores de cabeça, alterações comportamentais, depressão e até danos ao material genético (BRAZ *et al.*, 2007). Além disso, de acordo com a UHS (*University Health Services*, 2017) a exposição crônica como a que acontece com os agentes de saúde, leva a prejuízo da função hepática e renal.

Na atualidade, os danos pela liberação dos anestésicos para atmosfera têm sido descritos de forma extensiva; no entanto, métodos e padrões para práticas sustentáveis na anestesia quanto ao uso de halogenados, não são abordados de forma suficiente. Em geral, todos os processos envolvidos na anestesia com utilização de halogenados podem permitir o escape destes compostos para a atmosfera, seja no momento na intubação, indução em máscara, por não utilização de sistemas antipoluição, respiração fora da ventilação mecânica, circuitos sem reinalação de gases, entre outros (OLIVEIRA, 2009). Os ambientes sem sistema de exaustão levam à alta exposição dos resíduos de anestésicos inalatórios, no qual os resíduos hospitalares, em geral, são lesivos à saúde humana e ao meio ambiente. O cumprimento da legislação vigente, com embasamento no Programa de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde, visa diminuir o impacto ocasionado por estes, por meio de ações de biossegurança e correto descarte.

A não destinação correta dos resíduos de AI ou até mesmo a sua exposição diária causa nos profissionais efeitos indesejáveis como cefaleia, náuseas, vômitos, sonolência e decréscimo neurocomportamental (EPP *et al.*, 2012). Sobretudo, com maior preocupação são descritas alterações proliferativas. Médicas anesthesiologistas expostas ao isoflurano e halotano e óxido nitroso, apresentaram maior alterações citogênicas, cromossômicas e trocas entre carótides irmãs, quando comparadas a outros voluntários (BILBAN *et al.*, 2005). Shigari *et al.* (2009) demonstraram que mulheres que trabalham em centros cirúrgicos sem sistemas de exaustão de gases adequados, tem maior probabilidade de sofrer aborto espontâneo.

Quanto aos possíveis efeitos embriotóxicos do isoflurano, existem poucos trabalhos que demonstram os efeitos *in vitro*, sendo que a maioria são estudos de caso relacionados aos procedimentos de reprodução humana assistida (MATSOTA *et al.*, 2015; TOLA, 2019; HEO *et al.*, 2020). Referente a modelos *in vitro* de testes embriotóxicos, a literatura indica em um estudo que o isoflurano, em concentrações semelhantes às empregadas durante a recuperação de oócitos humanos na FIV, inibe o desenvolvimento embrionário de camundongo (CHETKOWSKI *et al.*, 1988).

Um modelo interessante para este estudo toxicológico seria os bovinos, que possuem uma cinética do desenvolvimento embrionário inicial semelhante aos humanos (SANTOS *et al.*, 2014). O embrião bovino apresenta em seus ciclos de clivagem até o estágio de mórula importantes eventos que determinam sua competência embrionária ou não (SIRARD, 2010).

Diante dos fatos expostos e da falta de estudos na literatura é preciso entender quais os possíveis riscos embrionários das gestantes com atividades laborais em ambientes hospitalares que realizam o uso de anestésicos inalatórios.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa trata-se de um estudo de desenvolvimento metodológico que explora, observa, e descreve um modelo de teste toxicológico *in vitro* para exposição assistida a anestésicos halogenados durante o cultivo embrionário.

Para obtenção dos oócitos serão utilizados ovários bovinos coletados em abatedouro (Abatedouro de Floraí, Floraí-PR). As produções de embriões *in vitro* serão realizadas no BIOCELGEN, localizado na fazenda Unicesumar, Maringá, no Paraná (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550m).

A metodologia, irá se apresentar nas seguintes seções:

(1) Protocolo de produção *in vitro*, com aspiração de ovários advindos de abatedouro, e, em seguida, maturação, fertilização e cultivo.

(2) Caracterização do modelo embriotóxico: este modelo utilizará embriões bovinos produzidos *in vitro* expostos ao anestésico inalatório isoflurano no período pré-

implantacional em uma incubadora modular, nas concentrações de 1,5%, 3% e 5% do anestésico. O tempo de exposição ao contaminante volátil será determinado em intervalos de aproximadamente 5 a 6 horas, 3 a 4 horas e 0 a 1 hora. Para caracterizar o modelo será determinado o melhor estágio do desenvolvimento embrionário para exposição ao contaminante: zigoto (dia 1 após fertilização); embrião clivado (dia 2 após fertilização); ou mórula (antes da abertura da blastocle).

(3) Análise da eficiência técnica do modelo desenvolvido e validação do método: a análise e validação do método serão realizadas pela avaliação do desenvolvimento embrionário após a exposição. Avaliando, portanto, a taxa de clivagem (nº clivados/ nº oócitos), taxa dos embriões que chegarão a blastocisto (nº blastocistos / nº oócitos), taxa de embriões que não ultrapassam o bloqueio embrionário (nº embriões 8 células / nº oócitos), e a taxa de embriões que eclodiu (nº blastocistos eclodidos/ nº blastocistos). No dia 7 de cultivo os blastocistos serão avaliados quanto a qualidade morfológica seguindo os critérios da IETS 2019.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se definir um modelo embriotóxico *in vitro* em embriões expostos ao isoflurano no período pré-implantacional e entender os riscos causados devido à exposição deste anestésico inalatório. A aplicação deste método alternativo possibilitará elucidar os riscos ao embrião inicial sem utilizar modelos animais *in vivo*, seguindo assim os princípios de Russell - Burch (1959) de “redução, substituição e refinamento” sugerido como método padrão pela União Européia desde 2016.

Amplamente, este estudo almeja contribuir para a seguridade em ambientes laborais para as gestantes expostas aos agentes anestésicos voláteis, permitindo prever os possíveis danos causados aos embriões no período pré-implantacional.

REFERÊNCIAS

CHETKOWSKI RJ, NASS TE. O isoflurano inibe o desenvolvimento inicial do embrião de camundongo *in vitro*. **Fertilidade e esterilidade**. 1988; 49 (1): 171–173. Acesso em: 23 jan. 2021.

HEO HJ, KIM YY, LEE JH, LEE HG, BAEK SM, KIM KM. Comparison of chemical pregnancy rates according to the anesthetic method during ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval for *in vitro* fertilization: a retrospective study. **Anesth Pain Med (Seoul)**. 2020, jan 31;15(1):49-52. doi: 10.17085/apm.2020.15.1.49. PMID: 33329789; PMCID: PMC7713849. Acesso em: 29 nov. 2020

MATSOTA P, KAMINIOTI E, KOSTOPANAGIOTOU G. Anesthesia Related Toxic Effects on *In Vitro* Fertilization Outcome: Burden of Proof. **Biomed Res Int**. 2015;2015:475362. Doi: 10.1155/2015/475362. Epub 2015, jun 16. PMID: 26161404; PMCID: PMC4486487. Acesso em: 16 jun. 2020

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. Londres: Methuen, 1959. ISBN:0900767782

SANTOS, R. R. *et al.* Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p.117-200, 2014. Springer Nature. Acesso em: 29 jul. 2020

SIRARD, M.A. Activation of the embryonic genome. Soc.Reprod. **Fertil.** Suppl. 2010, 67, 145–158. Acesso em: 02 abr. 2020

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, Illinois, USA 2019.

THURMON, J. C., TRANQUILI, W. J., BENSON, G. L. **Lumb & Jones' Veterinary anesthesia. 5.ed.** Philadelphia: Lea & Febiger, 2017. 928p. Acesso em: 03 dez. 2020

TOLA EN. The effect of anesthetic agents for oocyte pick-up on in vitro fertilization outcome: A retrospective study in a tertiary center. **Taiwan J Obstet Gynecol.** 2019 Sep;58(5):673-679. doi: 10.1016/j.tjog.2019.07.016. PMID: 31542091. Acesso em: 08 set. 2020.