



EFEITO DO ISOFLURANO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRÉ-IMPLANTACIONAL

Giovanna Rafael Fernandes da Silva¹, Raiane Cristina Fratini de Castro², Isabele Picada Emanuelli³

¹Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Bolsista PIBIC/CNPq-UniCesumar. giovannarfs1@gmail.com

²Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. raianecfratini@gmail.com

³Docente do Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR. Pesquisadora, Bolsista Produtividade do Instituto UniCesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação - ICETI. isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br

RESUMO

Os gases anestésicos, devido sua volatilidade, meia vida e peso molecular, possuem capacidade lesiva ao meio ambiente e à saúde humana. Em decorrência da rotina hospitalar e procedimentos cirúrgicos, os profissionais da saúde acabam se expondo a esses componentes tóxicos, podendo resultar em efeitos indesejáveis. 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, torna-se essencial desenvolver modelos *in vitro* para testar a embriotoxicidade nas fases iniciais da gestação. O presente estudo irá investigar os efeitos do isoflurano sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, visando prever riscos embriotóxicos, utilizando bovino como modelo de teste *in vitro*, a fim de prever as possíveis alterações proliferativas causadas nos indivíduos que foram expostos. Trata-se de um estudo experimental que explora, observa, e descreve como a exposição ao isoflurano afeta o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, uma vez que serão submetidos à exposição assistida a anestésicos halogenados durante o cultivo embrionário. Para tanto, irá se apresentar nas seguintes seções: (1) Caracterização do estudo; (2) Protocolo de produção *in vitro*; (3) Caracterização do modelo embriotóxico; (4) Análise do desenvolvimento e viabilidade embrionária. Espera-se entender os riscos do isoflurano sobre o desenvolvimento embrionário inicial, sem a utilização de modelos animais *in vivo*. O intuito deste trabalho é 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.

PALAVRAS-CHAVE: Anestésicos inalatórios; Embriotoxicidade; Modelo *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço e aumento dos procedimentos efetuados em animais, a anestesia, definida como um fenômeno que impede a percepção e consciência de estímulos externos, tornou-se parte importante na rotina veterinária. Nesta prática, utiliza-se anestésicos intravenosos ou anestésicos inalatórios (AI).

Na medicina veterinária, os anestésicos inalatórios mais empregados são óxido nitroso, halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano e desflurano (ANDRADE *et al.*, 2008). Dentre os anestésicos inalatórios halogenados, o isoflurano é o que menos sofre metabolização por tecidos (LUMB e JONES, 2019), tornando-se o mais frequentemente utilizado na clínica de pequenos animais (CARROLL, 2012).

Rotineiramente, os agentes da saúde expõem-se 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 University Health Services (2017) a exposição crônica como a que acontece com os agentes de saúde, leva a prejuízo da função hepática e renal.

Os gases anestésicos utilizados hoje em dia, emitem CO₂ equivalente a 1 milhão de carros de passageiro ao ano (LANGBEIN *et al.*, 1999; RYAN e NIELSEN, 2010; YASNY e WHITE, 2012). Vários



países estabeleceram os limites para exposição dos trabalhadores expostos aos gases, a fim de reduzir o impacto na saúde desses profissionais (MOLINA ARAGONÉS *et al.*, 2016). O National Institute of Occupational Safety and Health, dos EUA, recomenda uma exposição máxima de 2 partículas por milhão de gases halogenados (NIOSH, 2007). No Brasil, não existe legislação que controle a emissão nos centros cirúrgicos desses gases.

Os centros veterinárias sem sistema de exaustão, levam a 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. Conforme a legislação vigente ANVISA 306 (2004) e CONAMA 358 (2005) os resíduos dos serviços de saúde devem ser classificados em seus respectivos grupos, em que os AI pertencem ao grupo B. Identificando-os, é possível tomar os cuidados específicos (CAMARGO *et al.*, 2009).

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 efeitos da anestesia e analgesia nos procedimentos de reprodução humana assistida (MATSON *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 e NASS, 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).

Após a fertilização, a meiose é concluída e a ciclicidade celular retorna ao padrão mitótico. O genoma embrionário único foi estabelecido pela mistura dos cromossomos maternos e paternos. Isso equipa o zigoto com a composição genética completa para construir o embrião. O citoplasma do zigoto, herdado do oócito, contém a composição molecular e estrutural completa necessária para iniciar as primeiras clivagens e, posteriormente, ativar o genoma embrionário para a transcrição embrionária de novo (GRAF *et al.*, 2014). Portanto, a fase inicial de desenvolvimento é de crucial importância para o desenvolvimento de um embrião saudável apto a ativar seu genoma, compactar, abrir a cavidade da blastocela e posteriormente eclodir.

Frente ao exposto, e a carência de estudos desta natureza na literatura, faz-se necessário entender os possíveis riscos embrionários de gestantes com atividades laborais em ambientes hospitalares que empregam o uso de anestésicos inalatórios.

2 DESENVOLVIMENTO

A utilização de anestésicos inalatórios em ambiente hospitalar é realizada cotidianamente. Existem profissionais que possuem contato diário com estes agentes, realizando a inalação de forma passiva durante algumas horas por dia, ao longo de anos.

A exposição a estes agentes originam efeitos ainda não esclarecidos em sua totalidade, que vão desde dor de cabeça até problemas reprodutivos. Alguns agentes anestésicos voláteis como o isoflurano são rapidamente absorvidos e distribuídos através da corrente sanguínea. Mulheres



grávidas no período inicial da gestação podem estar expondo o embrião a consequências irreversíveis.

Perante ao exposto encontra-se a necessidade de elucidar os possíveis danos causados às profissionais gestantes no período inicial da gestação, uma vez que há carência de estudos que demonstrem estes danos. Desta forma permitindo tomar medidas preventivas nos ambientes hospitalares, contribuindo com a redução de impactos ambientais e sociais.

Trata-se de um estudo experimental que explora, observa, e descreve como a exposição ao isoflurano afeta o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, uma vez que serão submetidos à exposição assistida a anestésicos halogenados durante o cultivo embrionário.

Para tanto, irá se apresentar nas seguintes seções: (1) Caracterização do estudo; (2) Protocolo de produção in vitro; (3) Caracterização do modelo embriotóxico; (4) Análise do desenvolvimento e viabilidade embrionária.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de análise e avaliação, é esperado com este trabalho compreender os efeitos do isoflurano no desenvolvimento embrionário pré-implantacional. O estudo deste método alternativo possibilitará explicar os riscos ao embrião inicial sem utilizar modelos animais in vivo, seguindo assim os princípios de William Russel e Rex Burch (1959) de "redução, substituição e refinamento" sugerido como método padrão pela União Européia, desde 2016. Assim, este estudo contribuirá, de forma abrangente, aos profissionais da saúde e principalmente às profissionais gestantes no período inicial da gestação, para uma melhor seguridade nos ambientes laborais com exposição à agentes anestésicos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Silvia Franco *et al.* Terapêutica do Sistema Nervoso. *In:* ANDRADE, Silvia Franco. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 17. p. 433- 513.

ALSALILI, M.; THORNTON, S.; FLEMING, S. The effect of the anaesthetic, Propofol, on in-vitro oocyte maturation, fertilization and cleavage in mice. **Hum Reprod**, 1997 jun;12(6): 1271-4. DOI: 10.1093/humrep/12.6.1271. PMID: 9222016.

CARROLL, Gwendolyn L. Anestésicos Inalatórios. *In:* CARROLL, Gwendolyn L. **Anestesia e Analgesia de Pequenos Animais**. Barueri: Manole, 2012. Cap. 7. p. 110- 119. Tradução de: Cid Figueiredo.

CHETKOWSKI, R. J.; NASS, T. E. Isoflurane inhibits early mouse embryo development in vitro. **Fertil Steril**. 1988 Jan; 49(1): 171-3. PMID: 3335266.

CHETKOWSKI, R. J.; NASS, T. E Isoflurane inibe o desenvolvimento inicial do embrião de camundongo in vitro. **Fertilidade e esterilidade**. 1988; 49 (1): 171–173. [PubMed] [Google Scholar]

DUARTE, Leonardo Teixeira Domingues; SARAIVA, Renato Angelo. Imobilidade: uma ação essencial dos anestésicos inalatórios. **Rev. Bras. Anestesiol**, Campinas, v. 55, n. 1, p. 100-117, feb. 2005.



Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942005000100013&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 16 maio 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942005000100013>.

HAMMADEH, M.; WILHELM, W.; HUPPERT, A. *et al.* Effects of general anaesthesia vs. sedation on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. **Arch Gynecol Obstet** 263, p. 56–59, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004040050263>

HEO, H. J.; KIM, Y. Y.; LEE, J. H.; LEE, H. G.; BAEK, S. M.; KIM, K. M. 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.

WARREN, Joe R.; SHAW, Barry; MICHAEL, P. Steinkampf, Effects of Nitrous Oxide on Preimplantation Mouse Embryo Cleavage and Development, **Biology of Reproduction**, v. 43, m. 1, 1 jul. 1990, p. 158–161. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.158>.

LEE, E. J. E.; BONGSO, A.; KUMAR, A. Evaluation of inalational anesthetics on murine in vitro fertilization. *Anais da Academia de Medicina de Cingapura*. 1994; 23 (4): 479–485. [PubMed] [Google Scholar].

LUCIO, Lorena M. C.; BRAZ, Mariana G.; NASCIMENTO JUNIOR, Paulo do; BRAZ, José Reinaldo C.; BRAZ, Leandro G. Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 68, n. 1, 2018, p. 33-41.

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.

CAMARGO, M. E. *et al.*, **Scientia Plena**, 5, 070101, 2009.

OLIVEIRA, Carlos. Rogério Degrandi. Exposição ocupacional a resíduos de gases anestésicos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 110-124, feb. 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942009000100014&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 16 maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-70942009000100014>.

ROUSTAN, A.; PERRIN, J.; BERTHELOT-RICOU, A.; LOPEZ, E.; BOTTA, A.; COURBIERE, B. Métodos de avaliação de eutanásia de camundongo na qualidade do oócito: deslocamento cervical versus inalação de isoflurano. **Lab Anim**. 2012; 46 (2): 167–9. [PubMed] [Google Scholar].

SIRARD, M. A. Activation of the embryonic genome. *Soc.Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 67, p. 145–158, 2010.



GRAF, Alexander; KREBS, Stefan; HEININEN-BROWN, Mari; ZAKHARTCHENKO, Valeri; BLUM, Helmut; WOLF, Eckhard. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, 2014, p. 46-58.

THAETE, L. G.; LEVIN, S. I.; DUDLEY, A. T. Impacto de anestésicos e analgésicos no crescimento fetal em camundongos. **Lab Anim**. 2013; 47 (3): 175–83. [Artigo grátis PMC] [PubMed] [Google Scholar].

TOLA, E. N. 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.

TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones veterinary anesthesia and analgesia**, 4th ed., Iowa: Blackwell Publishing, 2007, 1096 p.

Warren JR, Shaw B, Steinkampf MP. **Biol Reprod**. 1990 Jul;43(1):158-61. DOI: 0.1095/biolreprod43.1.158. PMID: 2393689

WARREN, J. R.; SHAW, B.; STEINKAMPF, M. P. Inibição do desenvolvimento de embriões de camundongo pré-implantação por isoflurano. **Am J Obstet Gynecol.**, 1992; 166 (2): 693–8. [PubMed] [Google Scholar].

YGEIA. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**. Disponível em: www.hygeia.ig.ufu.br. ISSN: 1980-1726.