



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

Raiane Cristina Fratini de Castro<sup>1</sup>, Guilherme Barizão<sup>2</sup>, Giovanna Rafael Fernandes da Silva<sup>3</sup>,  
Dayane Aparecida dos Santos<sup>4</sup>, Isabele Picada Emanuelli<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista PIBIS/Fundação Araucária. raianecfratini@gmail.com

<sup>2</sup>Mestre, Docente do Curso de Medicina Veterinária, UNICESUMAR. guilherme.zao@gmail.com

<sup>3</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Maringá-PR. giovannarfs1@gmail.com

<sup>4</sup>Doutora em Ciências de Alimentos – UEM, Maringá (PR). Pesquisadora técnica UNICESUMAR- Bolsista Fundação Araucária. dayane.santos@unicesumar.edu.br

<sup>5</sup>Orientadora, Doutora, Docente 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

O objetivo do estudo foi caracterizar e validar um modelo *in vitro* de embriotoxicidade para anestésicos voláteis, utilizando o isoflurano no desenvolvimento inicial de embriões bovinos. 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 foram utilizados ovários bovinos coletados em abatedouro. A metodologia apresenta-se 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. Os resultados encontrados para o estágio de desenvolvimento do blastocisto no sétimo dia indicaram diferença significativa entre o GC (Bi: 23,81%; Bl: 40,00%; Bx: 36,19%;  $p < 0,001$ ) e os demais, quanto aos grupos expostos G1h (Bi: 19,44%; Bl: 22,22%; Bx: 11,11%;  $p = 0,739$ ), G3h (Bi: 25,71%; Bl: 14,29%; Bx: 8,57%;  $p = 0,209$ ) e G6h (Bi: 26,92%; Bl: 19,23%; Bx: 0,00%;  $p = 0,353$ ) não houve diferença estatística entre eles. Ainda no D7, verificou-se que 50% dos embriões estavam no estágio de mórula (G1: 47,22%; G3: 51,43%; G6: 53,85%), enquanto o GC (0%;  $p < 0,001$ ) não apresentou embriões nesta fase. Esses resultados indicam que há uma interferência nos padrões iniciais de desenvolvimento dos embriões expostos ao isoflurano, interferindo na cinética do desenvolvimento por retardar os eventos embrionários de compactação, abertura da blastocela e formação inicial do blastocisto.

**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, na qual 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 (THURMON *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.

Os danos pela liberação dos anestésicos para atmosfera atualmente 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 desses para atmosfera, seja no momento na intubação, indução em máscara, 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 a alta exposição dos resíduos de anestésicos inalatórios, no qual os resíduos hospitalares, em geral, são lesivos à saúde humana e ao meio ambiente.

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). Shirangi 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 e NASS, 1988).

Um modelo interessante para este estudo toxicológico são 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 a 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. Dessa forma, o objetivo do estudo é caracterizar e validar um modelo *in vitro* de embriotoxicidade para anestésicos voláteis, utilizando o isoflurano no desenvolvimento inicial de embriões bovinos.

## 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 foram utilizados ovários bovinos coletados em abatedouro (Abatedouro de Floráí, Floráí-PR). As produções de embriões *in vitro* foram realizadas no



BIOCELGEN, localizado na fazenda Unicesumar, Maringá, no Paraná (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550m).

A presente metodologia, se apresenta nas seguintes seções:

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

(2) Caracterização do modelo embriotóxico – este modelo utilizou 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 foi determinado em intervalos de 6 horas (G6), 3 horas (G3) e 1 hora (G1). Para caracterizar o modelo foi 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 blastocele);

(3) Análise da eficiência técnica do modelo desenvolvido e validação do método - a análise e validação do método foram realizadas pela avaliação do desenvolvimento embrionário após a exposição. Avaliando, portanto, a taxa de clivagem (nº clivados/ nº oócitos), taxa dos embriões que chegaram a blastocisto (nº blastocistos / nº oócitos), taxa de embriões que não ultrapassaram o bloqueio embrionário (nº embriões 8 células / nº oócitos), e a taxa de embriões eclodidos (nº blastocistos eclodidos/ nº blastocistos).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A exposição ao isoflurano aos embriões no dia três de cultivo *in vitro*, interferiu negativamente no desenvolvimento embrionário, quando comparados aos embriões que não sofreram exposição ao anestésico inalatório.

Observou-se no sétimo dia de cultivo um atraso no desenvolvimento embrionário dos grupos expostos ao isoflurano, visto que aproximadamente 50% dos embriões se encontravam no estágio de mórula (47,22%; 51,43%; 53,85% – respectivamente G1h, G3h, G6h), evidenciando atraso na compactação e formação da blastocele. Os resultados encontrados referentes ao estágio de desenvolvimento dos blastocistos no dia sete indicaram haver diferença significativa (p-valor < 0,001) entre as quantidades de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) do grupo controle (GC), apontando evolução maior dos embriões que não sofreram exposição ao agente anestésico.

O estágio de desenvolvimento embrionário prediz a viabilidade e competência embrionária classificando a partir do seu estágio evolutivo, demonstrando que a capacidade de maior desenvolvimento *in vitro* pode ser indicativo de qualidade embrionária, inferindo que os embriões em estágios mais avançados podem ter maior chance de levar a uma gestação (STRINGFELLOW *et al.*, 2010).

**Tabela 1:** Avaliação do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 7 de cultivo *in vitro* nos grupos controle e expostos ao isoflurano, classificando-os em Mo, Bi, Bl e Bx.



Tratamento	Total de oócito (n)	Mo % (n)	Bi % (n)	BI % (n)	Bx % (n)	Total de embriões avaliados % (n)
GC	232	0,00 (0 /105) <sup>a</sup>	23,81(25/105) <sup>a</sup>	40,00(42/105) <sup>a</sup>	36,19 (38/105) <sub>a</sub>	51,98 (105/232)
G1h	236	47,22 (17/36) <sup>b</sup>	19,44 (7/36) <sup>b</sup>	22,22 (8/36) <sup>b</sup>	11,11 (4/36) <sub>b</sub>	36
G3h	232	51,43 (18/35) <sup>b</sup>	25,71 (9/35) <sup>b</sup>	14,29 (5/35) <sup>b</sup>	8,57 (3/35) <sup>b</sup>	35
G6h	233	53,85 (14/26) <sup>b</sup>	26,92 (7/26) <sup>b</sup>	19,23 (5/26) <sup>b</sup>	0,00 (0/26) <sup>b</sup>	26

<sup>a, b</sup>. Letras diferentes indicam diferença estatística significantes (valor  $p \leq 0,05$ ) entre os grupos da mesma coluna.

Os resultados demonstrados neste estudo quando analisados em conjunto a outros dados da literatura científica (CHETKOWSKI e NASS, 1988; AMARNATH *et al.*, 2007; BAUMANN *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008; STRINGFELLOW *et al.*, 2010; MILAZZOTO *et al.*, 2016), indicam haver interferência nos padrões de desenvolvimento embrionário inicial, dos grupos que sofreram exposição ao isoflurano, bem como na qualidade destes embriões, indicando possibilidade de haver uma interferência molecular nos processos embrionários de clivagem, compactação e blastulação, abrindo uma gama possibilidades para futuras investigações sobre os efeitos embriotóxicos e citotóxicos do isoflurano, bem como viabiliza novos trabalhos com diferentes contaminantes ambientais, em modelos embrionários *in vitro* bovino.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a presença do isoflurano nas fases de ativação do genoma embrionário interfere diretamente na produção de blastocistos, na eclosão dos blastocistos resultantes, mostrando que na fase inicial do desenvolvimento dos embriões, pode haver um atraso embrionário de compactação, abertura da blastocele e formação dos blastocistos iniciais.

Visto que o desenvolvimento de modelo *in vitro* bovino, apresenta pontos positivos quando comparados a outros modelos *in vivo*, além de apresentar um grande potencial em ser um possível substituto de outras técnicas *in vivo*.

#### REFERÊNCIAS

BILBAN, M; JAKOPIN, C Bilban; OGRINC, D. Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). International archives of occupational and environmental health, [S. l.], ano 2005, v. 78, n. 1, p. 60-64, 10 fev. 2005.

BRAZ, Mariana Gobbo; SALVADORI, Daisy Maria Fávero. Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells *in vitro* studied with comet assay. **Toxicology *in vitro***, Botucatu/SP, ano 2007, v. 21, n. 5, p. 972-976, 1 ago. 2007.

CHETKOWSKI, R.J.; NASS, T. E. 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.



GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; OLIVEIRA, Marcos Antônio Lemos de; MEZZALIRA, Alceu; *et al.* Produção *In vitro* de embriões. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal** [S. l.: s.n.], 2nd. Ed., p. 261-291, São Paulo, 2008.

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. 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.

OLIVEIRA, Carlos Rogério Degrandi. Exposição Ocupacional a Resíduos de Gases Anestésicos\* Occupational Exposure to Anesthetic Gases Residue. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [S. l.], ano 2009, v. 59, n. 1, p. 110-124, 2009. Acesso em: 27 jul. 2020.

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.

SHIRANGI, Adeleh; FRITSCHI, Lin; HOLMAN, C D'Arcy J. Associations of unscavenged anesthetic gases and long working hours with preterm delivery in female veterinarians. **Obstetrics and gynecology**, [S. l.], ano 2009, v. 113, n. 5, p. 1008-1017, maio 2009. 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.

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.

T

OLA, 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. Acesso em: 08 set. 2020.