

**ADEMIR CASSIANO DA ROSA**

**EFEITOS DAS EXPOSIÇÕES AO HALOTANO, ISOFLUORANO E  
SEVOFLUORANO NA FERTILIDADE, VIABILIDADE EMBRIONÁRIA E  
GESTAÇÃO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS**

**LAGES – SC**

**2010**

**ADEMIR CASSIANO DA ROSA**

**EFEITOS DAS EXPOSIÇÕES AO HALOTANO, ISOFLUORANO E SEVOFLUORANO NA FERTILIDADE, VIABILIDADE EMBRIONÁRIA E GESTAÇÃO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de mestrado em Ciência Animal, da Universidade do estado de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

**Lages - SC**

**2010**

**ADEMIR CASSIANO DA ROSA**

**EFEITOS DAS EXPOSIÇÕES AO HALOTANO, ISOFLUORANO E SEVOFLUORANO NA FERTILIDADE, VIABILIDADE EMBRIONÁRIA E GESTAÇÃO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, linha de pesquisa em Anestesiologia Veterinária.

**Banca Examinadora:**

Orientador:

---

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes  
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Membro externo:

---

Prof. Dr. Marcel Frajblat  
Univali - SC

Membro externo:

---

Prof. Dr. Antônio José de Araújo Aguiar  
Departamento de cirurgia e anestesiologia veterinária FMVZ/UNESP

**Lages, 2010**

A minha família, pessoas que nunca mediram esforços para que meus objetivos fossem alcançados, essa conquista é NOSSA.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro a Deus, por ter me dado o “dom” da vida e por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas, abençoadas, com as quais aprendo a cada dia que por mais árduo que seja nossa trilha, mais perseverantes devemos ser, pois sempre temos um motivo para sorrir.

Agradeço as pessoas razões da minha vida, meus pais. Pessoas que sempre prezaram pela educação e bem estar de seus filhos, colocando sempre seus filhos em primeiro lugar. Pessoas que me ensinam a cada dia como ser mais humano, que me fazem compreender o verdadeiro significado das palavras “pai e mãe”. Pessoas que depositam toda a confiança em mim, que me apóiam em minhas decisões e me repreendem quando preciso. Meus amigos sinceros das horas incertas. Devo tudo que sou e que conquistei a vocês. AMO MUITO VOCÊS!

Á minha irmã Kassiele e minha avó Terezinha que sempre são muito cuidadosas e amáveis, e mesmo em meus dias de mau humor estão sempre me dando amor e carinho.

Á minha namorada Marina sempre muito compreensível e me apoiando nas horas difíceis. Uma menina espetacular a qual tenho muito orgulho de fazer parte da vida dela. Adorável, querida, me faltam adjetivos para descrever suas qualidades e tudo que ela me representa. Te amo muito meu anjo!

Á Dona Maria Rosa e Leonardo Perissinotto Dal Pont minha mais nova família.

Aos meus 3 “orientadores e amigos” Professores doutores Aury Nunes de Moraes, Nilson Oleskovicz e Suzane Lilian Beier, os quais sempre se mostraram dispostos a compartilhar seus conhecimentos, e me deram dicas valiosas para

minha vida profissional e pessoal. Professores que fazem o possível e o impossível para oferecer o melhor conteúdo a seus alunos, independente de recursos financeiros. Vocês são os exemplos de profissionalismo, ética e conhecimento, que sempre levarei comigo. Ao meu orientador oficial Professor Aury, que me abriu as portas para a iniciação científica e para o mundo da anestesiologia veterinária, sempre disposto a ajudar e a buscar recursos para experimentos. Obrigado professor pela amizade, ensinamentos e paciência em ensinar. Muito obrigado professor.

Ao professor Nilson Oleskovicz, amigo sincero, sempre me incentivando a estudar e mostrando os caminhos a seguir. Pela amizade e momentos extrovertidos em churrascos e encontros do grupo. Seus conselhos sempre de grande valia e por mim sempre ouvidos e acatados. Muito obrigado.

A professora Suzane Lilian Beier e professor Cláudio Matoso. Obrigado pelo conhecimento transmitido, amizade, conselhos, ajuda na minha vida acadêmica. A professora Suzane pela sua vasta sabedoria e conhecimento, sempre disposta a me ajudar, em experimentos, aulas, rotina enfim professora e amiga para toda hora. Aprendi muito com você Suzi. Muito obrigado.

Ao Professor Ademar Luiz Dallabrida, amigo, sempre extrovertido.

Aos Mestrandos, Douglas Regalin, André Luiz Corrêa, Renato Tamanho, pelo companheirismo e amizade, sempre ouvindo meus desabaços nos momentos mais difíceis. Aos mestrandos mais novos Martielo, Luísa, Rafael e Felipe (Miúdo), amigos, companheiros. Verdadeiros irmãos quero a amizade de vocês sempre comigo. Obrigado por me proporcionarem um ótimo convívio e ambiente de trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica da anestesiologia, pelo suporte que vocês proporcionaram durante todo experimento e pela amizade.

Ao laboratório de reprodução animal CAV/UDESC pelo apoio e conhecimento para as avaliações do presente experimento. Agradecer em especial aos professores Alceu Mezzalira, Joana Mezzalira e ao bolsista Jamir Machado Júnior pela disposição nas avaliações.

Aos amigos Luciana Dalla Rosa, Dreone Mendes, Thomas Bierhals, Márcio Lermen, Fernanda Jönck, João Paulo Neris da Cruz, Jean Dal Pizzol, Ruiney Carneiro, Giovana que mesmo a distância sempre levo comigo a valiosa amizade de vocês.

Aos Residentes CAV/UDESC pela amizade e trabalho sempre dispostos a ajudar, em especial ao Hugo, Rafael Borges, Greyce e Fernanda Bignoto.

Aos funcionários do Hospital Veterinário CAV/UDESC em especial Glaucimara, Juliana, Marizete, Marli.

À FAPESC e Capes, pelo suporte financeiro para a realização do presente experimento e pela demanda social.

A Univali pelo fornecimento de animais para a realização deste experimento.

A Universidade do estado de Santa Catarina – UDESC, instituição pela qual tenho muito carinho e afinidade. Tenho a maior satisfação de ter realizado minha graduação e mestrado nesta instituição, e aonde estiver, estarei levando comigo com muito orgulho o nome CAV-UDESC.

A todos que em maior ou menor parcela contribuíram para esta conquista, meu muito obrigado.

Sempre levarei todos vocês em minhas lembranças e em meus pensamentos. Todos sem exceção fazem muita diferença e são muito importantes para mim muito obrigado por fazerem parte da minha vida!

Meu MUITO OBRIGADO A TODOS!

“Cada um de nós compõe a sua história,  
e cada ser em si carrega o dom de ser  
capaz, de ser feliz.....” (Almir Sater).

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos das exposições ao halotano, isofluorano ou sevofluorano na viabilidade embrionária e gestacional em fêmeas de camundongos. Foram utilizadas 160 fêmeas de camundongos (para exposição e acasalamento) e 40 camundongos machos (somente para acasalamento) da linhagem Balb/C, sendo as fêmeas alocadas em 5 grupos: Grupo halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio 100% (GO) que contavam com 20 fêmeas em cada grupo, e controle reprodutivo (GC) correspondente a cada grupo com 80 fêmeas. Em cada grupo as fêmeas foram expostas a 1 CAM do anestésico correspondente, 4 horas por dia durante 5 dias consecutivos totalizando uma exposição de 20 horas. Após intervalo de 48 horas da exposição, as mesmas foram mantidas em contato com os machos, na proporção de 2:1 (fêmea/macho), para acasalamento durante 5 noites consecutivas, na manhã posterior a cada noite as fêmeas eram observadas quanto a presença de plug vaginal. Em cada grupo as fêmeas que apresentavam plug, 50% eram sacrificadas 72 horas após a observação do mesmo para avaliação embrionária e 50% ao 14º dia da gestação, para avaliação gestacional. Foram avaliados: número de embriões viáveis e degenerados por fêmea, número de fetos, número de reabsorções e número de implantações por fêmea, tamanho fetal, alterações morfológicas externas em fetos, além de índices reprodutivos como taxa copulatória, taxa de fêmeas gestantes com presença de plug e taxa de gestação total. Na avaliação embrionária o GH apresentou menor número de embriões viáveis e maior número de embriões degenerados em relação á GI e GC. Quanto à avaliação gestacional o GH teve menor número fetos em relação aos demais grupos. Não foram observadas diferenças para as variáveis número de implantações e número de reabsorções por fêmea. Na avaliação do tamanho fetal, os fetos das fêmeas do GH foram menores que os fetos dos demais grupos, enquanto os fetos das fêmeas do GI foram maiores

que os demais. Com relação aos índices reprodutivos as fêmeas do grupo GH apresentaram menores taxas de fêmeas gestantes com plug e de gestação total, enquanto o grupo GO apresentou menor taxa copulatória que os demais grupos. Em todos os grupos não foram observadas alterações histopatológicas em órgãos das fêmeas expostas ou em fetos, nem alterações morfológicas externas que evidenciassem teratogenia. Conclui-se que a exposição repetida ao halotano reduziu a fertilidade, viabilidade embrionária, número e tamanho de fetos em camundongos, fato que não foi observado com a exposição ao isoflurano ou sevoflurano.

**Palavras-chave:** camundongos, anestésicos inalatórios, reprodução.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of exposure to halothane, isoflurane and sevoflurane on embryo viability and pregnancy in mice. We used 160 female mice (for exposure and mating) and 40 male mice (only for mating) of Balb/C strain, and the female mice were allocated into five groups: halothane (GH), isoflurane (GI), sevoflurane (GS), 100% oxygen (GO) that relied on 20 mice in each group, and reproductive control (GC) for each group with 80 mice. In each group the mice were exposed to 1 MAC of anesthetic corresponding four hours a day for 5 consecutive days with a total exposure of 20 hours. After an interval of 48 hours of exposure, they are kept in contact with males at a ratio of 2:1 (female/male) for mating for 5 consecutive nights, the morning after each night the mice were observed for the presence vaginal plug. In each group, the females that had plug, 50% were sacrificed 72 hours after the observation of the same assessment for embryo and 50% at day 14 of gestation to evaluate pregnancy. Were evaluated: number of embryos per female and degenerate, number of fetuses, number of resorptions and number of implantations per female, fetal size, external morphological alterations in fetuses, and reproductive rates as copulatory rate, rate of pregnant females with the presence of plug and pregnancy rate overall. In assessing embryonic GH showed a smaller number of viable embryos and a higher number of degenerated embryos in relation to GI and GC. For assessment gestational fetuses the GH group had the lowest number than the other groups. No differences were observed for the variables number of implantations and number of resorptions per female. In the assessment of fetal size, the fetuses of mice of GH were lower than other groups of fetuses, while fetuses of females were higher in GI than the others. With respect to reproductive parameters of the mices GH group had lower rates of pregnant females with full plug and pregnancy overall, while the GO group

showed lower copulatory rate than the other groups. In all groups there were no pathological changes in organs of exposed females or fetuses, nor of showing external morphological teratogenicity. We conclude that repeated exposure to halothane reduced fertility, embryo viability, number and size of fetuses in mice, which was not observed with exposure to isoflurane or sevoflurane.

**Key-words:** mices, inhalation anesthetics, reproduction.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Trabalhos realizados com diferentes metodologias e unidades experimentais para a exposição á diferentes anestésicos inalatórios.	36
<b>Tabela 2-</b>	Valores de taxa copulatória (%) de fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS) oxigênio (GO) e controle (GC).	51
<b>Tabela 3-</b>	Valores de taxa de gestação de fêmeas com plug (%) de fêmeas de camundongos nos grupos Halotano (GH), Isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	52
<b>Tabela 4-</b>	Valores de taxa de gestação total (%) em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	53
<b>Tabela 5-</b>	Valores médios de número de embriões viáveis e degenerados por fêmea e número de embriões viáveis e degenerados (%) em relação ao total de embriões por fêmea em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	54
<b>Tabela 6-</b>	Valores médios de número de fetos por fêmea em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	55
<b>Tabela 7-</b>	Valores médios de número de reabsorções por fêmea e porcentagem de reabsorções em relação ao total de implantações em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	56
<b>Tabela 8-</b>	Valores médios de número de implantações por fêmea em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	57

**Tabela 9-** Valores médios de tamanho fetal (mm) em fetos de fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle(GC). 58

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** a. caixa anestésica em acrílico para camundongos (40x40x10 cm); b. tubo coletor do capnógrafo e analisador de gases do monitor multiparamétrico acoplados no orifício de entrada e saída de gases da caixa anestésica . 43
- Figura 2-** a. cornos uterinos de fêmeas de camundongos coletados 72 horas após a presença de plug vaginal. b. conteúdo dos cornos uterinos (1 gota/corno) após lavagem com 1 ml de D-PBS + soro fetal bovino para posterior inspeção e avaliação de embriões através de lupa estereomicroscópica. 45
- Figura 3-** Valores em porcentagem (%) de taxa copulatória em fêmeas de camundongos dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC). 51
- Figura 4-** Valores em porcentagem (%) de taxa de gestação de fêmeas com plug em fêmeas de camundongos dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC). 52
- Figura 5-** Valores em porcentagem (%) de taxa de gestação total em fêmeas de camundongos dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC). 53
- Figura 6-** Valores médios e desvio-padrão do número de embriões viáveis de fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC). 54
- Figura 7-** Valores médios e desvio-padrão do número de embriões degenerados de fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC). 55

<b>Figura 8-</b>	Valores médios e desvio-padrão do número de fetos por fêmea em fêmeas camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	56
<b>Figura 9-</b>	Valores médios e desvio-padrão do número de reabsorções por fêmea em camundongas ( <i>Mus musculus</i> ) do grupo halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	57
<b>Figura 10-</b>	Valores médios e desvio-padrão do número de implantações por fêmea em fêmeas de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	58
<b>Figura 11-</b>	Valores médios e desvio-padrão do tamanho fetal (mm) de fetos de fêmeas de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ANOVA</b>	=	Análise de variância
<b>ASA</b>	=	Sociedade americana de anestesiologia
<b>CAM</b>	=	Concentração alveolar mínima
<b>CAV</b>	=	Centro de Ciências Agroveterinárias
<b>CETEA</b>	=	Comitê de ética e bem-estar animal
<b>D-PBS</b>	=	Dullbeco's salina tamponada fosfatada
<b>ETCO<sub>2</sub></b>	=	Pressão parcial de dióxido de carbono ao final da expiração
<b>ETsevo</b>	=	Concentração de sevofluorano ao final da expiração
<b>FiO<sub>2</sub></b>	=	Fração inspirada de oxigênio
<b>GC</b>	=	Grupo controle
<b>GI</b>	=	Grupo isofluorano
<b>GH</b>	=	Grupo halotano
<b>GS</b>	=	Grupo sevofluorano
<b>HZ</b>	=	Hertz
<b>I:E</b>	=	Relação Inspiração/expiração
<b>min</b>	=	Minuto
<b>ms</b>	=	Milisegundos
<b>NIOSH</b>	=	National institute for occupational safety and healthy
<b>ppm</b>	=	Parte por milhão
<b>SC</b>	=	Santa Catarina
<b>T°C</b>	=	Temperatura em graus Celsius

**UDESC** = Universidade do estado de Santa Catarina

**V** = Volts

**V%** = Volume por cento

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	21
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	24
1.1 <b>Biologia/Camundongos</b>	24
1.2 <b>Fisiologia da reprodução</b>	25
1.3 <b>Embriologia</b>	26
1.4 <b>Concentração alveolar mínima (CAM)</b>	28
1.5 <b>Hiperóxia</b>	30
1.6 <b>Halotano</b>	31
1.7 <b>Isoflurano</b>	33
1.8 <b>Sevoflurano</b>	34
1.9 <b>Riscos da exposição aos anestésicos inalatórios</b>	37
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	41
2.1 <b>ANIMAIS</b>	41
2.2 <b>EXPOSIÇÃO AOS ANESTÉSICOS INALATÓRIOS</b>	41
2.3 <b>MANEJO REPRODUTIVO</b>	43
2.4 <b>EUTANÁSIA</b>	44
2.5 <b>AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES E DA GESTAÇÃO</b>	45
2.5.1 <b>AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES</b>	45
2.5.1.1 <b>Número de embriões viáveis por fêmea</b>	46
2.5.1.2 <b>Número de embriões degenerados por fêmea</b>	46
2.5.2 <b>AVALIAÇÃO GESTACIONAL</b>	46

<b>2.5.2.1 Número de fetos por fêmea</b>	47
<b>2.5.2.2 Número de reabsorções por fêmea</b>	47
<b>2.5.2.3 Número de implantações por fêmea</b>	47
<b>2.5.2.4 Tamanho fetal</b>	48
<b>2.5.3 Avaliação histopatológica</b>	48
<b>2.6 ÍNDICES REPRODUTIVOS</b>	48
<b>2.6.1 Taxa copulatória</b>	49
<b>2.6.2 Taxa de gestação de fêmeas com “plug” vaginal</b>	49
<b>2.6.3 Taxa de gestação total</b>	49
<b>2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	49
<b>3 RESULTADOS</b>	51
<b>3.1 ÍNDICES REPRODUTIVOS</b>	51
3.1.1 TAXA COPULATÓRIA	51
3.1.2 TAXA DE GESTAÇÃO DE FÊMEAS COM “PLUG” VAGINAL	52
3.1.3 TAXA DE GESTAÇÃO TOTAL	52
<b>3.2 NÚMERO DE EMBRIÕES VIÁVEIS E DEGENERADOS POR FÊMEA</b>	53
<b>3.3 NÚMERO DE FETOS POR FÊMEA</b>	55
<b>3.4 NÚMERO DE REABSORÇÕES POR FÊMEA</b>	56
<b>3.5 NÚMERO DE IMPLANTAÇÕES POR FÊMEA</b>	57
<b>3.6 TAMANHO FETAL</b>	58
<b>3.7 OCORRÊNCIA DE TERATOGENIA E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA</b>	59
<b>4 DISCUSSÃO</b>	60
<b>5 CONCLUSÕES</b>	74
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	75
<b>7 ANEXOS</b>	83



## INTRODUÇÃO

A exposição a resíduos de gases anestésicos dentro de um centro cirúrgico é um problema enfrentado rotineiramente por profissionais que trabalham dentro deste ambiente. Essa preocupação se estende já há algum tempo, visto que até os dias atuais não se tem um consenso sobre quais os valores limites para tal exposição, ou valores para um anestésico específico, já que muitas clínicas e hospitais veterinários não possuem um adequado sistema de despoluição de gases em seus centros cirúrgicos e não há preocupação quanto á necessidade do mesmo.

Partindo para o âmbito da saúde dos profissionais que trabalham nestes ambientes, ainda não se tem resultados concretos sobre qual o real prejuízo que esta exposição contínua pode levar aos mesmos. Entre os efeitos mais comuns provocados pela exposição aos anestésicos inalatórios após um dia de rotina de um anestesista estão incluídos cefaléia, fadiga, náusea, irritabilidade, e diminuição dos reflexos. Vaisman em 1967 realizou um estudo pioneiro, demonstrando resultados de uma pesquisa realizada na antiga União Soviética, avaliando exames de saúde de 198 anestesistas do sexo masculino e 110 do sexo feminino. Todos utilizavam em sua prática diária o éter dietílico, óxido nitroso e halotano. Novamente, alto índice de sintomas, como cefaléia, fadiga e irritabilidade foi encontrado, mas também, e pela primeira vez, os efeitos adversos sobre a reprodução humana foram analisados. Dezoito de 31 gestações (60%) das anestesistas incluídas neste estudo resultaram em abortamento espontâneo. Outros problemas associados a exposição contínua a resíduos de anestésicos inalatórios são as injúrias hepáticas e renais com maior incidência em profissionais rotineiramente expostos (BRUNT, 1991; BERGHAUS, 1999).

A intensidade da exposição depende de alguns fatores, principalmente se o centro cirúrgico possui ou não um eficiente sistema de exaustão de gases, e

também de boas práticas de anestesia. Outros cuidados de suma importância é a manutenção adequada dos aparelhos de anestesia inalatória mantendo conexões, vedações e borrachas integras evitando dessa forma possíveis vazamentos.

Do ponto de vista reprodutivo, ainda muito se questiona quanto à segurança frente à exposição á resíduos de anestésicos inalatórios. Estudos realizados na década de 1970 nos Estados Unidos e Reino Unido evidenciaram maior prevalência de abortos em mulheres anestesistas, do que naquelas que trabalhavam fora do ambiente cirúrgico. Também se observou a maior incidência de anomalias congênitas em filhos de mulheres e homens anestesistas (ARNOLD III, 2000).

Muitos trabalhos já foram realizados, porém a maioria são estudos retrospectivos, com muitas falhas na obtenção de dados, não levando em conta outros fatores predisponentes encontrados dentro de um ambiente cirúrgico como radiação, estresse, extremos de temperatura, exposição à patógenos ou outras substâncias químicas (GUIRGUIS, 1990; HEMMINKI, 1985). Outros não levaram em consideração que estes profissionais poderiam estar expostos a uma mistura de gases, além de ausência de informações relevantes como tempo de exposição, ou níveis de exposição aos gases anestésicos (WEINBERG, 1998). Estudos utilizando roedores, para avaliação de efeitos teratogênicos observando anormalidades em sua prole (com costelas supranumerárias, fenda palatina) foram realizados, porém simulando situações como exposições a níveis elevados de anestésicos inalatórios, ou por períodos muito prolongados, o que não condizem com a realidade enfrentada por um profissional (WHARTON et al 1979; STURROCK, 1975; FINK, SHEPARD & BLANDAU 1967).

A realização deste estudo corrobora com a observação de resultados contraditórios encontrados na literatura quanto á toxicidade reprodutiva e orgânica frente a exposições crônicas á anestésicos inalatórios. Outro ponto importante se dá pela observação de trabalhos realizados apenas com halotano e isoflurano onde nota-se a carência de estudos com o sevoflurano, talvez por ser um dos inalatórios mais recentes introduzidos na prática anestésica

O objetivo do presente trabalho é avaliar a quantidade e viabilidade de embriões, de fetos e efeitos teratogênicos através de morfologia externa em fetos de fêmeas de camundongos, assim como a fertilidade destas após exposição prévia

aos três anestésicos inalatórios mais rotineiramente utilizados: halotano, isoflurano ou sevoflurano.

### **Hipóteses**

A exposição ao anestésico inalatório halotano exerce influência na fertilidade, viabilidade embrionária e gestacional de camundongas.

A exposição ao isoflurano ou sevoflurano não afetam a fertilidade, viabilidade embrionária e gestacional de camundongas.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Biologia/Camundongos

O camundongo é membro da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. Essa classificação é a mais aceita; todavia, há controvérsias sobre espécies criadas em laboratórios devido à presença de cruzamentos especiais, nos quais os animais apresentam alguns genes ou, até mesmo, cromossomos de espécies diferentes. Sua introdução como animal de laboratório deve-se principalmente ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curta, ser de fácil domesticação e manutenção. Logo, tornou-se o mamífero mais usado na experimentação animal (SANTOS, 2002).

A idéia da utilização de animais em pesquisas são vantajosas comparado a outros métodos, levando em consideração que os modelos animais fornecem informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos (HEYWOOD, 1987; RIBEIRO, 1995; SALÉN, 1995; SNITKOFF, 2004). Animais de laboratório são utilizados em pesquisas de várias profissões como medicina, medicina veterinária e biologia, bem como diferentes áreas do conhecimento, tais como farmacologia, toxicologia, cirurgia e genética. Diversas espécies animais são utilizadas para estes experimentos.

O camundongo é o animal experimental de escolha em várias áreas, por ser de fácil criação e manipulação, ter uma reprodução rápida, comportamento dócil, resistência a infecções e traumas cirúrgicos, larga diversidade genética, grande similaridade biológica e disposição anatômica das estruturas internas, quando comparada à espécie humana (FLEGAL e KUHLMAN, 2004).

Influências externas como as causadas pelas condições do meio ambiente (temperatura, umidade e iluminação) e aquelas disponíveis no microambiente, como natureza da cama do animal e frequência de troca, número de animais na caixa, a

freqüência no manuseio e a qualidade da água e da dieta, devem ocorrer em condições padronizadas e a intervalos regulares (FOSTER 1983; SAIZ MORENO,1983; CLOUGH, 1984; RIVERA, 1992). O ciclo ótimo de luminosidade é de 12 horas de luz, 12 horas de escuro, pouca luz ou escuridão podem reduzir a fertilidade de camundongas (FOSTER, 1983), e apresenta como temperatura ambiente ideal entre 20 e 24°C.

Para maior conforto do animal em gaiola, o piso deve ser recoberto por material apropriado chamado de cama, visando o conforto próprio, nidificação e absorção da umidade das excretas, permitindo assim a criação de um habitat próximo ao natural. A cama pode ser um substrato ou material qualquer que atenda a finalidade, desde que seja macia, isenta de odor, apresente alta capacidade de absorção, seja constituída de partes pequenas e finas e isenta de resíduos químicos de agrotóxicos. Deve ser de fácil obtenção e não poluente. Embora sejam utilizados materiais como vermiculita e palha de arroz, entre outras, o mais adequado é a maravalha de pinus (PASSOS, 2006).

## **1.2 Fisiologia da reprodução**

O camundongo torna-se apto à reprodução aos 60 dias de idade, sendo que os efeitos hormonais iniciais já estão presentes em ambos os sexos ao redor dos 30 dias de idade, evidenciando-se através da abertura da vagina nas fêmeas e pela descida e aumento dos testículos nos machos (CHORILLI et al, 2007).

As camundongas são poliéstricas, apresentando ciclos durante todo o ano com duração de quatro a cinco dias, ou seja a cada cinco dias ocorre ovulação sendo o ciclo dividido em proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro começa com a fase folicular do ovário, que culmina no estro (cio) o qual tem duração de 12 á 14 horas. Quanto á ovulação as camundongas apresentam ovulação espontânea que ocorre dentro de 8 a 12 horas após o início do cio, entretanto o corpo lúteo é formado apenas com a ocorrência do acasalamento. A ovulação não acompanha cada estro, em contrapartida o estro pode não coincidir com cada ovulação, devido ao estro ser dependente de hormônios gonadais, enquanto a ovulação é responsiva

a gonadotrofina. A ciclicidade do estro e ovulação é controlada pelo ritmo diurno do fotoperíodo. Acasalamento, estro e ovulação ocorrem com maior frequência durante a fase escura do fotoperíodo (JACOBY et al, 2002). O metaestro e diestro caracterizam-se pela fase luteínica do ovário. Quando agrupadas, porém, as fêmeas podem permanecer em anestro (ausência de ciclo estral) continuamente até que sejam expostas a um macho (CHORILLI, 2007).

Subseqüente a primeira exposição com os machos para acasalar ou na presença da urina destes, as fêmeas de camundongos acabam entrando em cio três dias após o primeiro contato, em sincronia (efeito Whitten) (EASSON, 2001). A presença de líquido seminal na vagina indica a ocorrência da cópula. Esse líquido solidificado é bem aparente (chamado plug ou placa vaginal), mas desaparece em 24 horas (SANTOS, 2002). O período de gestação é de 19-21 dias, exceto para fêmeas que estejam amamentando, quando a gestação pode se prolongar por seis dias (CHORILLI et al, 2007).

### **1.3 Embriologia**

É o estudo das etapas e dos mecanismos de formação do embrião, que abrange o período que vai desde a segmentação da célula-ovo até o nascimento do novo indivíduo. O zigoto é uma célula altamente especializada totipotente resultante da união de um espermatozóide e um ovócito, contendo os cromossomos e genes derivados do pai e da mãe. A fertilização ocorre na ampola da tuba uterina, e é uma complexa seqüência de “eventos moleculares coordenados” que se inicia com o contato entre um espermatozóide e um ovócito e termina com a mistura dos cromossomas maternos e paternos durante a singamia na metáfase da primeira divisão mitótica do zigoto. A fertilização se completa cerca de entre 20 - 24 horas após a cópula (THEILER, 1989). A clivagem é característica por uma série de divisões mitóticas repetidas do zigoto, resultando em rápido aumento do número de células, sendo que em camundongas a primeira clivagem ocorre cerca de 24 horas após a cópula. Estas células agora denominadas blastômeros, tornam-se menores a cada divisão da clivagem. Inicialmente, o zigoto se divide em dois blastômeros, que se dividem em quatro, oito e assim sucessivamente. A clivagem ocorre enquanto o

zigoto passa pela tuba uterina em direção ao útero. Durante a clivagem, o zigoto situa-se dentro da zona pelúcida (NAGY, 2003).

Após o estágio de oito células os blastômeros sofrem o fenômeno chamado compactação, onde alinham-se e se unem formando uma bola compacta de células. Cerca de 48 horas após a cópula, os embriões atingem o estágio de mórula uma massa compacta de células (do latim *morus*: amora) se localizando próxima a junção útero-tubárica (THEILER, 1989). A diferença no número de células nesta fase se deve a diferentes momentos de fertilização. As células internas da mórula (ou embrioblasto) estão circundadas por uma camada de células achatadas que formam a massa celular externa, ou trofoblasto. Quando a mórula chega aos cornos uterinos cerca de 72 horas após a cópula, começa a receber fluidos uterinos e no interior da massa compacta de células começam a aparecer pequenos espaços cheios de líquidos, nesse estágio recebendo o nome de blastocisto (16 - 40 células). As células migram para a periferia e o interior forma uma ampla cavidade preenchida por líquido (blastocelo) (MOORE, 1990). O blastocisto aumenta de volume, o que determina a fragilização da zona pelúcida que se rompe permitindo a saída do embrião. Com 96 horas o blastocisto apresenta-se sem a zona pelúcida, e invariavelmente se localiza no lúmen uterino. A implantação ocorre cerca de 120 horas após a cópula, onde no fim da primeira semana se nota uma implantação superficial no endométrio uterino (NAGY, 2003).

No início da segunda semana a implantação do blastocisto se completa e inicia a formação da cavidade amniótica (âmnio). Com sete dias e meio a cavidade amniótica é fechada, tendo neste momento três cavidades distintas: a cavidade amniótica, o exoceloma e a fenda ectoplacental. A fase de gastrulação também inicia-se na segunda semana e consiste na formação da gástrula a partir do recurvamento do disco embrionário situado no interior do blastocisto, formando as primeiras células mesodermiais (NAGY, 2003). A gastrulação é o início da morfogênese (onde já se tem o arquêntero que corresponde ao intestino primitivo, e o blastóporo que posteriormente formará o ânus), e corresponde a fase em que se diferenciam os folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) que darão origem aos diferentes tecidos e órgãos. Posterior a gastrulação segue o processo de neurulação que é a fase de formação do tubo neural (MOORE, 1990). No decorrer da segunda semana o embrião completará a formação de seus órgãos

internos e membros, ocorrendo no fim da segunda semana a separação dos dedos nos membros anteriores e posteriores. Durante a terceira semana o embrião ganha folículos capilares, desenvolve o sistema de audição e fechamento das pálpebras, ocorrendo no fim desta mesma semana o nascimento do feto (THEILER, 1989).

Com relação aos anexos embrionários nos mamíferos, a o âmnio representa a fina membrana que delimita uma bolsa repleta de líquido, líquido esse com a função de proteção contra choque mecânicos, e evitar o ressecamento do feto. O saco vitelínico é pouco desenvolvido nos mamíferos, e tem como função nestes, a produção de hemácias nos primeiros dias de vida do embrião. O córion é o anexo mais externo que engloba os demais anexos, e nos mamíferos une-se a parede uterina para formar a placenta. O alantóide é uma membrana em forma de saco ligada a parte posterior do intestino, sendo pouco desenvolvida nos mamíferos e formará o cordão umbilical o qual é uma exclusividade dos mamíferos. E a placenta que é uma estrutura vascularizada exclusiva dos mamíferos formada pelo córion, alantóide e endométrio materno sendo por alguns autores não considerada como um anexo. A placentação de roedores acaba sendo bastante semelhante à placentação humana sendo por isso este animal de laboratório muito utilizado para pesquisas na área de reprodução.

#### **1.4 Concentração alveolar mínima (CAM)**

A concentração alveolar mínima (CAM) é a medida na qual se expressa à potência de um anestésico inalatório, sendo definida como a concentração de um anestésico em 1 atmosfera, necessária para abolir movimentos em resposta a um estímulo doloroso em metade dos pacientes testados (QUASHA, 1980).

O conceito da CAM foi introduzido por Merkel e Eger em 1963, com objetivo de comparação entre os efeitos de dois anestésicos voláteis (halotano e halopropano) sobre os parâmetros respiratórios, cardiovasculares e hemogasométricos de cães. Esses autores utilizaram a concentração alveolar mínima como um índice de comparação entre os agentes utilizados. Desde sua definição, a CAM passou a ser utilizada como o principal índice para comparar a

potência dos anestésicos inalatórios (QUASHA et al., 1980; VALVERDE et al., 2003).

O valor de CAM é inversamente proporcional á potência anestésica, ou seja, um anestésico inalatório que tem um valor de CAM baixo é mais potente do que um anestésico inalatório com valor de CAM alto (KEEGAN, 2004). Ao atingir a CAM, significa que no sangue e nos tecidos do sistema nervoso central há uma concentração semelhante de anestésico inalatório, ou uma quantidade praticamente igual a do alvéolo em volumes percentuais e pressão parcial suficiente para inibir a sensibilidade dolorosa em 50% dos pacientes (EGER et al., 1965). Alguns fatores podem alterar a CAM de maneira significativa, como hipercapnia, hipo ou hipertermia, acidose metabólica, ritmo circadiano, idade, fármacos (EGER et al., 1965; MUNSON, 1970; PALAHNIUK et al., 1974; STEFFEY & EGER, 1974; QUASHA et al., 1980).

Para a determinação da CAM de forma precisa, três requisitos fundamentais devem ser atingidos: 1) utilização de um estímulo nociceptivo supramáximo; 2) determinação de critérios claros para definir as resposta motoras positivas e negativas desencadeadas pela estimulação nociceptiva; e 3) equilíbrio entre as concentrações anestésicas no ar alveolar, no sangue arterial e no sistema nervoso central (SNC) (QUASHA et al., 1980).

São vários os métodos utilizados para determinar a CAM utilizando estímulos nociceptivos, entre eles a utilização de estímulos mecânicos, elétricos, pinçamento interdigital e de cauda, incisão cirúrgica e movimentação de sonda endotraqueal. Em cães o estímulo elétrico (50V, 50HZ, 10ms) é um estímulo supramáximo. A incisão cirúrgica da pele no homem pareceu ser um estímulo mais intenso do que a estimulação elétrica (30-45V, 50Hz, 1,2ms), (SAIDMAN & EGER, 1964) sendo esse o estímulo de eleição na determinação da CAM em pacientes humanos (EBERT & SCHMID, 2004).

Para a obtenção de valores precisos de CAM, é necessário que as concentrações anestésicas no ar alveolar, no sangue arterial e no SNC estejam em equilíbrio no momento da aplicação do estímulo (QUASHA et al., 1980). Um período de 15 minutos foi considerado suficiente para se atingir 95% de equilíbrio entre as concentrações anestésicas de halotano no sangue arterial e no SNC. Para anestésicos menos solúveis, como o isoflurano, sevoflurano e desflurano, estima-se

uma proximidade ainda mais perto de 100% de equilíbrio após esse período (EGER et al., 1965). Embora possam existir diferenças entre a concentração expirada e a concentração anestésica no sangue arterial, é aceito que essa diferença seja mínima em animais saudáveis, sob anestesia com anestésicos de baixo coeficiente de partição sangue/gás e cuja ventilação e débito cardíaco encontrem-se dentro de limites normais (QUASHA et al., 1980).

### **1.5 Hiperóxia**

A exposição a altas concentrações de oxigênio produz alterações do trato respiratório em seres humanos e outros animais, que ocorrem no epitélio pulmonar, na rede arterial pulmonar, nos septos alveolares e também no espaço pleural. A exposição a concentrações de oxigênio maiores que 50% por períodos prolongados causa lesão pulmonar hiperóxica aguda (BHANDARI, 2006). Essa resposta é caracterizada por danos ao epitélio e endotélio com extravasamento de proteínas. Achados experimentais mostram disfunções como atelectasias, edema alveolar intersticial, derrame pleural e modificações na função e estrutura celular. As alterações morfológicas decorrentes da inalação de concentrações elevadas de oxigênio foram descritas inicialmente em 1897 por J. Lorraine Smith, que caracterizou os achados histológicos agudos incluindo, atelectasia, inflamação, congestão vascular e edema alveolar relacionadas à toxicidade do oxigênio (CRAPO, 1986). Valença (2007) observou após a exposição de oxigênio a 100% com um fluxo de 5 L/min em ratos wistar por 10, 30 ou 90 minutos aumento no número de macrófagos, neutrófilos e aumento do dano oxidativo quando comparados ao grupo controle. Através de análise histológica e estereológica, com 90 minutos de exposição observou um aumento de influxo de células inflamatórias e hemácias para os alvéolos e septos, evidenciando congestão, hemorragia e edema de septo.

Pereira (2009), após a exposição a oxigênio 100% durante 72 horas com um fluxo de 12 L/min em ratos wistar, observou valores de diâmetro de septos alveolares 0,62  $\mu\text{m}$  no grupo hiperóxia, com uma diferença bastante evidente em relação ao controle (0,38  $\mu\text{m}$ ). Porém achados como inflamação aguda ou crônica,

edema ou hemorragia alveolar, desnudamento de áreas com epitélio ou atelectasia não foram observados neste trabalho.

## 1.6 Halotano

Dentre os agentes halogenados, o halotano é o que possui valor de CAM mais baixa (1,33%) para a linhagem de camundongos Balb/C (SONNER et al, 2000) conferindo-lhe maior potência, porém possui coeficiente de solubilidade sangue:gás de 2,54, o que lhe garante características como indução e recuperação mais prolongadas que os demais halogenados. Entre os halogenados é o que possui maior taxa de metabolização hepática (20% na espécie humana) no sistema enzimático do citocromo P-450, tendo como produtos de sua metabolização o ácido trifluoroacético, bromo e íons cloreto. De acordo com Oliva (2002), as concentrações clínicas de halotano utilizadas nas diferentes espécies variam em até 4% para indução. Para indução anestésica com halotano a vaporização deve encontrar-se entre 4 a 5% e para manutenção entre 1 e 3%. Quando se opta por indução com uso de halotano em caixas de indução, a dose recomendada é de 0,5 a 1,5%. Apesar do halotano atravessar a barreira placentária com facilidade, não ocorre depressão da atividade respiratória do feto, a menos que o plano anestésico utilizado seja muito profundo (OLIVA, 2002).

Wharton et al (1979) em 23 fêmeas de camundongas gestantes expostas a 4 CAM diárias de halotano durante 9 semanas prévias a concepção e durante a gestação, observou letalidade em 14 fêmeas, sendo que de 9 fêmeas sobreviventes, 8 tiveram 100% embriotoxicidade. A fêmea que progrediu com a gestação teve 4 fetos, sendo que estes apresentavam malformações como fenda palatina, anoftalmia, assimetria de crânio, costelas ou vértebras fusionadas, e anormalidades em membros. Porém a exposição realizada por Wharton et al (1979), não condiz com os níveis encontrados em centros cirúrgicos. Também concluiu que não há evidência experimental que indique que a exposição a concentrações subanestésicas de halotano seja significativamente embriotóxica ou teratogênica, não observando nenhuma anormalidade maior ou menor nos estudos por ele

realizados. Segundo este autor existe uma ampla margem de segurança entre níveis de halotano que estão presentes na sala cirúrgica e aqueles que resultam em alterações detectáveis no desenvolvimento embriológico de roedores.

Sturrock (1975), afirma que o halotano não possui efeitos negativos quanto à sobrevivência de células de fibroblastos de hamsters chinesas, onde estas células foram cultivadas *in vitro* em suspensão e expostas ao halotano por até 24 horas.

Descendentes de fêmeas de camundongos expostas ao halotano durante a prenhez, e expostos após os cinco primeiros dias de vida, 3 vezes por semana, durante um período de 78 semanas não apresentaram alterações morfológicas na necropsia e ainda não apresentaram qualquer indício de carcinogênese (BADEN et al., 1979).

Mazze (1986) não encontrou qualquer efeito teratogênico em 5178 descendentes de 305 ratas da linhagem sprague-dawley, expostas ao halotano, isoflurano e enflurano por 6 horas diárias, em três diferentes fases gestacionais onde foram avaliados para tal, conformação morfológica dos recém nascidos e futuras progênes. Não foram observados efeitos prejudiciais na reprodução destas fêmeas, concordando com Wharton et al. (1978), que ainda afirmam que o halotano não produz em camundongos problemas de fertilidade ou reprodução.

Em estudo realizado com fêmeas prenhes de camundongos da linhagem swiss ICR, após exposição destas durante a prenhez aos anestésicos inalatórios halotano, isoflurano e metoxiflurano, por 2 horas, em 4 exposições com intervalos de 2 dias, os recém nascidos não apresentaram nenhuma alteração como má formação fetal ou carcinogênese. Este estudo se estendeu até os 15 meses de vida dos filhotes, continuando estes a serem expostos aos anestésicos, com mais 24 exposições, sendo uma a cada três dias. Ao final avaliou-se os 1973 descendentes e não se constatou qualquer alteração carcinogênica ou teratogênica (EGER, et al. 1978). Estudo este concordando com Coate et al. (1979), que afirmam que o halotano não possui efeito carcinogênico ou de má formação fetal.

Exposições de halotano e enflurano tanto em mães quanto em pais de filhotes de camundongos, não denotaram qualquer efeito teratogênico nestes, ou mesmo qualquer alteração na capacidade reprodutiva tanto dos pais quanto de seus descendentes (HALSEY et al., 1981) (tabela 1).

## 1.7 Isoflurano

O isoflurano é um isômero do enflurano, apresenta CAM de 1,66 (para camundongos Balb/C) (SONNER et al, 2000) lhe conferindo alta potência anestésica e seu baixo coeficiente sangue:gás permite indução e recuperação anestésicas rápidas. Entre os halogenados em uso atualmente é o que possui menor taxa de metabolização hepática (0,2% do anestésico inalado), tendo como principal composto de sua metabolização o ácido trifluoroacético.

Mazze (1985), após exposição de camundongas á isoflurano á 0,1% ou 0,4% por quatro horas diárias durante duas semanas não observou diferença em relação ao grupo controle, em índices como taxa de gestação total, taxa copulatória, índice de perdas reprodutivas. Nas concentrações empregadas, o isoflurano não afetou a fertilidade, reprodução ou sobrevivência pós-natal da descendência dos camundongos. As ações antiproliferativas do isoflurano não são mais colocadas como verdade absoluta, devido a experimentos realizados, onde células embrionárias são cultivadas *in vitro* (O'LEARY et al., 2000). Baden et al. (1988) afirmam após exporem 167 fêmeas gestantes de camundongos ao isoflurano durante várias fases de gestação, que os descendentes destas não possuem qualquer sinal de carcinogênese que possa ser feito pelo isoflurano.

Lee et al (1994), avaliaram os efeitos das concentrações clínicas do isoflurano na fertilização *in vitro* em camundongas. Ovócitos de camundongas foram expostos ao ar, mistura de oxigênio + óxido nitroso ou oxigênio + óxido nitroso + 5000 ppm de isoflurano. Após a exposição, os ovócitos eram fertilizados e se realizava a inseminação, sendo após esse último procedimento avaliado o desenvolvimento dos zigotos. Como resultados a taxa de fertilização e taxa de crescimento embrionário inicial foram similares nos três grupos.

Os efeitos reprodutivos e teratogênicos do isoflurano foram estudados por Fujinaga et al (1987) em ratas sprague-dawley que foram expostas ao ar, ou 3500 ppm de isoflurano durante 24 horas no oitavo dia de gestação. A exposição não afetou o número de implantações, de reabsorções, fetos vivos, ou peso médio fetal. Também não foram encontradas aumento da incidência de anormalidades viscerais

ou esqueléticas. As ratas expostas ao isofluorano apresentaram-se superficialmente sedadas durante a exposição e o peso corporal dessas foram significativamente menores nos dias 12, 14 e 16 da gestação em relação aos controles. Ratos sprague-dawley foram expostos 6 horas/dia durante 8º ao 10º, 11º ao 13º ou 14º ao 16º dia de gestação a 10.500 ppm de isofluorano ou ar (controle). Com isofluorano as fêmeas foram levemente anestesiadas, e o ganho de peso foi significativamente reduzido comparado ao controle. Após laparotomia no 21º dia de gestação, observou-se reduzido peso fetal nos descendentes das ratas expostas entre os dias 8º-10º e 14º-16º da gestação, por outro lado não houve diferença nos índices reprodutivos, nem na incidência de malformações nos grupos expostos (MAZZE et al, 1986).

Camundongas Jcl:ICR de 10 semanas de idade foram expostas a 0, ou entre 15000-20000 ppm de isofluorano por um período de 8 horas no 7º dia de gestação. Na avaliação gestacional no 18º dia de gestação, o peso fetal e número de vértebras sacrococcígeas ossificadas foram significativamente reduzidos nos descendentes do grupo exposto quando comparados com os descendentes do grupo controle (HAQUE, 2004). Em um estudo realizado em coelhas expostas nos dias 6º ao 9º, 10º ao 14º ou 15º ao 18º dia de gestação a 23000 ppm de isofluorano 1 hora por dia, sendo sacrificados no dia 29 de gestação, não observou efeitos reprodutivos adversos, e também não foi observado evidências de teratogenia (KENNEDY, 1977) (tabela 1).

## **1.8 Sevofluorano**

O sevofluorano foi introduzido na prática clínica na década de 1970, porém devido a suspeita de ser instável em cal sodada e de que possuiria efeito nefrotóxico, impediu sua comercialização. Somente no início da década de 1990 após aquisição de sua patente pelo Japão e realizado novas pesquisas comprovando sua aplicabilidade clínica, foi reintroduzido na prática anestesiológica (SCHELLER, 1992). Dentre suas características, possui taxa de metabolização hepática de 5,0%, coeficiente de solubilidade sangue/gás de 0,68 e CAM em

camundongos de 2,5% (PUIG et al, 2002). Esse valor de CAM possibilita a classificação do sevoflurano como um anestésico de média potência e seu baixíssimo coeficiente de solubilidade resulta em duas de suas maiores vantagens que são a indução e a recuperação anestésicas rápidas (OLIVA, 2002). Os principais metabólitos após sua metabolização hepática são fluoretos inorgânicos e hexafluoroisopropanol.

O uso rotineiro do sevoflurano é recomendado para pacientes de alto risco, toxêmicos ou em prenhez, aconselha-se a indução por poucos minutos a 3% e manutenção de 1 a 2 %. A recuperação costuma ser muito rápida (MASSONE, 2003). De acordo com Natalini (2001), o sevoflurano não produz depressão fetal importante, pois é rapidamente eliminado quando o recém nascido assume a respiração pulmonar. Ainda a hipótese de que o sevoflurano pudesse exercer ação anti proliferativa em células embrionárias foi descartada por O'leary et al. (2000).

Em estudo realizado em coelhos machos expostos a 23000 ppm de sevoflurano 4 horas/dia, durante 5 dias consecutivos, observou-se que no 12º dia após o fim da exposição, a concentração espermática diminuiu 50% em relação aos valores de pré-exposição, ausência total da motilidade dos espermatozóides no 26º dia após a exposição, retornando aos valores da pré-exposição no 41º dia, demonstrando uma diminuição na qualidade do sêmen em coelhos expostos ao sevoflurano, em valores próximos a 1 CAM (CEYHAN, 2005).

Setoyama et al (2003), realizou um estudo em cabras gestantes para avaliação dos efeitos hemodinâmicos materno-fetal com propofol e sevoflurano. A anestesia foi induzida com propofol em 10 cabras gestantes, e após a indução os animais inalaram 27000 e 41000 ppm de ETsevo durante 30 minutos em cada concentração e depois foram recuperados da anestesia. Observando os valores pré-anestésicos, o sevoflurano causou mudanças mínimas na hemodinâmica materna. A pressão sanguínea fetal diminuiu significativamente durante os últimos minutos da exposição á 27000 ppm, e se manteve baixa durante toda a exposição a 41000 ppm de sevoflurano. As contrações uterinas desapareceram durante a administração de sevoflurano, mas retornaram 15 minutos após o término da exposição.

Entretanto trabalhos demonstrando os efeitos do sevoflurano sobre a atividade reprodutiva ainda são escassos, talvez por ser um dos mais recentes anestésicos inalatórios introduzidos na rotina clínica.

Tabela 1 - Trabalhos realizados com diferentes metodologias e unidades experimentais para a exposição á diferentes anestésicos inalatórios.

<b>Autores</b>	<b>Unidade experimental</b>	<b>Exposição</b>	<b>Resultados</b>
Sturrock (1975)	Fibroblastos de hamsters chinesas.	Exposição <i>in vitro</i> durante 24 horas á 2% de halotano.	Retardo na divisão celular.
Eger et al (1978)	Fêmeas de camundongos swiss ICR durante a prenhez.	Exposição ao halotano, isofluorano ou metoxifluorano durante 2 horas, 4 exposições com intervalos de 2 dias.	Sem alterações em reabsorções, implantações ou evidência de teratogenia em fetos.
Wharton et al (1979)	23 fêmeas de camundongos	4 CAM de halotano, 9 semanas prévias e durante a gestação.	Letalidade em 14 fêmeas, 9 prenhes (8 100% de embriotoxicidade, e 1 com 4 fetos apresentando fenda palatina, assimetria de crânio, costelas lombares, vértebras lombares e anormalidades em membros.
Mazze (1985)	Fêmeas de camundongos	Expostas por 4 horas por dia durante duas semanas á 0,1 ou 0,4% de isofluorano.	Sem evidências de anomalias em descendentes.
Mazze (1986)	305 ratas sprague dawley	Expostas ao halotano, isofluorano ou enfluorano, durante 6 horas diárias em 3 diferentes fases gestacionais.	Sem efeitos prejudiciais em 5178 descendentes.
Fujinaga (1987)	Ratas sprague dawley	Expostas ao ar, 3500 ppm de isofluorano durante 24 h no 8º dia de gestação.	Sem alterações em implantações, reabsorções, ou em fetos.
Lee et al (1994)	Ovócitos	Espostas ao ar, oxigênio mais óxido nitroso ou oxigênio mais óxido nitroso mais 5000 ppm de isofluorano.	Fertilização e crescimento embrionário semelhantes em todos os grupos.
Kennedy (1977)	Coelhas	Expostas á 23000 ppm de isofluorano por 1 hora diária entre o 6º ao 10º, 10º ao 14º ou 15º ao 18º dia de gestação.	Sem alterações em índices reprodutivos ou evidência de teratogenias em fetos.

## 1.9 Riscos da exposição aos anestésicos inalatórios

As taxas de infertilidade, aborto espontâneo, pré-maturos e malformações congênitas da descendência são aumentadas em pessoas que trabalham dentro de salas cirúrgicas (VAISMAN, 1967). A incidência de abortos espontâneos na década de 80 era em média 30% maior em pessoas que trabalhavam dentro de salas cirúrgicas, em relação a uma população controle (COHEN, 1971; BURING, 1985). Segundo a Sociedade Americana de Anestesiologistas (ASA, 2004), dentre as principais causas de contaminação de salas cirúrgicas estão: falha ao desligar as válvulas de controle de fluxo, máscaras mal adaptadas, flushing do circuito respiratório, enchimento dos vaporizadores, tubos endotraqueais sem balonetes, sistemas respiratórios pediátricos, amostragem sidescram dos analisadores de gases, oclusão do sistema de escoamento de gases, escape no circuito de baixa pressão nos anéis de vedação e mangueiras.

A concentração dos vapores anestésicos no ambiente é medida em partes por milhão (ppm). Em centros cirúrgicos sem sistemas antipoluentes, o óxido nitroso e os agentes halogenados podem atingir concentrações de 3.000 e 50 ppm, respectivamente, no ambiente cirúrgico (OLIVA & FANTONI, 2010). O National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) recomenda que os valores máximos atingidos nos centros cirúrgicos sejam de 25 ppm para o óxido nitroso e dois ppm para os halogenados, e quando em combinação com óxido nitroso o máximo de 0,5 ppm para halogenados (ARNOLD III, 2000). Davenport (1980), observou em 20 hospitais britânicos sem sistema de drenagem de gases que os níveis de halotano e óxido nitroso na atmosfera de centros cirúrgicos podem ficar entre 0,1 á 60 e 30 á 3000 ppm respectivamente.

Estudos realizados na década de 1970, nos Estados Unidos e Reino Unido, evidenciaram a maior prevalência de abortos em mulheres anestesistas do que naquelas que trabalhavam fora do ambiente cirúrgico. Estudos sobre prevalência de tumores malignos não apresentou diferenças entre os grupos, mas nos anestesistas do sexo masculino houve maior ocorrência de doenças hepáticas. Todos esses trabalhos foram retrospectivos e muitas falhas na identificação de dados coletados foram identificadas, assim como a existência de outros fatores predisponentes nos

centros cirúrgicos, como estresse, radiação e contato com outras substâncias químicas. Estes resultados, portanto, são muito controversos e, atualmente bastante discutidos (ARNOLD III, 2000).

Whitcher (1971) observou que quando utilizado um sistema aberto ou semi-fechado e sem sistema de escoamento de gases da sala cirúrgica valores médios de halotano de 8,69 e 4,93 ppm respectivamente, e com a instituição de um sistema de escoamento de gases observou uma redução para o sistema aberto de 0,79 ppm (redução de 91%), e para sistema semi-fechado valores médios de 0,73 ppm (redução de 85%). Ainda Whitcher (1971) mensurou a concentração expirada de halotano em 27 enfermeiras que trabalhavam dentro de centro cirúrgicos, e 9 anestesistas, mensurando os valores expirados antes do início do dia de trabalho, e durante o dia de trabalho. Os valores médios para enfermeiras e anestesistas antes do início da rotina foram de 0,01 e 0,08 ppm respectivamente, e durante o dia de trabalho 0,21 e 0,46 ppm respectivamente. Também observou valores expirados de halotano maiores que 1 ppm em amostras de 6 anestesistas e em 1 enfermeira, e encontrou resíduos de halotano na expiração por até 16 horas após o fim da rotina de trabalho.

Guirguis (1990), avaliou o histórico reprodutivo de pessoas que trabalham dentro de centro cirúrgicos através de estudo retrospectivo com utilização de questionários enviados a 8032 pessoas que trabalhavam dentro de centros cirúrgicos e salas de recuperação, e 2525 pessoas que trabalhavam em hospitais porém fora de centros cirúrgicos, em hospitais da Província de Ontario/USA. Através de análise por meio de regressão logística, se observou uma maior incidência de abortos espontâneos e anormalidades congênitas em descendentes no grupo exposto a gases anestésicos.

No estudo retrospectivo realizado por Vaisman (1967), das 110 mulheres que trabalhavam em centros cirúrgicos e responderam ao questionário, 31 ficaram grávidas, sendo que 18 destas (58%) apresentaram aborto espontâneo, e em 1 descendente ocorreu anormalidades congênitas. Askrog & Harvald (1970) através de um questionário enviado á 752 enfermeiras e médicas, obteve dados de 212 gestações que ocorreram antes de trabalharem em ambiente cirúrgico (grupo não exposto), e 392 gestações na mesma população que ocorreram durante um período que trabalhavam dentro de ambiente cirúrgico (grupo exposto). Como resultados

observou uma taxa de incidência de abortos espontâneos no grupo exposto de 18,6%, quando comparado a 8,9% no grupo não exposto.

Knill-Jones et al (1972), em estudo retrospectivo no Reino Unido, após enviarem questionários a 1241 anestesistas e a um grupo controle de 1678 médicos que não trabalhavam em ambiente cirúrgico, observou que a proporção de abortos no grupo de anestesistas não diferiu significativamente em relação ao grupo controle. Porém observou que a proporção foi significativamente maior em anestesistas que trabalharam durante a gestação, em relação aos médicos do grupo controle que trabalharam durante a gestação. A taxa de anormalidades congênitas também foi maior (6,5%) em mulheres que trabalhavam durante a gestação em relação as que não trabalharam (4,9%).

Em estudo retrospectivo através de questionários enviados a enfermeiras expostas a gases anestésicos, drogas citostáticas ou radiação, não houve maior prevalência de abortos ou malformações na prole de enfermeiras que eram expostas a resíduos de gases anestésicos (óxido nitroso e halotano), agentes esterilizantes (óxido de etileno, glutaraldeído ou formaldeído) ou radiação (Raio- X). Entretanto houve maior incidência de malformações em crianças de enfermeiras que manuseavam drogas citostáticas (HEMMINKI, 1985).

Ward & Byland (1982), observaram após mensuração de halotano em 14 centros cirúrgicos de humanos e três centros veterinários, que centros com sistema de escoamento de gases apresentaram valores médios de halotano de 1,4 ppm, enquanto que salas que não possuem esse sistema apresentaram valores médios de 5,2 ppm, o que demonstra a eficiência do sistema de escoamento de gases. Em 10 das 17 salas cirúrgicas excederam o valor de 2 ppm, que é valor máximo permitido para anestésicos halogenados segundo a NIOSH. Também observaram valores em hospitais humanos de até 10 ppm, enquanto que em salas veterinárias valores de 2 ppm. Entre as explicações para essa discrepância de valores sugeriram que o tamanho das salas cirúrgicas em veterinária são menores quando comparados a centros cirúrgicos humanos, também que os procedimentos cirúrgicos em medicina veterinária possuem menor duração, e as portas das salas em veterinárias são deixadas abertas permitindo que o veterinário trabalhe simultaneamente em outra sala.

Hoerauf (1999), avaliando diferentes métodos de indução em humanos com máscara laríngea observou que os níveis de sevoflurano e óxido nítrico excediam 2 ppm e 50 ppm respectivamente, com sistema circular ou com reinalação parcial. Gentili et al (2004), em estudo realizado em pessoas que trabalham dentro de centros cirúrgicos pediátricos observou após utilização de métodos biomarcadores de exposição crônica ao sevoflurano. Como resultados obteve valores médios de 0,65, 0,17 e 0,07 ppm para zona respiratória em anestesistas, enfermeiras e cirurgiões respectivamente, e 2,1µg/L na urina dos anestesistas, observando ainda que o nível de 2 ppm excedeu em quatro de 22 anestesistas, em uma de 30 enfermeiras, e em nenhum cirurgião.

Frente aos trabalhos existentes quanto ao risco da exposição aos anestésicos inalatórios nota-se uma carência de informações á medida que observamos que muitos trabalhos realizados são retrospectivos com falhas na obtenção de dados, sendo que permanecem obscuros os reais efeitos de uma exposição crônica, e que os mesmos apresentam indícios de toxicidade reprodutiva e orgânica em profissionais que são rotineiramente expostos á gases anestésicos. Ainda trabalhos utilizando roedores para exposição foram realizados utilizando halotano e isoflurano, porém quando se trata do sevoflurano um dos mais novos anestésicos inalatórios introduzidos na prática clínica nota-se uma carência de trabalhos realizados quanto aos efeitos da sua exposição na atividade reprodutiva, o que denota a grande importância da realização de trabalhos sobre a exposição com este anestésico a fim de elucidar seus efeitos frente á exposição continuada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética e bem-estar animal do Centro de Ciências Agroveterinárias (CETEA/CAV-UDESC) pelo protocolo nº 1.30/06.

### 2.1 ANIMAIS

Para o experimento foram utilizados um total de 160 fêmeas de camundongos e 40 camundongos machos da linhagem Balb/C, adultos, hípidos, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando entre 30 e 50 g de peso vivo. No biotério, os mesmos foram mantidos em um ambiente sob condições controladas obedecendo fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro/dia (controlado através de timer), e com temperatura controlada entre 20 e 24°C (mantida através de condicionador de ar, e verificada por termômetros de ambiente). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno para camundongos, tendo como cama maravalha de madeira, e alimentados com ração comercial<sup>1</sup> e água *ad libitum*. As fêmeas foram distribuídas e alocadas em grupos de 10 animais/caixa, enquanto os machos alocados em caixas individuais. Nenhuma outra espécie animal ou linhagem de camundongos foi mantida no mesmo biotério.

### 2.2 EXPOSIÇÃO AOS ANESTÉSICOS INALATÓRIOS

Os animais foram alocados aleatoriamente em 5 grupos: oxigênio (GO),

---

<sup>1</sup> Supralab – Alisul alimentos S.A – Itajaí/SC – Brasil.

halotano<sup>2</sup> (GH), isofluorano<sup>3</sup> (GI) e sevofluorano<sup>4</sup> (GS) contando com um total de 20 animais em cada, e controle (GC) contendo 80 animais. Em cada grupo as fêmeas foram expostas ao anestésico correspondente, sendo que no GO as fêmeas foram expostas somente a oxigênio a 100%. Paralelamente a cada grupo que sofria exposição aos anestésicos inalatórios e submetidas aos machos, procedia-se um GC avaliando somente a parte reprodutiva, nas mesmas condições que as demais. Ao final o GC foi formado por 80 camundongas, correspondente aos controles dos grupos GO, GH, GI e GS.

Para a exposição aos anestésicos inalatórios foi confeccionada uma caixa anestésica em acrílico (40x40x10 cm figura 1a) com orifício para entrada e saída de gases anestésicos e oxigênio, de forma que com a instituição da ventilação controlada, se pudesse através do analisador de gases<sup>5</sup> mensurar durante todo o período de exposição a concentração a que esses animais estavam sendo expostos do específico anestésico.

No orifício de entrada/saída de gases da caixa anestésica foi acoplado tubo coletor do capnógrafo e analisador de gases do monitor multiparamétrico, e acima deste uma válvula unidirecional, onde na entrada da válvula foi conectada uma traquéia por onde se administrava oxigênio e os anestésicos inalatórios, e no orifício de saída da válvula unidirecional foi acoplada outra traquéia para o escoamento de gases para fora da sala de experimentação. À válvula unidirecional foi acoplado o sensor do monitor de oxigênio para avaliação da fração inspirada de oxigênio (FiO<sub>2</sub>)<sup>6</sup>. O fluxômetro do aparelho de anestesia<sup>7</sup> inalatória foi ajustado em um fluxo de oxigênio de 2 L/min. com instituição de ventilação controlada através de um ventilador dotado de fole pediátrico (100 mL)<sup>8</sup>, com frequência de 40 mov/min, tempo I:E 1:2, e mantendo-se o ETCO<sub>2</sub> entre 15 e 45 mmHg.

Para a administração mais precisa dos anestésicos inalatórios foram utilizados vaporizadores calibrados<sup>9,10,11</sup>, específicos para cada agente mensurando-

---

<sup>2</sup> Tanohalo® –Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda – Itapira/SP – Brasil.

<sup>3</sup> Isoforine® – Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda– Itapira/SP – Brasil.

<sup>4</sup> Sevocris® – Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda– Itapira/SP – Brasil.

<sup>5</sup> Monitor multiparamétrico Dixtal DX 2010 – Dixtal medical – Wallingford – USA.

<sup>6</sup> Ohmeda 5120 oxygen monitor – BOC healthy care – USA.

<sup>7</sup> Takaoka conjunto KT-10 – Takaoka indústria e comércio Ltda – São Bernardo do Campo/SP – Brasil.

<sup>8</sup> Fole pediátrico 100mL Takaoka- Takaoka indústria e comércio Ltda – São Bernardo do Campo/SP – Brasil.

<sup>9</sup> Fluotec Mark 2 – Cyprane ltd. Keighley – Yorkshire, Inglaterra.

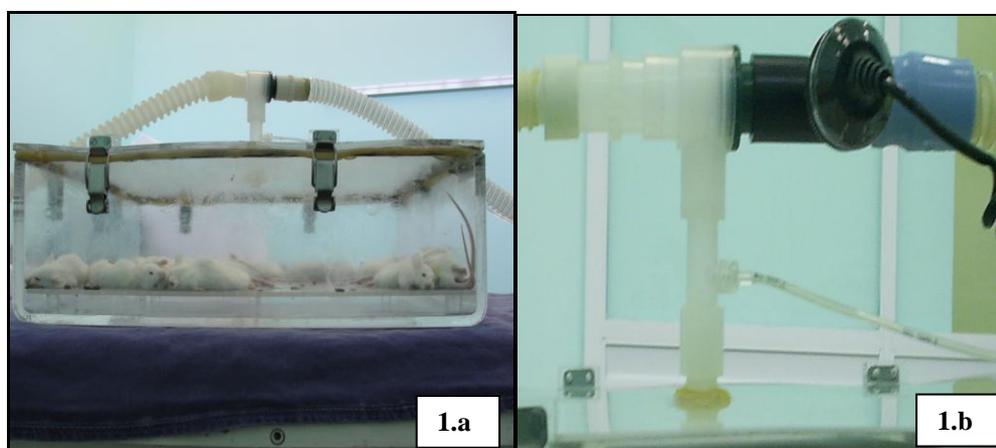
<sup>10</sup> Fortec – Cyprane Keighley – Yorkshire, Inglaterra.

<sup>11</sup> Oxivapor 1645 – Oxigel materiais hospitalares indústria a comércio Ltda – São Paulo/SP – Brasil.

se, avaliando a quantidade expirada de cada anestésico, mantendo entre 1 CAM  $\pm$  10% (figura 1b). Os valores da concentração expirada dos anestésicos foram corrigidos pela equação de pressão barométrica de acordo com a altitude da cidade de Lages em relação ao nível do mar.

As 20 camundongas de cada grupo, inicialmente eram induzidas a uma concentração de 2 CAM do anestésico correspondente a cada grupo, e posteriormente mantidas a 1 CAM  $\pm$  10% do anestésico inalatório correspondente (halotano 1,33 V%; isoflurano 1,66V% e sevoflurano 2,5V%), com um fluxo de oxigênio a 100% de 2 L/min., e mantidas em anestesia geral inalatória por um período total de 20 horas, sendo divididos em 4 horas por dia durante 5 dias consecutivos.

A temperatura da sala de experimentação e no interior da caixa anestésica, era mensurada através de termômetros do monitor multiparamétrico a cada 30 minutos durante a exposição, mantendo uma faixa de T°C entre 20° e 24°C através de condicionador de ar (vide anexos).



**Figura 1 –** a. caixa anestésica em acrílico para camundongos (40x40x10 cm); b. tubo coletor do capnógrafo e analisador de gases do monitor multiparamétrico acoplados no orifício de entrada e saída de gases da caixa anestésica.

### 2.3 MANEJO REPRODUTIVO

Após 48 horas da exposição a anestesia inalatória, as fêmeas de

camundongos foram alocadas em caixas individuais na presença dos machos na proporção de 2 fêmeas para 1 macho, durante 5 noites consecutivas, sob escuridão total. A cada manhã após a exposição com os machos, as fêmeas eram inspecionadas quanto a presença de plug vaginal (sêmen solidificado), o que confirmaria que as mesmas foram copuladas. As fêmeas que apresentavam o plug foram consideradas no dia 0 de gestação, e 72 horas após 50% das camundongas foram submetidas a eutanásia para avaliação embrionária (número de embriões viáveis por fêmea, número de embriões degenerados por fêmea). As restantes 50% dessas fêmeas eram submetidas a eutanásia no 14º dia de uma possível gestação (para avaliação de número de fetos por fêmea, número de reabsorções por fêmea, número de implantações por fêmea, tamanho fetal e possíveis efeitos teratogênicos).

Diariamente as fêmeas que apresentavam o plug vaginal eram separadas das demais, em caixas identificadas, contendo informações como: grupo pertencente, número de fêmeas, dia do plug vaginal, dia para avaliação de embriões, e dia em que essas estariam no 14º dia de gestação.

As fêmeas que não apresentavam plug vaginal ao final das 5 noites com os machos eram mantidas nas caixas, e avaliadas após 14 dias da última noite com os machos, para observação e avaliação de possíveis gestantes.

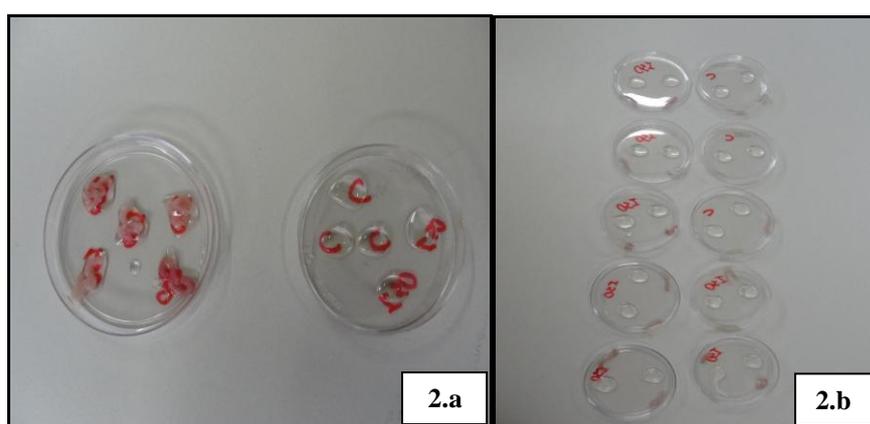
## **2.4 EUTANÁSIA**

Para realização da eutanásia das camundongas foi realizado o deslocamento cervical, visto que não se pode ter interferência química de qualquer produto na análise de microscopia, para que não se obtivesse um falso resultado. Esse método de eutanásia é indicado somente quando a adoção de outros métodos possa invalidar o resultado final de determinado experimento (FIOCRUZ, 2005).

## 2.5 AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES E DA GESTAÇÃO

### 2.5.1 AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES

Para a avaliação de embriões, 72 horas após a avaliação do plug vaginal as fêmeas de camundongos eram eutanasiadas, e após realizava-se uma incisão na cavidade abdominal, com obtenção dos cornos uterinos. Após coletados, os cornos eram depositados em placas de petri em aproximadamente 0,5ml de D-PBS<sup>12</sup> + soro fetal bovino<sup>13</sup>, para posterior lavagem (Figuras 2a). Com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica<sup>14</sup>, cada corno uterino era lavado com 1ml de D-PBS, injetado com uma seringa e agulha introduzida na extremidade proximal de cada corno uterino, com o auxílio de uma pinça. Após isso, procedia-se a busca dos embriões que eram quantificados e avaliados, sendo que o conteúdo de cada corno ficava restrito em uma gota (uma gota/corno), avaliando os cornos da mesma camundonga em uma placa individual (figura 2b). Os embriões eram agrupados em viáveis (mórulas e blastocistos) ou degenerados (óvulos, degenerados, retardados ou fragmentados) por um profissional experiente do laboratório de reprodução animal CAV/UEDESC, o qual era “cego” quanto ao grupo avaliado.



**Figura 2 -** a. cornos uterinos de fêmeas de camundongos coletados 72 horas após a presença de plug vaginal. b. conteúdo dos cornos uterinos (1 gota/corno) após lavagem com 1 ml de D-PBS + soro fetal bovino para posterior inspeção e avaliação de embriões através de lupa estereomicroscópica.

<sup>12</sup> Dulbecco's salina tamponada fosfatada – Stemcell - Science Pro – São Caetano do Sul/SP – Brasil.

<sup>13</sup> Soro fetal bovino – cultilab – Campinas/SP – Brasil.

<sup>14</sup> Estereomicroscópio MEIJI – Meiji Techno CO. LTD – Tokyo – Japão.

### **2.5.1.1 Número de embriões viáveis por fêmea**

Calculado a partir do número total de mórulas e blastocistos pelo número de fêmeas doadoras em cada grupo. Valores expressos em porcentagem da quantidade de embriões viáveis em relação ao número total de embriões viáveis e degenerados por fêmea.

### **2.5.1.2 Número de embriões degenerados por fêmea**

Calculado a partir do número total de óvulos, embriões degenerados, retardados ou fragmentados pelo número de doadoras em cada grupo. Valores expressos em porcentagem do número de embriões degenerados em relação ao número total de embriões viáveis e degenerados por fêmea.

## **2.5.2 AVALIAÇÃO GESTACIONAL**

Para a avaliação de efeitos na gestação, as camundongas eram submetidas a eutanasia no 14<sup>o</sup> dia de uma possível gestação. O útero foi coletado, e avaliado o número de fetos, número de reabsorções, número de implantações, tamanho fetal, e com auxílio de uma lupa através de avaliação morfológica externa possíveis efeitos teratogênicos. Para avaliação da teratogenia, utilizou-se a classificação de Mazze et al (1986), a saber: malformações maiores (que impediriam a sobrevivência normal do indivíduo) que incluem fenda palatina, exencefalia, deformidade em membros, ou malformações menores (anormalidades que não desfigurariam ou incapacitariam o indivíduo) como membros malposicionados, cauda curvada, entre outros. Do total de fetos, 20% destes foram coletados aleatoriamente e preservados em formol a 10% para avaliação histopatológica.

### **2.5.2.1 Número de fetos por fêmea**

Para este cálculo foi utilizado o número de fetos obtidos pelo número de fêmeas para a avaliação gestacional em cada grupo. Para esse parâmetro também eram incluídos os fetos de fêmeas que não apresentavam “plug” vaginal, mas que após 14 dias do acasalamento com os machos apresentavam-se gestantes.

### **2.5.2.2 Número de reabsorções por fêmea**

Em camundongos fetos reabsorvidos correspondem a abortamentos em humanos (BRUCE, 1973; WHARTON et al, 1978; WHARTON et al, 1979; MAZZE, 1985). Para a avaliação do número de reabsorções por fêmea nos grupos experimentais e controle, foram considerados os fetos reabsorvidos, evidenciados por alterações morfológicas no local da implantação no útero. O cálculo foi realizado a partir do número total de reabsorções pelo número de fêmeas para avaliação gestacional em cada grupo. Para esse parâmetro também foram incluídas as fêmeas que não apresentavam “plug” vaginal, mas que após 14 dias da última noite com os machos apresentavam-se gestantes com presença de reabsorções. Também foram apresentados valores em porcentagem do número de reabsorções em relação ao número total de implantações por fêmea.

### **2.5.2.3. Número de implantações por fêmea**

Para o cálculo do número de implantações por fêmea foram somados o número total de fetos, mais o número total de reabsorções e dividido pelo número de fêmeas para a avaliação gestacional em cada grupo. Para esse parâmetro também eram incluídas as fêmeas que não apresentavam “plug” vaginal, mas que após 14

dias da última noite com os machos apresentavam-se gestantes com presença de reabsorções e fetos.

#### **2.5.2.4. Tamanho fetal**

Para a determinação do tamanho dos fetos, era utilizada uma régua graduada medindo-se o comprimento desde a cabeça até a inserção da cauda do feto. Para esse parâmetro foram incluídos apenas as medidas dos fetos originados das fêmeas que apresentavam “plug” vaginal.

#### **2.5.3 Avaliação histopatológica**

Dos animais submetidos a eutanásia para avaliação de embriões e da gestação, foram coletados e imersas em formal a 10% órgãos como pulmões, baço, rins, fígado, útero e ovários, e 20% dos fetos para avaliação histopatológica. Posteriormente, os órgãos eram desidratados em álcool, clarificados em xilol e fixados em formalina a 10%, processados rotineiramente e corados com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para exame histopatológico no microscópio óptico (PROPHET et al, 1992).

### **2.6 ÍNDICES REPRODUTIVOS**

Calculados para os grupos experimentais e controle.

### **2.6.1 Taxa copulatória**

A taxa copulatória foi calculada a partir do número de fêmeas com presença de “plug” vaginal pelo número total de fêmeas colocadas para acasalar em cada grupo.

### **2.6.2 Taxa de gestação de fêmeas com “plug” vaginal**

Taxa calculada a partir do número de fêmeas com embriões viáveis e fêmeas gestantes pelo número de fêmeas com presença de “plug” vaginal.

### **2.6.3 Taxa de gestação total**

Para calcular a taxa de gestação total utilizou-se o número de fêmeas com embriões viáveis e fêmeas gestantes pelo número total de fêmeas em cada grupo. Para o cálculo dessa taxa eram incluídas as fêmeas que não apresentavam “plug” vaginal, porém após 14 dias apresentavam-se gestantes.

## **2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As comparações entre grupos para as variáveis número de embriões viáveis e degenerados, número de fetos, número de reabsorções e número de implantações por fêmea foram efetuadas utilizando-se modelos lineares generalizados para dados com distribuição Poisson e binomial (DOBSON, 2002), com funções de ligação “log” e “logit”, respectivamente, e testados pela estatística do qui-quadrado. A variável tamanho fetal foi analisada por meio de um modelo linear de análise da variância

com as comparações de médias de grupos efetuadas com o uso do teste de Tukey (STEEL et al, 1997). As análises foram conduzidas utilizando-se os procedimentos GLM (General Linear Models) e GENMOD (Generalized Linear Models) do SAS<sup>®</sup>. Para todos os testes efetuados foi considerado o nível mínimo de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS

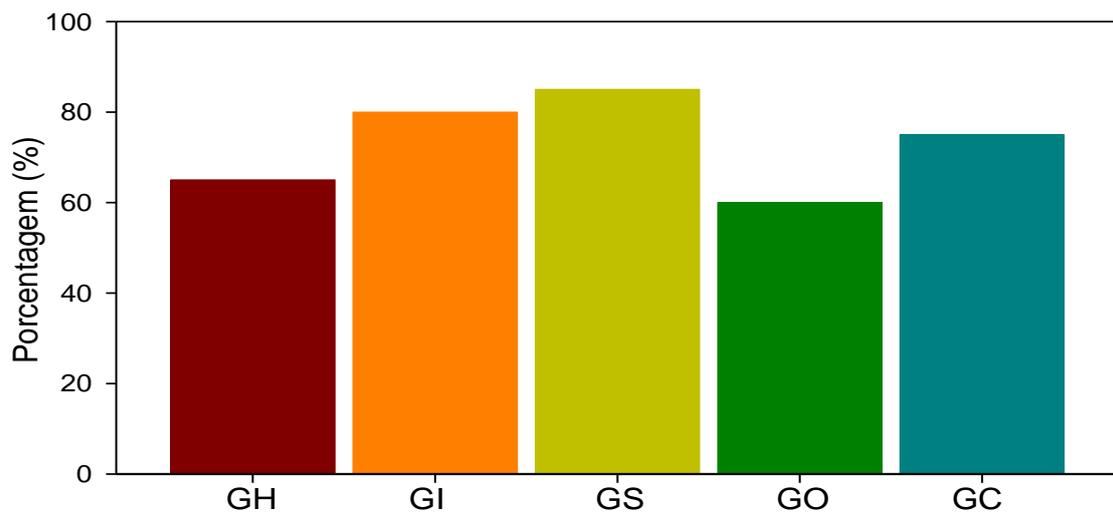
#### 3.1 ÍNDICES REPRODUTIVOS

##### 3.1.1 TAXA COPULATÓRIA

O índice taxa copulatória foi menor nos grupos GO e GH (60 e 65% respectivamente), enquanto os grupos GI e GS apresentaram taxas semelhantes e maiores que os demais grupos (Tabela 2, Figura 3).

Tabela 2 - Valores de taxa copulatória (%) em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS) oxigênio (GO) e controle (GC).

	Halotano	Isofluorano	Sevofluorano	Oxigênio	Controle
Taxa copulatória	65	80	85	60	75



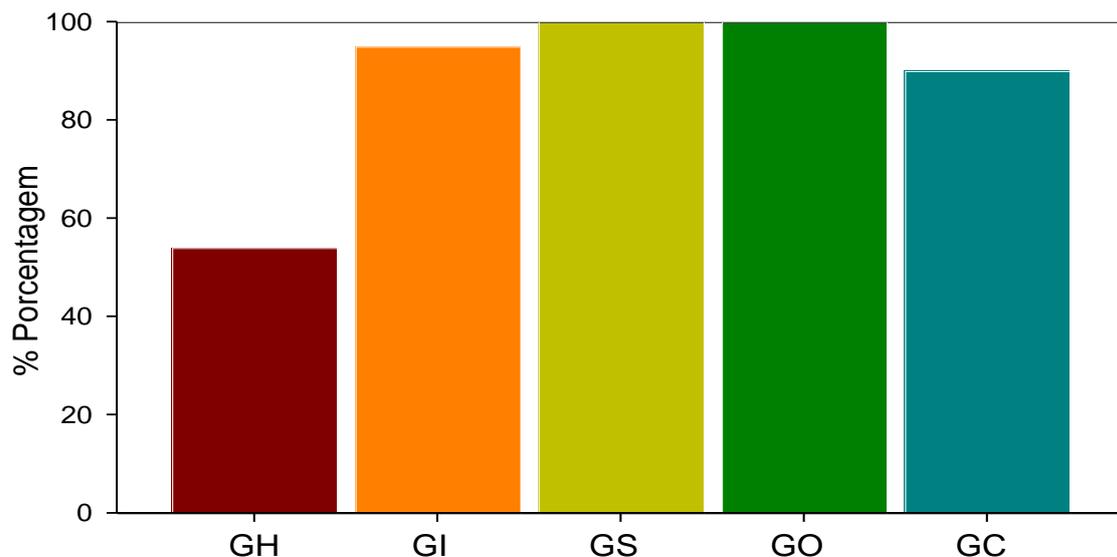
**Figura 3-** Valores em porcentagem (%) de taxa copulatória em fêmeas de camundongos dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

### 3.1.2 TAXA DE GESTAÇÃO DE FÊMEAS COM PLUG VAGINAL

O GH apresentou menor taxa de gestação de fêmeas com plug que os demais grupos, os quais apresentaram valores semelhantes para esta taxa (Tabela 3, Figura 4).

Tabela 3 - Valores de taxa de gestação de fêmeas com plug (%) em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

	Halotano	Isofluorano	Sevofluorano	Oxigênio	Controle
<b>Taxa de gestação de fêmeas com Plug</b>	54	95	100	100	90



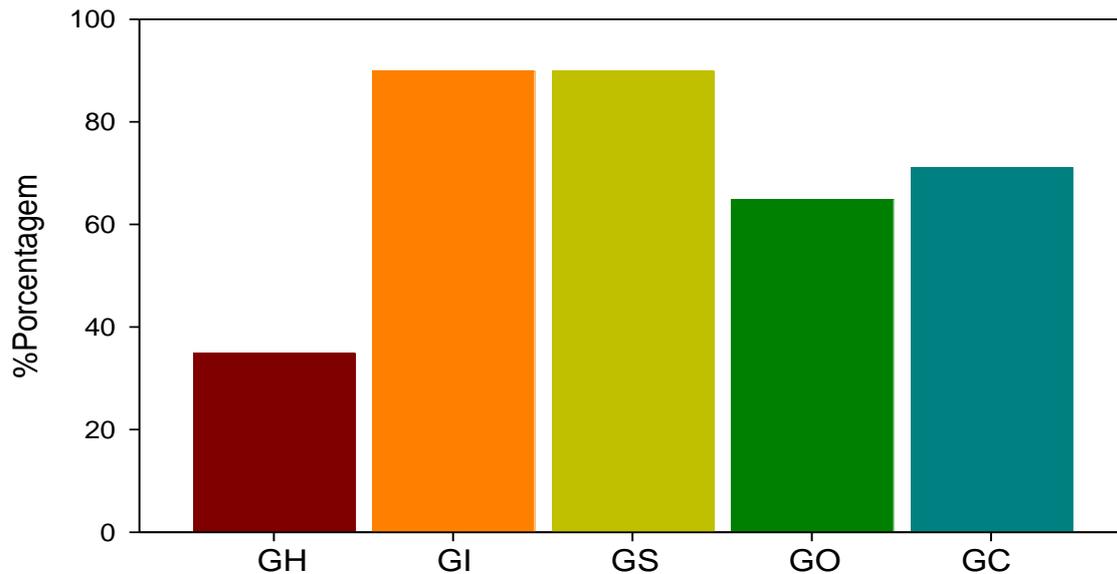
**Figura 4-** Valores em porcentagem (%) de taxa de gestação de fêmeas com plug em fêmeas de camundongos dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

### 3.1.3 TAXA DE GESTAÇÃO TOTAL

Os grupos GI e GS apresentaram taxa de gestação total de 90%, sendo maior que em relação aos demais grupos. O GH apresentou menor taxa de gestação em relação aos demais grupos (Tabela 4, Figura 5).

Tabela 4 - Valores de taxa de gestação total (%) em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

	Halotano	Isofluorano	Sevofluorano	Oxigênio	Controle
Taxa de gestação total	35	90	90	65	71,2



**Figura 5-** Valores em porcentagem (%) de taxa de gestação total em fêmeas de camundongos dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

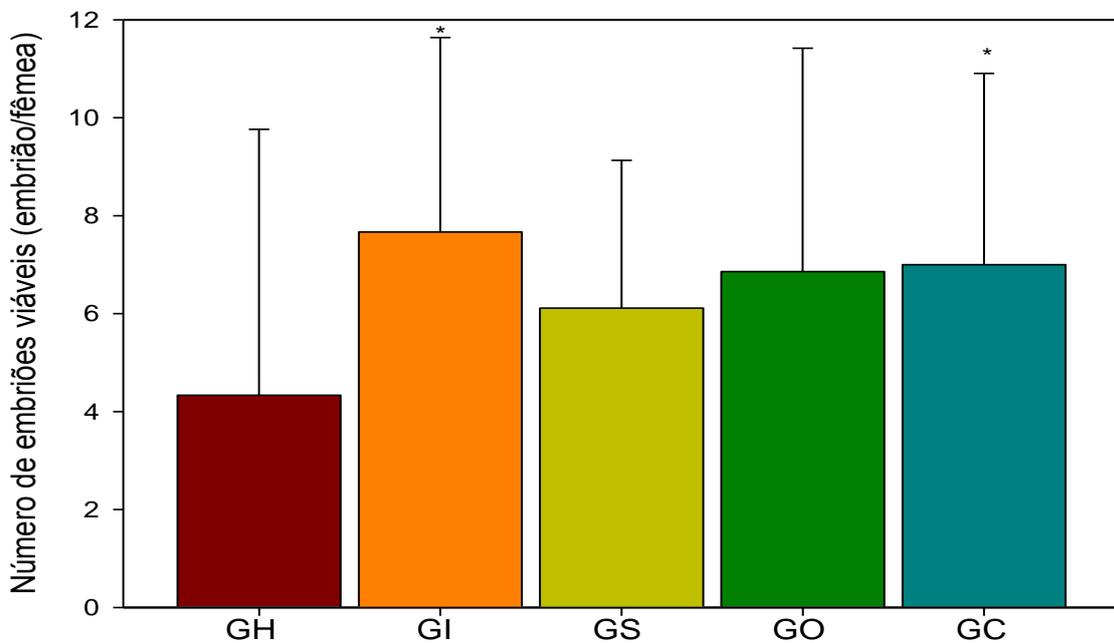
### 3.2 NÚMERO DE EMBRIÕES VIÁVEIS E DEGENERADOS POR FÊMEA

Quanto ao número de embriões viáveis e degenerados, as fêmeas de camundongos do GH apresentaram menor número de embriões viáveis e maior número de embriões degenerados em relação aos grupos GI e GC, não havendo diferença entre os demais grupos. Os demais grupos apresentaram valores de embriões viáveis e degenerados semelhantes (Tabela 5, Figuras 6 e 7).

Tabela 5 - Valores médios de número de embriões viáveis e degenerados por fêmea e número de embriões viáveis e degenerados (%) em relação ao total de embriões por fêmea em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

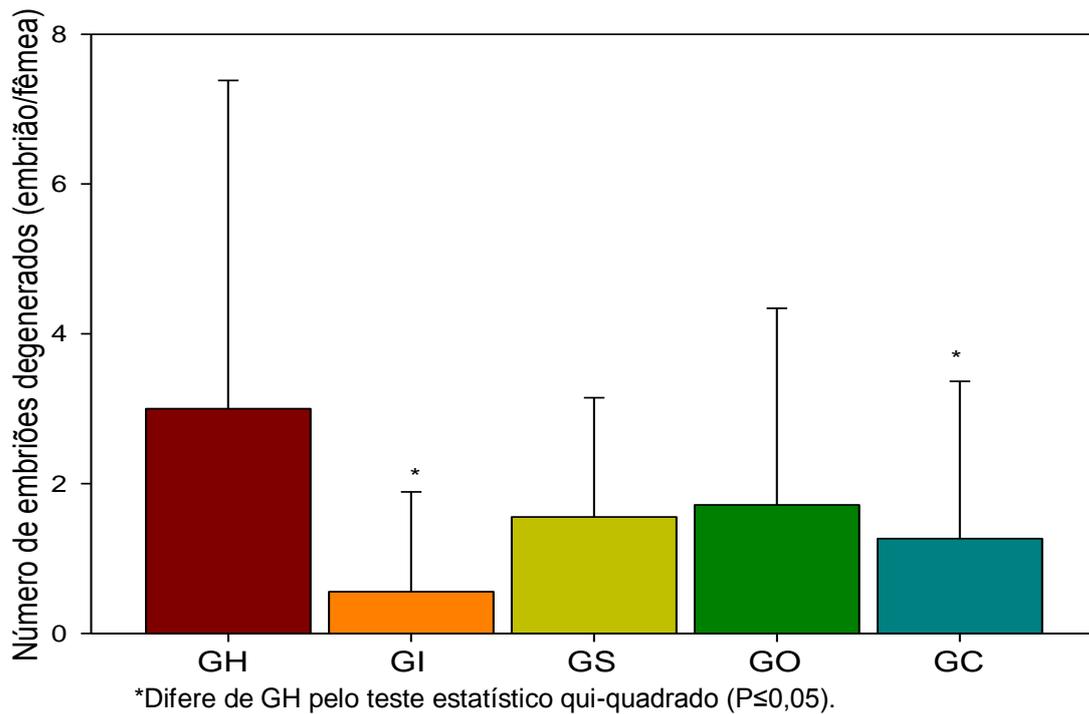
Grupo	Número de embriões viáveis por fêmea	Número de embriões viáveis (%) em relação ao total de embriões por fêmea	Número de embriões degenerados por fêmea	Número de embriões degenerados (%) em relação ao total de embriões por fêmea
Halotano (GH)	4,3±5,4	58,9%	3±4,3	41,1%
Isofluorano (GI)	7,6±4*	93,3%*	0,55±1,33*	6,7%*
Sevofluorano (GS)	6,1±3	79,7%	1,55±1,58	20,3%
Oxigênio (GO)	6,8±4,5	79,9%	1,71±2,63	20,1%
Controle (GC)	7±3,9*	84,7%*	1,26±2*	15,3%*

\*Difere de GH pelo teste estatístico qui-quadrado ( $P \leq 0,05$ ).



\*Difere de GH pelo teste estatístico qui-quadrado ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 6-** Valores médios e desvio-padrão do número de embriões viáveis de fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).



**Figura 7-** Valores médios e desvio-padrão do número de embriões degenerados de fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isoflurano (GI), sevoflurano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

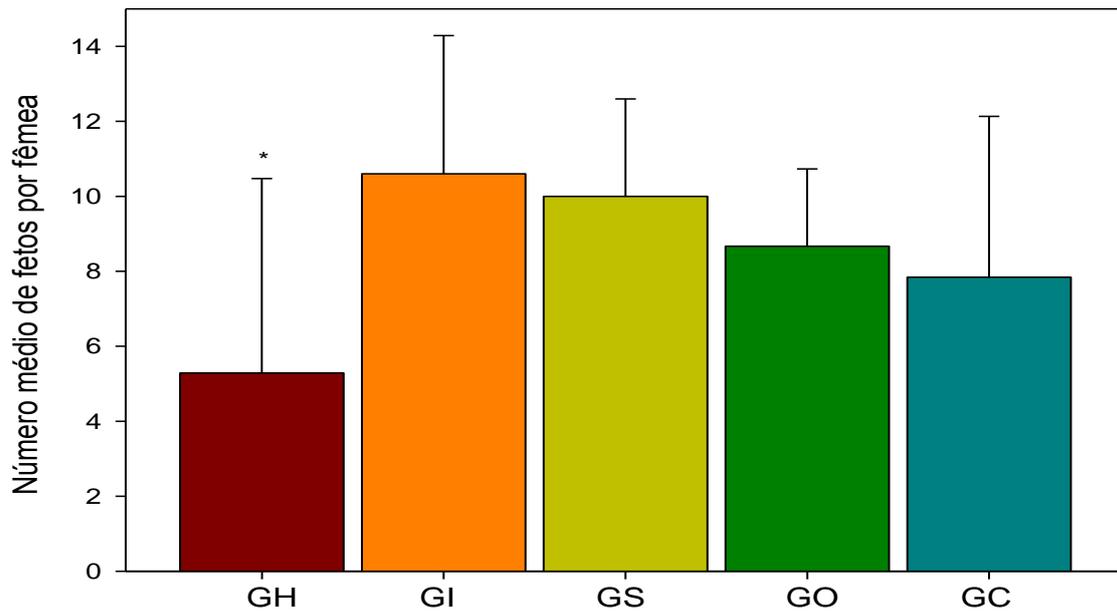
### 3.3 NÚMERO DE FETOS POR FÊMEA

Houve menor número de fetos por fêmea no GH em relação aos demais grupos (Tabela 6, figura 8).

Tabela 6 - Valores médios de número de fetos por fêmea em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isoflurano (GI), sevoflurano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

	Halotano	Isoflurano	Sevoflurano	Oxigênio	Controle
<b>Número de fetos por fêmea</b>	5,28±5,2*	10,6±3,7	10±2,6	8,6±2	7,8±4,2

\*Difere dos demais grupos pelo teste estatístico qui-quadrado ( $P \leq 0,05$ ).



\*Difere dos demais grupos pelo teste estatístico qui-quadrado ( $P \leq 0,05$ ).

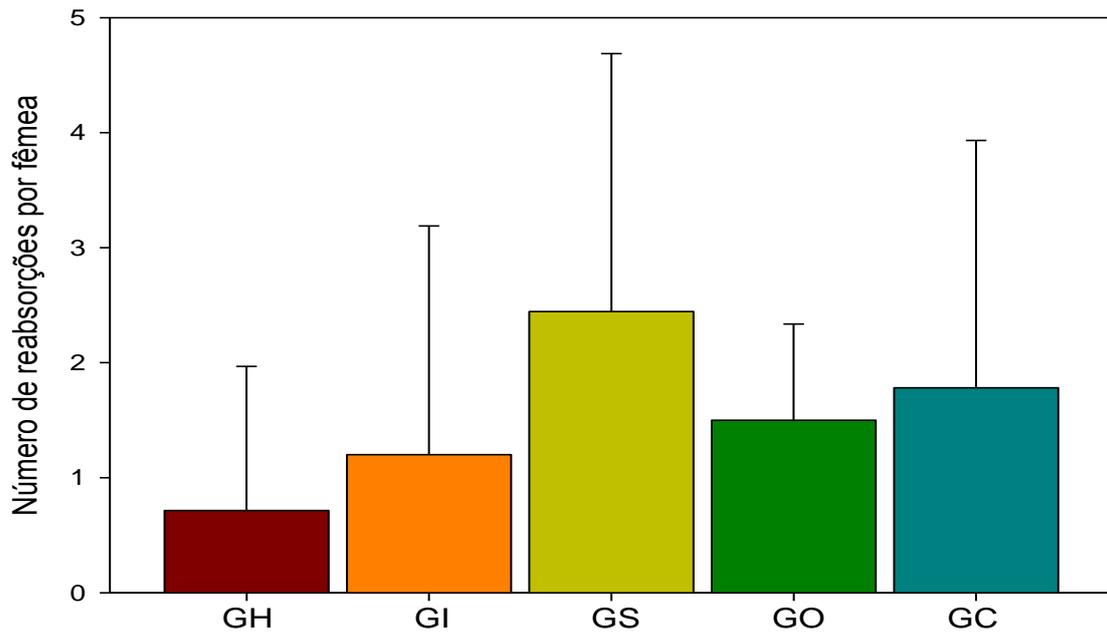
**Figura 8-** Valores médios e desvio-padrão do número de fetos por fêmea em fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isoflurano (GI), sevoflurano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

### 3.4 NÚMERO DE REABSORÇÕES POR FÊMEA

Não foram observadas diferenças entre os grupos para o parâmetro número de reabsorções por fêmea (Tabela 7, Figura 9).

Tabela 7 - Valores médios de número de reabsorções por fêmea e porcentagem de reabsorções em relação ao total de implantações em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isoflurano (GI), sevoflurano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

	Halotano	Isoflurano	Sevoflurano	Oxigênio	Controle
<b>Reabsorções por fêmea</b>	0,7±1,2	1,2±2	2,4±2,2	1,5±0,8	1,8±2,1
<b>Reabsorções (%) / total de implantações</b>	11,6%	10,1%	19,3%	14,8%	18,75%



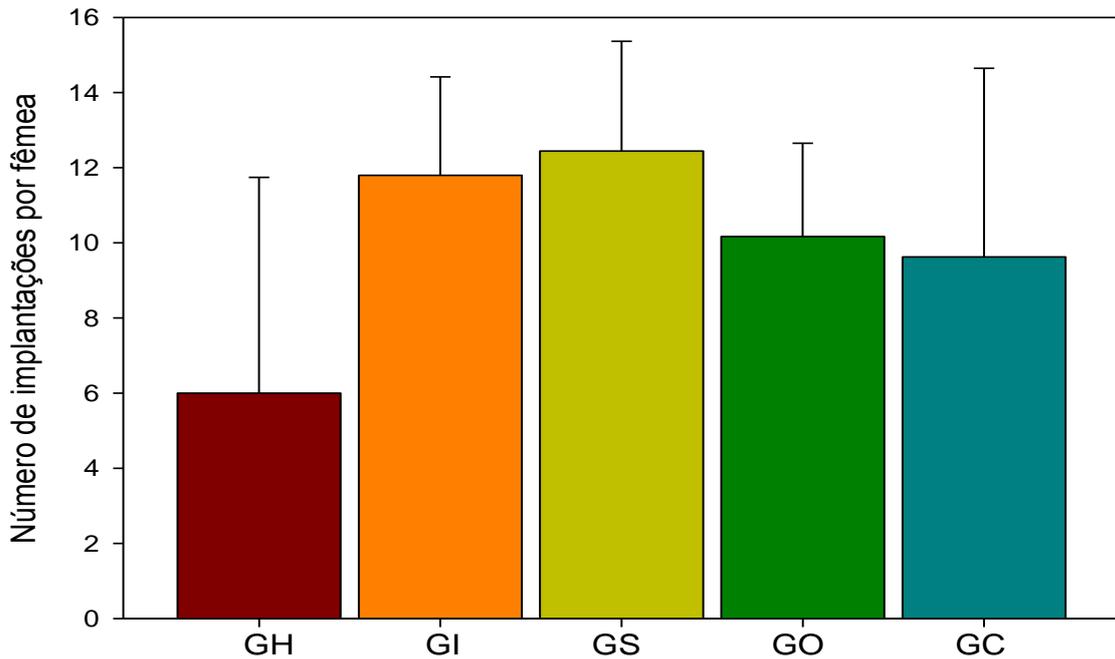
**Figura 9-** Valores médios e desvio-padrão do número de reabsorções por fêmea em fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

### 3.5 NÚMERO DE IMPLANTAÇÕES POR FÊMEA

Não foram observadas diferenças entre os grupos para o parâmetro número de implantações por fêmea (Tabela 8, Figura 10).

**Tabela 8 -** Valores médios de número de implantações por fêmea em fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

	Halotano	Isofluorano	Sevofluorano	Oxigênio	Controle
<b>Número de implantações por fêmea</b>	6±5,7	11,8±2,6	12,4±2,9	10,1±2,4	9,6±5



**Figura 10-** Valores médios e desvio-padrão do número de implantações por fêmea em fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isoflurano (GI), sevoflurano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

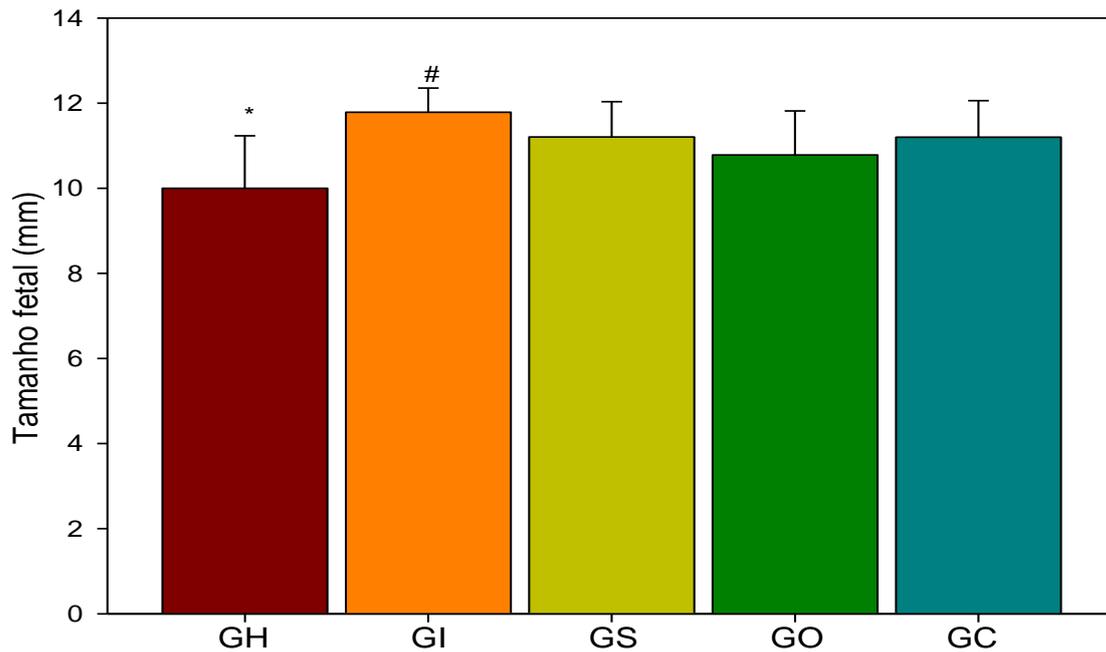
### 3.6 TAMANHO FETAL

As fêmeas do GH apresentaram fetos de menor tamanho em relação aos demais grupos. O GI apresentou maior tamanho de fetos em relação aos demais grupos (Tabela 9, Figura 11).

Tabela 9 - Valores médios de tamanho fetal (mm) em fetos de fêmeas de camundongos nos grupos halotano (GH), isoflurano (GI), sevoflurano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

	Halotano	Isoflurano	Sevoflurano	Oxigênio	Controle
<b>Tamanho fetal (mm)</b>	10±1,2*	11,8±0,5 <sup>#</sup>	11,2±0,8	10,8±1	11,2±0,8

\*Diferem dos demais grupos pelo teste estatístico análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).



\*, # Diferem dos demais grupos pelo teste estatístico análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 11-** Valores médios e desvio-padrão do tamanho fetal (mm) de fetos de fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) e controle (GC).

### 3.7 OCORRÊNCIA DE TERATOGENIA E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Não foram observadas alterações morfológicas externas que evidenciassem malformações maiores ou menores em nenhum dos grupos avaliados, assim como não foram observadas alterações histopatológicas em fetos e nos órgãos das fêmeas expostas.

#### 4. DISCUSSÃO

O camundongo é um animal experimental muito utilizado em estudos reprodutivos, pelo fato de ser pequeno, muito prolífero, possuir um período de gestação curto e ser de fácil domesticação e manutenção, além de grande similaridade biológica e disposição anatômica das estruturas internas quando comparada à espécie humana (FLEGAL e KUHLMAN, 2004). Além disso a placenta de camundongas é similar a placenta de humanos e primatas ou seja tipo hemo-rial. Apesar de seu fácil manejo, é uma espécie exigente quanto às condições ambientais (temperatura ambiente, trocas de ar, ciclo de luz/escuro), condições estas obedecidas neste experimento.

As fêmeas de camundongos dos grupos GH, GI e GS mantinham-se superficialmente anestesiadas durante a exposição diária de 4 horas (já que eram induzidas com 2 CAM, e após expostas á 1 CAM do anestésico inalatório correspondente), o que não ocorria com o grupo GO, onde as camundongas eram expostas a oxigênio a 100%. A realização do grupo GO teve por objetivo avaliar se a exposição somente ao oxigênio a 100% afetaria a viabilidade embrionária ou gestacional de camundongas, também possíveis lesões por hiperóxia, e avaliar o estresse da câmara anestésica de forma isolada. O fato das fêmeas do grupo GO permanecerem acordadas durante a exposição foi considerado um fator estressante, pois tratava-se de um ambiente inóspito as mesmas, e durante a exposição as camundongas não tinham acesso a alimentação e água. Porém os resultados para o grupo GO foram semelhantes aos obtidos com o grupo GC.

Na avaliação embrionária foi observado que o GH apresentou menor número de embriões viáveis e maior número de embriões degenerados em relação aos demais grupos, entretanto esta diferença foi estatisticamente significativa apenas dos grupos GI e GC. No grupo GH três camundongas que apresentaram plug não apresentaram nenhum embrião viável na avaliação embrionária 72 horas após a observação do “plug” vaginal, entretanto apresentaram embriões degenerados.

Porém nenhuma literatura ou autor sugere algum mecanismo que explique como o halotano ou outros anestésicos halogenados afetam a atividade reprodutiva ao contrário do que se sabe para o óxido nitroso (FUJINAGA, 2001). Sturrock et al (1975), após expor fibroblastos de hamsters chinesas á 2% de halotano durante 24 horas observou durante a exposição ao anestésico que o aumento das células foi reduzido entretanto após remoção do anestésico as células se recuperaram e dividiram normalmente, sendo o efeito da exposição ao inalatório transitório. O autor sugere que o halotano diminui a taxa de absorção de timidina no DNA, consequentemente inteferindo em sua síntese, e também apresenta evidências que concentrações menores que 2% prolongam a fase G2 do ciclo celular interferindo na mitose. Grant et al (1974) observaram este mesmo efeito na exposição de favas ao halotano, e não excluíram a possibilidade do halotano interferir na fase G1 do ciclo celular. Kundomal & Baden (1985) observaram ao exporem ovos de moscas da fruta á 0,1 ou 0,2% de halotano houve aumento na duração de metamorfose.

Uma hipótese com base nas evidências de Sturrock et al (1975) em que o halotano prolonga a fase G2, e de Kundomal & Baden (1985), é que a menor viabilidade dos embriões encontrados no grupo GH deve-se ao prolongamento na fase G2 retardando o desenvolvimento embrionário, considerando que logo após a fertilização o zigoto passa pelo processo de clivagem consistindo em várias divisões mitóticas que visam o aumento do número de células. O que concorda com o maior número de embriões degenerados no grupo GH na avaliação embrionária 72 horas após a observação do “plug” vaginal, em relação aos demais grupos onde os efeitos da exposição ao halotano podem ter prejudicado a performance reprodutiva na semana seguinte a exposição anestésica, levando em conta que seus metabólitos levam alguns dias para serem eliminados do organismo (PUIG et al, 1999). Os principais metabólitos do halotano são o ácido trifluoroacético, íons cloreto e brometos, os quais podem ser hepatotóxicos porém não existe uma ligação direta com relação a afetar a atividade reprodutiva.

Outra possível explicação para o maior número de embriões degenerados é que estes embriões podem ter origem de uma onda folicular anterior onde os óvulos liberados de foliculos maduros não foram fertilizados, já que as camundongas ovulam espontaneamente, ou também por terem sido fertilizados próximo ao final de sua vida fértil em consequência de uma cobertura tardia. Segundo Hafez (1995), os

animais de laboratório mostram altas porcentagens de gestações anormais e uma diminuição do número de filhotes nascidos a medida que aumenta a idade do óvulo antes da fertilização. Estes ovos podem ou não se implantar e, neste caso, embriões não viáveis são produzidos na maioria das vezes. Ainda Coate et al (1979), observaram em ratos machos e fêmeas os efeitos da exposição ao halotano mais óxido nitroso em concentrações de 1ppm com 50 ppm, e 10 ppm com 500 ppm respectivamente durante 12 semanas por 7 horas diárias, obtendo diminuição da ovulação de ratas em ambas as concentrações de exposição. Entretanto no presente estudo não foi observado diminuição da ovulação no grupo GH, a tal ponto que quando somamos o número de embriões viáveis e degenerados por fêmea neste grupo, o mesmo apresenta número de estruturas semelhantes aos demais grupos.

Os grupos GI e GS apresentaram o número de embriões viáveis e degenerados similares ao GO e GC, ou seja não afetaram o desenvolvimento inicial de embriões. O que concorda com Lee et al (1994) que após exporem oócitos de camundongos ao óxido nitroso mais 5000 ppm de isofluorano prévio a inseminação de camundongas, foi observado na avaliação de zigotos que a fertilização e a taxa de crescimento embrionário inicial foi similar em relação ao grupo controle, concluindo que o isofluorano ou o óxido nitroso não diminuíram a viabilidade inicial dos embriões.

Em contrapartida Warren et al, (1992) expuseram embriões de 2 células *in vitro* a 15 000, 30 000 ou 50 000 ppm de isofluorano em 5-6, 3-4 ou 0-1 hora antes do início da primeira clivagem, e também avaliou os efeitos em embriões de 4 células expostos 2 horas após a primeira clivagem avaliando estágios de mórula e outros estágios embrionários. Como resultados desta observação, os embriões de 2 células expostos 3-4 ou 0-1 horas antes do expectativa do início da clivagem a 30 000 e 50 000 ppm de isofluorano inibiu o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Os embriões de 4 células ou mórula não foram afetados pela exposição ao isofluorano. Chetkowski et al (1988), expuseram embriões de camundongos de 2 células a 15 000 ppm de isofluorano observando redução do número de embriões de camundongos até o estágio de blastocisto, apesar da utilização de concentração semelhante a empregada no presente trabalho as condições metodológicas foram diferentes, onde no trabalho realizado por Chetkowski tal exposição era realizada já

durante o desenvolvimento dos embriões *in vitro*, sendo que a exposição já na fase embrionária pode ser mais prejudicial aos embriões considerando a maior fragilidade dos mesmos.

Matt et al (1991) avaliaram os efeitos de soros de pacientes anestesiados com óxido nitroso associado ao fentanil, morfina ou isoflurano no desenvolvimento da pré-implantação embrionária de camundongos *in vitro*. O soro foi coletado uma hora após a indução anestésica e adicionado embriões de duas células. O desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi significativamente reduzido no grupo isoflurano quando comparado ao soro na pré-anestesia. Diferentemente do presente estudo o soro destes pacientes poderiam conter além dos metabólitos o isoflurano intacto o que pode ter afetado o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, o que não foi observado com esta metodologia onde no momento da fertilização e desenvolvimento embrionário na semana seguinte a exposição o isoflurano já teria sido completamente eliminado das camundongas expostas, assim como seus metabólitos.

Trabalhos avaliando os efeitos da exposição ao sevoflurano frente a células embrionárias são escassos porém no presente estudo a viabilidade embrionária apresentou-se semelhante ao grupo GI. Apesar do sevoflurano possuir uma maior metabolização hepática (5%) quando comparado ao isoflurano (0,2%), seu principal metabólito o hexaisofluropropanol não apresenta potencial tóxico, o que foi observado no grupo GS.

O número de fetos foi menor no grupo GH quando comparado aos demais grupos, enquanto os grupos GI e GS apresentaram número de fetos maior até que o GO e GC apesar de não apresentarem diferenças estatísticas. No grupo GH diferente dos demais grupos três fêmeas que apresentaram plug vaginal não apresentavam-se prenhes após 14 dias. Segundo Silver (1995) o tamanho da ninhada de fêmeas da linhagem Balb/C é de 5 a 7 fetos por fêmea. Apesar do grupo GH apresentar menor número de fetos por fêmea que os demais grupos, a média de 5,28 fetos por fêmea encontra-se dentro da expectativa mínima de fetos para esta linhagem. Vários fatores influenciam o tamanho da ninhada, dentre eles a ninhada aumenta após o primeiro e diminui após o quinto parto (KÖNIG, 1985), além de fatores genéticos como diferenças significantes entre várias linhagens (KRACKOW & GRUBER, 1990). Coate et al (1979) observaram resultados semelhantes em ratos

machos e fêmeas expostas a 10 ppm de halotano associado a 500 ppm de óxido nítrico por 12 semanas consecutivas com um menor número de fetos nascidos. Wharton et al (1978 e 1979) também observou redução no número de fetos ao simular exposições crônicas de halotano a níveis de 0,025 á 4 CAM em fêmeas de camundongos. Doenick et al (1975) observaram uma taxa muito baixa de descendentes em ratos expostos a 8000 ppm de halotano por 4 horas diárias durante 9 semanas. Coletivamente estes resultados demonstraram que a exposição ao halotano resultou em diminuição da viabilidade fetal, semelhante ao observado neste experimento com menor número de fetos quando comparado aos demais grupos.

Kundomal & Baden (1985) expuseram ovos de moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*) durante a metamorfose á 0,1 ou 0,2% de halotano, isofluorano ou enflurano, encontrando em todos os grupos aumento na duração da metamorfose e diminuição no número de descendentes entretanto não observou anormalidades morfológicas. A metodologia utilizada por Kundomal & Baden (1985) foi diferente da metodologia porposta no presente estudo considerando que eram expostos os produtos do acasalamento (ovos), sendo no presente estudo as fêmeas expostas antes do acasalamento, além de utilizar insetos ou invés de roedores e concentrações dos anestésicos inalatórios menores que as empregadas neste experimento. Apesar disto os mesmos obtiveram resultados semelhantes ao grupo GH com redução no número de descendentes.

Fujinaga et al (1987) observaram em ratas expostas á 0,35% de isofluorano durante 24 horas no 8º ou 20º dia de gestação resultados semelhantes quanto ao número de fetos encontrados neste experimento. Mazze (1985) também não observou diferenças em número de fetos de camundongas swiss/webster expostas a 0,1 ou 0,4% de isofluorano por 4 horas diárias durante duas semanas antes e durante a gestação, quando comparados ao grupo controle. Os resultados obtidos por estes autores concordam com os resultados encontrados para o grupo GI onde não foi observado redução do número de fetos, o que pode ser explicado pela ínfima metabolização deste anestésico com formação de poucos metabólitos, sendo rapidamente eliminados quando comparado ao halotano, desta forma não afetando a viabilidade gestacional.

O número de reabsorções e de implantações por fêmea foram semelhantes em todos os grupos, o que indica que a exposição aos três anestésicos inalatórios não aumentou a ocorrência de abortos. O número de embriões reabsorvidos em camundongos equivalem á abortos espontâneos em humanos (BRUCE, 1973; WHARTON et al, 1978; WHARTON et al, 1979; MAZZE et al, 1985; MAZZE et al, 1986). O grupo GH apresentou número de reabsorções de 0,71, correspondendo á 11,6% do total de implantações deste grupo. Este mesmo grupo obteve o número de 6 implantações por fêmea. Resultados semelhantes foram encontrados por Wharton et al (1978) em exposições de halotano de 0,025 á 4 CAM, de 30 minutos até 4 horas diárias durante 17 semanas em camundongas swiss/ICR, obtendo reabsorções correspondentes entre 7,8 á 14%. Halsey et al (1981) não observaram a ocorrência de abortos em ratas expostas á 10 ppm de halotano ou 20 ppm de enflurano durante 64 dias antes do acasalamento e durante a gestação.

Bruce (1973), após a exposição de camundongas a 16 ppm de halotano durante 6 semanas obteve um número de reabsorções de 0,2 e de implantações totais de 6,6 por fêmea obtendo menor número de reabsorções, entretanto observou resultados similares aos encontrados no presente estudo em relação ao número de implantações. Mazze et al (1986), após exporem ratas sprague-dawley prenhes á 0,8% de halotano durante 3 dias consecutivos (7 horas diárias), obteve reabsorções de 0,39 á 0,67, e de implantações de 11 á 11,8 por fêmea. Bussard et al (1974), observaram expondo hamsters prenhes á 0,6% de halotano mais 60% de óxido nitroso no 10º ou 11º dia gestação maior incidência de reabsorções quando comparado ao grupo controle, porém a exposição era realizada durante a gestação e adicionado óxido nitroso o qual é teratogênico e poderia afetar a viabilidade gestacional, sendo diferente do presente estudo onde não foram observados aumento na incidência de reabsorções. Os resultados encontrados por Wharton et al (1978), Bruce (1973) e Mazze et al (1986), vem de encontro aos resultados obtidos no presente estudo.

O número de reabsorções e de implantações por fêmea para o grupo GI foram 1,2 e 11,8 respectivamente. Mazze et al (1986) após exporem ratas sprague-dawley por 3 dias consecutivos (7 horas diárias) durante a gestação á 1,05% de isoflurano obtiveram número de reabsorções e de implantações entre 0,29 e 0,57 e entre 10,8 a 11,7 respectivamente. Mazze (1985) após expor camundongas swiss

webster á 0,1 ou 0,4% de isofluorano por 4 horas diárias durante 2 semanas antes e 2 semanas durante a gestação número de reabsorções correspondentes á 9,2% das implantações em ambas as concentrações de exposição, e número de implantações por fêmea de 8,7 e 8,1 para exposição de 0,1 e 0,4% de isofluorano respectivamente. Wharton et al (1981) após exporem camundongas á 1% de enfluorano por 7 horas diárias por 3 semanas 11,2% de fetos reabsorvidos e 13,1 implantações por fêmea. No presente estudo o número de reabsorções correspondeu a 10,1% do total de implantações um pouco maior que os trabalhos citados, entretanto semelhante aos grupos GO (14,8%) e GC (18,75%), porém o número de implantações foram semelhantes aos resultados encontrados por Mazze (1985), Mazze et al (1986) e Wharton et al, (1981).

Os resultados para o grupo GS foram de 2,4 e 12,4 para número de reabsorções (19,3%) e de implantações por fêmea, não apresentando diferenças para os demais grupos. Na literatura trabalhos utilizando a exposição ao sevofluorano em roedores ou em humanos não foram encontrados, porém os resultados obtidos neste experimento para o grupo GS em relação ao número de reabsorções foram maiores para este grupo em relação aos demais grupos apesar de não apresentar diferenças estatísticas. Apesar de maior número de reabsorções quando comparado aos demais grupos, a exposição ao sevofluorano apresentou menores números quando comparado á camundongas Balb/C inoculadas com *Neospora caninum* (agente sabidamente abortivo) antes e durante a gestação observando 33% de reabsorções contra 19,3% para a exposição com sevofluorano (LONG & BASZLER, 1996).

Os resultados encontrados para reabsorções e implantações para os três anestésicos utilizados neste experimento não demonstraram aumento na incidência de abortos em camundongos, diferente dos resultados de estudos retrospectivos que indicam a maior prevalência de abortos em profissionais expostos a resíduos de gases anestésicos dentro do ambiente cirúrgico. Entre os questionamentos em relação a trabalhos retrospectivos cita-se a falha na obtenção de dados com informações imprecisas como qual o anestésico inalatório a pessoa ficou exposta, ou a mistura de gases; a concentração do agente anestésico; o tempo de exposição; entre outros fatores como estresse, exposição á radiação, ou agentes infecciosos

(VAISMAN et al 1967; ASKROG & HARVALD 1970, KNILL-JONES 1972, GUIRGUIS 1990).

Com relação ao tamanho fetal os fetos do grupo GH apresentaram tamanho menor em relação aos demais grupos, o que concorda com Wharton et al (1978) que encontraram redução no tamanho de fetos de camundongas expostas á 1% de halotano durante 9 semanas, não observando efeitos semelhantes frente á exposições com concentrações menores de halotano. Bussard et al (1974), após exporem hamsters prenhes á 0,6% de halotano com mais 60% de óxido nitroso por três horas no 9º, 10º ou 11º dia de gestação observou redução no ganho de peso e comprimento fetal em hamsters expostas no 10º e 11º dia de gestação. Coate et al (1979), observaram retardo no desenvolvimento em fetos de ratas prenhes expostas a 1 ppm de halotano associado a 50 ppm de óxido nitroso do 6º ao 15º dia de gestação. Coletivamente estes resultados demonstram que a exposição ao halotano leva a um retardo no desenvolvimento dos fetos corroborando com os resultados encontrados para o grupo GH, apesar das diferenças metodológicas aplicadas nos experimentos realizados por Bussard et al (1974); Wharton et al (1978) e Coate et al (1979) .

O grupo GI apresentou fetos de tamanho maior que os demais grupos. Fujinaga et al (1987) não observaram diferenças no peso de fetos de ratas expostas durante 24 horas a 0,35% de isoflurano no 8º ou 20º dia de gestação. Resultados controversos foram encontrados por Wharton et al (1981), que observaram redução no tamanho e no peso de fetos de camundongas expostas a 1% de enflurano durante 3 semanas consecutivas, não observando estes mesmos efeitos em concentrações menores do fármaco. Mazze et al (1986) ao exporem camundongas em três diferentes fases da gestação a 1,05% de isoflurano, 0,8% de halotano ou 1,65% de enflurano encontraram menor peso fetal nos grupos que sofreram exposição aos inalatórios quando comparado ao grupo controle. Haque et al (2004) expuseram ratas Jcl:ICR á concentrações entre 15000 e 20000 ppm de isoflurano no 7º dia de gestação e observaram no 20º dia de gestação menor peso em fetos do grupo exposto quando comparado ao grupo controle. Com relação á exposição ao isoflurano existem resultados controversos quando observamos resultados na literatura, entretanto novamente foram encontradas diferenças metodológicas, sendo que a maioria dos trabalhos realizaram a exposição durante a gestação sendo no

presente trabalho a exposição realizada prévia ao início da vida reprodutiva. O grupo GS apresentou fetos com tamanhos semelhantes ao GO e GC. Estes resultados demonstram que a exposição ao isoflurano ou ao sevoflurano não afetaram o tamanho fetal no presente estudo.

Os índices reprodutivos taxa copulatória, taxa de fêmeas gestantes com plug, e taxa de gestação total, foram menores no grupo GH, apresentando 65% para taxa copulatória, 54% de taxa de fêmeas gestantes com plug e 35% de taxa de gestação total. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Wharton et al, (1978) que expuseram 46 fêmeas de camundongas á 1% de halotano durante 5 dias consecutivos por semana, por 4 horas diárias durante 9 semanas prévias ao acasalamento com os machos. Como resultados observaram redução nos índices de fertilidade obtendo índices menores que o presente trabalho encontrando 43% para taxa copulatória, 33% para taxa de fêmeas gestantes com plug e 14% para taxa de gestação total. Dentre as explicações que o autor sugere para as baixas taxas de gestação e número de implantações na exposição ao halotano estão: falha na ovulação, produção de ovócitos inviáveis, falha na fertilização ou implantação, ou perda embrionica precoce pós-implantação. Entretanto não explica algum mecanismo para elucidar tal acontecimento. Oropeza-Hernández et al (2002), avaliou o comportamento sexual e motilidade espermática de ratos machos após a exposição á 15 ppm de halotano durante 9 semanas (4 horas por dia, 5 dias por semana). A exposição afetou o número de montas, ejaculação e intervalos pós-ejaculação até 30 dias após a exposição. Fernández-Guasti et al, (1986) sugerem que o halotano age em receptores GABA<sub>a</sub> afetando o comportamento sexual dos machos inibindo o libido, este mesmo mecanismo leva a anestesia pelo halotano pela interação do mesmo em receptores GABA<sub>a</sub> estimulando vias inibitórias no sistema nervoso central. Porém trabalhos demonstrando os efeitos da exposição crônica ao halotano sobre o comportamento sexual em fêmeas não foram encontrados.

Os grupos GI e GS apresentaram valores de índices reprodutivos maiores que o GO e GC, demonstrando que o isoflurano ou sevoflurano não afetaram a fertilidade. O grupo GI apresentou valores de taxa copulatória, taxa de fêmeas gestantes com plug e taxa de gestação total de 80, 95 e 90% respectivamente. Resultados semelhantes ao presente estudo foram obtidos por Mazze (1985) onde

com uma exposição a 0,4% de isofluorano, 5 dias por semana (4 horas por dia) durante 2 semanas prévias a concepção e durante a gestação em camundongas, observou taxa copulatória de 87,5%, taxa de gestação de fêmeas com plug de 85,7% e taxa de gestação total de 84,4%.

Trabalhos avaliando os efeitos da exposição do sevofluorano frente a fertilidade em camundongos não foram encontrados, entretanto os valores de índices de fertilidade no GS foram 85, 100 e 90% para taxa copulatória, taxa de gestação de fêmeas com plug e taxa de gestação total, sendo semelhantes ao valores do grupo GI.

Os Grupos GO e GC apresentaram 60, 100, 65 e 75, 90, 71,2 para taxa copulatória, taxa de fêmeas gestantes com plug e taxa de gestação total respectivamente. Em seus experimentos Wharton et al (1978) e Mazze (1985) utilizaram como controle da exposição dentro da câmara anestésica apenas exposição ao ar comprimido e obtiveram para as respectivas taxas 94, 93, 94 e 85,3, 97,1 e 97,6%. No presente estudo foi utilizado oxigênio a 100% (GO) apresentando índices reprodutivos menores os quais podem ser atribuídos ao estresse sofrido por estes animais na câmara anestésica considerando que neste grupo os mesmos permaneciam acordados durante todo o tempo de exposição. Diferente dos trabalhos realizados por Wharton et al (1978) e Mazze (1985), além do ar comprimido a linhagem de camundongos utilizadas por estes autores era diferente da linhagem de camundongos utilizada no presente estudo o que pode ter levado a resultados divergentes. Já para o GC, Wharton et al (1978) também utilizou como controle fêmeas não expostas, realizando apenas controle reprodutivo, e obteve taxas semelhantes as taxas do GC do presente estudo como taxa copulatória entre 76 e 90%, taxa de fêmeas gestantes com plug de 93 a 97% e taxa de gestação total de 92 a 95%.

Em nenhum grupo do presente estudo foram observadas malformações maiores ou menores em fetos das fêmeas expostas segundo a classificação de Mazze et al (1986). Corroborando com os resultados apresentados neste estudo Halsey et al (1981) não observaram efeitos teratogênicos em fetos de ratas expostas a 10 ppm de halotano ou 20 ppm de enflurano durante 64 dias antes de acasalamento e durante a gestação. Bruce (1973) após expor machos e fêmeas de três linhagens de camundongos á 16 ppm de halotano, por 7 horas diárias, 5 dias

por semana durante 6 semanas não observou malformações em seus descendentes, o que concorda com os resultados deste estudo apesar de que as concentrações empregadas para exposição no presente estudo foram maiores, e o tempo de exposição utilizado por Bruce foi um período mais prolongado. Resultados controversos foram encontrados por Basford & Fink (1968), que após exporem ratas sprague-dawley prenhes á 0,8% de halotano por 12 horas uma única vez entre o 6º e 10º dia de gestação observaram costelas lombares e alterações em corpos vertebrais torácicos de até 50% na exposição durante a gestação.

Mazze et al (1986) não observaram alterações em fetos de ratas sprague-dawley após a exposição a 1,05% de isofluorano, durante 3 dias consecutivos (6 horas diárias) nos dias 8º ao 10º, 11º ao 13 ou 14º ao 16º dia de gestação. Em contraste o mesmo autor Mazze et al (1985), encontraram em fetos de camundongas swiss webster expostas a 0,6% de isofluorano por 4 horas diárias do 6º ao 15º dia de gestação anomalias como diminuição da ossificação, hidronefrose, aumento de cavidade da pelve renal além de alta ocorrência de fenda palatina (em 12% dos fetos, contra 0,75% no grupo controle). O autor sugere como explicações a este contraste respostas espécie-específicas, considerando que a ocorrência de fenda palatina em camundongos é um achado comum. Apesar da utilização de camundongas no presente experimento não foram observadas malformações em fetos de camundongos, sendo os resultados encontrados diferentes dos achados por Mazze et al (1985) onde o mesmo realizou a exposição durante a maior parte da gestação das mesmas, além da linhagem de camundongos utilizada foi diferente.

Wharton et al (1981) avaliaram 4743 fetos de 443 camundongas swiss/ICR expostas á 0,01, 0,1, 0,5 ou 1% de enflurano (que possui o isofluorano como isômero) durante 3 semanas por 7 horas diárias e durante a gestação, encontrando na exposição a 1% de enflurano a ocorrência de costelas lombares e aumento da cavidade da pelve renal. Diminuição do número vértebras sacrococcígeas ossificadas foram observados em fetos de ratas expostas no 7º dia de gestação a concentrações entre 15000 e 20000 ppm de isofluorano (HAQUE et al, 2004). Os estudos anteriores realizaram a exposição contínua durante a gestação, diferente da metodologia empregada no presente estudo onde a exposição foi realizada prévio ao início da vida reprodutiva. Os estudos de exposição durante a gestação demonstraram anomalias em fetos, o que coincide com estudos retrospectivos onde

a incidência de malformações em descendentes de anestesistas foram maiores quando os mesmos trabalhavam durante a gestação.

No presente trabalho a exposição contínua aos três anestésicos inalatórios, não apresentou alterações histopatológicas dos órgãos coletados, o que foi semelhante aos resultados encontrados por Stevens et al (1975) que expuseram ratos, camundongos e cobaias á 15 ppm de halotano ou isofluorano durante 35 dias e não observaram danos hepáticos ou injúria em algum outro órgão coletado. Entretanto Plummer et al (1983) encontraram injúrias hepáticas em ratos expostos a 50 ppm de halotano durante 12 semanas. Puig et al (1999), após exporem camundongas da linhagem CBI á 1,5% de halotano por 40 minutos em intervalos semanais por 3 vezes, observaram aumento do peso do fígado com evidências microscópicas de alterações gordurosas e diminuição da peroxidação lípídica, porém não encontraram alterações em outros órgãos como baço e rins. Porém a exposição contínua á 20 ppm de halotano, isofluorano ou enflurano durante 30 semanas não provocou nenhum dano tecidual (PLUMMER, et al, 1986). Hughes & Lang (1972) observaram após exporem cobaias á 1% de halotano durante 1 hora, por 1 até 5 vezes lesões, hepáticas como necrose hepática focal ou difusa com infiltrados mononucleares. O mesmo autor utilizou em seu grupo controle o mesmo procedimento apenas com oxigênio a 100% não observando alterações no parênquima hepático. Halsey et al (1981) encontraram mudanças histológicas em órgãos de ratos machos e fêmeas expostos a 10 ppm de halotano ou 20 ppm de enflurano por até 64 dias antes do acasalamento e durante a gestação.

A incidência de hepatotoxicidade pelo halotano ocorre com uma freqüência de 1 em 35.000 anestésias (COUSINS et al, 1984). Relatos de casos de danos hepáticos em pacientes anestesiados e anestesistas com aumento de enzimas hepáticas, icterícia e cirrose hepática são comuns (BELFRAGE et al 1966; KLATSKING et al, 1969). A incidência de hepatotoxicidade após anestesia com isofluorano ou sevofluorano é presumivelmente muito pequena, devido ao baixo metabolismo hepático destes fármacos. Camundongas swiss webster foram expostas á 200, 1000 ou 5000 ppm de isofluorano durante 9 semanas onde não foram observadas diferenças em níveis de citocromos b5 e P450, nem alteração da atividade microssomal hepática (RICE et al, 1986).

Com relação a nefrotoxicidade pode ocorrer devido a liberação de metabólitos como fluoreto inorgânico o que era de maior incidência com o uso de metoxifluorano. Eger et al (1987) não observaram alterações em órgãos como cérebro, fígado, rins, coração e pulmões de ratos expostos a 13 440 ppm de isofluorano por 2 horas a cada 2 semanas totalizando 6 exposições de 2 horas. Elena et al (2003), ao exporem camundongos a 30 000 ppm de sevofluorano uma vez por semana, durante três semanas não observaram alterações em função esplênica, ou evidências de alterações histológicas em fígado e rins.

Ambas hepatotoxicidade e nefrotoxicidade podem ocorrer devido a geração de metabólitos tóxicos nos órgãos alvo. A formação de metabólitos é maior com a utilização de halotano, pois o mesmo apresenta maior metabolização hepática que os demais, e alguns de seus metabólitos como íons brometo, cloreto e ácido trifluoroacético podem ser extremamente hepatotóxicos. O isofluorano e sevofluorano apresentam mínima metabolização hepática que resulta em poucos metabólitos, onde no caso do sevofluorano seu principal metabólito o hexafluoroisopropanol não apresenta potencial tóxico. Diferentes dos achados do presente estudo em relação aos exames histopatológicos dos órgãos, os anestésicos halogenados tem sido associados com duas diferentes formas de hepatotoxicidade a metabólica e a auto-imune.

Frente a diversos resultados contraditórios encontrados na literatura, e os resultados do presente estudo demonstrando que o halotano afetou a fertilidade e viabilidade embrionária e gestacional, tem-se o seguinte questionamento, “quais resultados são corretos”? De fato todos os estudos são válidos, mas deve ser enfatizado que não existem protocolos únicos, nem uma única espécie ideal para estudos de toxicidade reprodutiva. A interpretação dos resultados de estudos de toxicidade deve levar em conta vários fatores como a prevalência de achados anormais particulares, ocorrência de anormalidades concomitantes no mesmo estudo, o número de diferentes espécies que desenvolvam a mesma anormalidade, e talvez o mais importante a tendência em espécies teste em desenvolver uma lesão particular em comparação com a tendência em humanos (MAZZE et al, 1986). A extrapolação direta para humanos é muito limitada considerando as diferenças entre espécies para metabolismo e excreção dos fármacos em questão, além de diferenças na suscetibilidade a fenômenos tóxicos. Além disso os níveis de

exposição aos quais as camundongas foram expostas no presente trabalho é muito maior que as concentrações subanestésicas encontradas em salas cirúrgicas e de recuperação, concordando com diversos trabalhos presentes na literatura que afirmam a existência de uma ampla margem de segurança para profissionais rotineiramente expostos a anestésicos halogenados (MAZZE, 1985, MAZZE et al, 1986; WHARTON et al, 1978, 1979, WHARTON, 1981).

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e com base na metodologia utilizada pode-se concluir que:

- 1- A exposição ao halotano exerceu efeitos prejudiciais a fertilidade, viabilidade embrionária e gestacional em fêmeas de camundongos.
- 2- A exposição ao isoflurano ou sevoflurano não foram prejudiciais a fertilidade, viabilidade embrionária e gestacional em fêmeas de camundongos.
- 3- A exposição repetida ao halotano, isoflurano ou sevoflurano, não acarretaram em aumento na incidência de abortos ou teratogênias em fêmeas de camundongos.

## 6. REFERÊNCIAS

ASKROG, V.F. & HARVALD, B. **Nordisk Medicin** v. 83, 1970,498p.

AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS (ASA), Committee on Occupational Health of Operating Room Personnel — Waste Anesthetic Gases — **Information for Management in Anesthetizing Areas and the Postanesthesia Care Unit**, 2004.

ARNOLD III, W. P. Environmental safety including chemical dependency. In: Miller, R.D. **Anesthesia**. 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 2701-2703, 2000.

BADEN, J. M. et al. Carcinogenicity of halothane in Swiss/ICR mice. **Anesthesiology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 20-26,1979.

BADEN, J. M. et al. Carcinogen bioassay of isoflurane in mice. **Anesthesiology**, Palo Alto, v. 65, n. 5, p. 750-753, 1988.

BASFORD, A.B. & FINK, R. The teratogenicity of halothane in the rat. **Anesthesiology**, v. 29, n. 6, p. 1167-1173, 1968.

BELFRAGE, S.; AHLGREN, J. & AXELSON, S. Halothane hepatitis in an anesthetist. **Lancet**, v.2, p.1466-1467, 1966.

BERGHAUS, T. M. et al. Hepatotoxicity following desflurane anesthesia. **Hepatology**, v. 29, p.613-614, 1999.

BHANDARI, V. et al. Hyperoxia causes angiotensin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. **Nat Med**. v. 12, p.1286-93, 2006.

BRUCE, D.L. Murine fertility unaffected by traces of halothane. **Anesthesiology**, v. 38, n. 5, p.473-477, 1973.

BRUNT, E. M. et al. Fulminant hepatic failure after repeated exposure to isoflurane anesthesia: a case report. **Hepatology**, v. 13, p.1017-1021, 1991.

BURING, J. E. et al. Health experiences of operating room personnel. **Anesthesiology**, v.62, p.325-330, 1985.

BUSSARD, D.A. et al. Fetal changes in hamsters anesthetized with nitrous oxide and halothane. **Anesthesiology**, v.41, n.3, p, 275-278, 1974.

CEYHAN, A. et al. Effects of exposure to new inhalational anesthetics on spermatogenesis and sperm morphology in rabbits. **Arch Androl**, v.51, p. 305-315, 2005.

CHETKOWSKI, R.J. & NASS, T.E. Isoflurane inhibits early mouse embryo development in vitro. **Fertil Steril**, v.49, p.171-173, 1988.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C. & SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 28, n.1 p.11-23, 2007.

CLOUGH, G. Environmental factors in relation to the confort and well-being of the laboratory rats and mice. In: LASA-UFAW SYMPOSIUM: STANDARDS IN LABORATORY ANIMAL MANAGEMENT – UFAW. **Proceedings**, London, p.5-24, 1984.

COATE, W. B.; ULLAND, B. M. & LEWIS, T. R. Chronic exposure to low concentrations of halothane-nitrous oxide: lack of carcinogenic effect in the rat. **Anesthesiology**, Palo Alto, v. 50, n. 4, p. 306-309, 1979.

COHEN, E. N.; BELVILLE, J. W. & BROWN, B. W. Anesthesia, pregnancy, and miscarriage: A study of operating room nurses and anesthesiologists. **Anesthesiology**, v.35, p.343-347, 1971.

COUSINS, M.J. PLUMMER, J.L. & DE LA HALL, P. Toxicity of volatile anesthetics agents. **Clinics in anesthesiology**, v.2, 552 p., 1984.

CRAPO, J. D. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. **Annual Reviews physiology**, North Carolina, USA, v. 48, n. 1, p. 721-731, 1986.

DOBSON, A.J. **An introduction to generalized linear models**. 2. ed. Chapman e Hall : Boca Raton, Florida. USA. 225 p., 2002.

DOENICKE, A.; WITTMAN, R.; HEINRICH, H. & PAUSCH, H. The abortive effect of halothane. **Anesth Analg**, v. 32, p.41–6, 1975.

EASSOM, W. A review of Rabbit and Rodent production medicine. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 3, p.131-139, 2001.

EBERT, T. J. & SCHMID, P. G III. Anestesia inalatória. In: BARASH, P. G.; CULLEN, B.F.; Stoelting, R.K. **Anestesia clínica**. São Paulo: Manole, 2004, p. 377-417.

EGER, E. I.; SAIDMAN, L. J. & BRANDSTATER, B. Minimum alveolar concentration: a standard of anesthetic potency. **Anesthesiology**, v.26, p. 756-63, 1965.

EGER, E. I. et al. A test of the carcinogenicity of enflurane, isoflurane, halothane, methoxyflurane, and nitrous oxide in mice. **Anesthesia and Analgesia**, Boston, v. 57, n. 6, nov., p. 678-694, 1978.

EGER, E.I.; JOHNSON, B.H. & FERRELL, L.D. Comparison of the toxicity of I-653 and isoflurane - in rats: a test of the effect of repeated anesthesia and use of dry soda lime. **Anesth Analg**; v.66, p.1230-1233, 1987.

ELENA, G. et al. Effects of repetitive sevoflurane anaesthesia on immune response, select biochemical parameters and organ histology in mice. **Lab Anim**, v.37, p.193-203, 2003.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LARSSON, K. & BEYER, C.. GABAergic control of masculine sexual behavior. **Pharmacol, Biochem Behav**; v.24, p.1065 - 70, 1986

FINK, B. R.; SHEPARD, T. H. & BLANDAU, R. J. Teratogenic activity of nitrous oxide. **Nature**, v.214, p. 146, 1967.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Salvador, Bahia. Maio 2005.

FLEGAL, M. C.; KUHLMAN, S. M. Anesthesia monitoring equipment for laboratory animals. **Laboratory Animal**, London, v. 33, Jan., p. 31-36, 2004.

FOSTER, H. L.; SMALL, J. D. & FOX, J. G. The mouse in biomedical research. **Normative biology, Immunology and Husbandry**. v. 3, 1983

FUJINAGA, M. et al. Reproductive and teratogenic effects of nitrous oxide, isoflurane, and their combination in Sprague-Dawley rats. **Anesthesiology**, v. 67, p.960-964, 1987.

FUJINAGA, M. Teratogenicity of nitrous oxide. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, v. 15, n. 3, p. 363-375, 2001

GENTILI, A. et al. Exposure of personnel to sevoflurane during paediatric anaesthesia: influence of professional role and anaesthetic procedure. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 21, p.638-645, 2004.

GRANT, C.J.; POWELL, J.N. & RADFORD, S.G. The effects of halothane on DNA synthesis and mitosis in root tip meristems of *Vicia faba*. **Br. J. Anesth.**, v.46, p.653-657, 1974.

GREEN, C. J. Neuroleptoanalgesic Drug Combination in the Anesthetic management of small. **Laboratory Animal**, London, v.9, p. 161-165, 1975.

GUIRGUISS, S. S. et al. Health effects associated with exposure to anaesthetic gases in Ontario hospital personnel. **Occup. Environ. Med.**, v. 47, p.490-497, 1990.

HAFEZ, E.S.E. Transporte e sobrevivência dos gametas. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo-Manole., 1995. 6 ed., p. 146-166.

HALSEY, M. J. et al. Maternal and paternal chronic exposure to enflurane and halothane: Fetal and histological changes in the rat. **Br. J. Anaesth.**, Harrow, v. 53, n. 3, p. 203-215, 1981.

HAQUE, S. F. et al. Anesthesia and acoustic stress-induced intra-uterine growth retardation in mice. **J Reprod Dev**, v.50, p.185-190, 2004.

HEMMINKI, K.; KYIRONEN, P. & LINDBOHM, M. Spontaneous abortions and malformations in the offspring of nurses exposed to anaesthetic gases, cytostatic drugs, and other potential hazards in hospitals, based on registered information of outcome. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v.39,p. 141-147, 1985.

HEYMOOD, R. The use of animals in testing. **ATLA**, v.14, n.4, p.329-33, 1987.

HOERAUF, K. H. et al. Exposure to Sevoflurane and Nitrous Oxide During Four Different Methods of Anesthetic Induction. **Anesth Analg.**, v.88, p.925–929, 1999.

HUGHES, H.C. & LANG, M. Hepatic necrosis produced by repeated administration of halothane to guinea pigs. **Anesthesiology**, v. 36, n 5, p.466-471, 1972.

JACOBY, R.O.; FOX, J.G. & DAVISSON, M. Biology and diseases of mice. In: FOX, J.G.; ANDERSON, L.C.; LOEW, F.M. & QUIMBY, F.W. **Laboratory animal medicine**. California/USA – Elsevier Science, 2002. 2<sup>nd</sup> ed. cap. 3, p. 35-120.

KEEGAN, R. D. Anestésicos Inalatórios. In: GREENE, S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre-Artmed, 2004. cap. 16, p. 123-130.

KENNEDY, G.L.Jr. et al. Reproductive and teratologic studies with isoflurane. **Drug Chem Toxicol**, v.1, p.75-88, 1977.

KLATSKING, G. & KIMBERG, D.W. Recurrent hepatitis attributable to halothane sensitization in an anesthetist. **New engl j med**, v.280, p.515-522, 1969.

KNILL-JONES, R.P; MOIR, D.B. & RODRIGUEZ, L.V. Anesthetic practice and pregnancy: Controlled survey of women anesthetists in the United Kingdom. **Lancet**, v.1, p. 1326-1328, 1972.

KÖNIG, B. D. Estratégia do cuidado parental de camundongos (*Mus musculus*): conflito pai-filho. Tolerância de outros filhotes e a resposta a escassez de alimentos. Tese de doutorado. University of Konstanz, 1985.

KRACKOW, S. & GRUBER, F. Sex ratio and litter size in relation to parity and mode of conception in three inbred strains of mice. **Laboratory Animals**, v.24, p.345-352, 1990.

KUNDOMAL, Y.R. & BADEN, J.M. Toxicity and teratogenicity of inhaled anesthetics in *Drosophila melanogaster*. **Toxicol Lett** , v.25, p.287-291, 1985.

LEE, E.J.; BONGSO, A.; KUMAR, A. Evaluation of inhalational anaesthetics on murine in vitro fertilization. **Ann Acad Med Singapore**, v.23, p.479-485, 1994.

LONG, M.T. & BASZLER, T.V. Fetal loss BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. **J. parasitol.** Aug., v.82 n. 4, p.608-611, 1996.

MASSONE, F. Anestesia inalatória. In: MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2003, p. 225.

MATT, D.W. et al. Effects of sera from patients given various anesthetics on preimplantation mouse embryo development in vitro. **J In Vitro Fert Embryo Transf**, v.8, p.191-197, 1991.

MAZZE, R. I. Fertility, reproduction, and postnatal survival in mice chronically exposed to isoflurane. **Anesthesiology**, Palo Alto, v. 63, n. 6, p. 663-667, 1985.

MAZZE, R.I., et al. Fetal development in mice exposed to isoflurane. **Teratology**, v.32, p.339-345, 1985.

MAZZE, R. I.; et al. Reproductive and teratogenic effects of nitrous oxide, halothane, isoflurane, and enflurane in Sprague-Dawley rats. **Anesthesiology**, Palo Alto, v. 64, n. 3, p. 339-344, 1986.

MERKEL, G. & EGER, E.I. A comparative study of halothane and halopropane anesthesia including method for determining equipotency. **Anesthesiology**, 24: 346-57, 1963.

MOORE, K. Embriologia clínica. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1990.

MUNSON, E.S. Effect of hypothermia on anesthetic requirement in rats. **Lab. Anim. Care**, v.20, p.1109-13, 1970

NAGY, A. et al. Summary of mouse development. In: NAGY, A.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN, K.; BEHRINGER, R. **Manipulating the mouse embryo – A laboratory manual third edition**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, p.30-140, 2003.

NATALINI, C.C. **Polígrafo de Anestesiologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, p. 132, 2001.

O'LEARY, G. et al. Antiproliferative actions of inhalational anesthetics: comparisons to the valproate teratogen. **International Journal Of Developmental Neuroscience: The Official Journal Of The International Society For Developmental Neuroscience**, Banff , v. 18, n. 1, fev., p. 39-45, 2000.

OLIVA, V.N.L.S. Anestesia Inalatória In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca. 2002, cap. 16, p. 174-183.

OLIVA, V.N.L.S. & FANTONI, D.T. Anestesia Inalatória. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca. 2010 cap.16. p.247-257.

OROPEZA-HERNÁNDEZ, L. F. et al. Inhibitory action of halothane on rat masculine sexual behavior and sperm motility. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.72, p.937–942, 2002.

PALAHNUIK, R.J.; SHNIDER, S.M. & EGER II, E.I. Pregnancy decreases the requirement for inhaled anesthetic agents. **Anesthesiology**. v.41, p.82-83, 1974.

PASSOS, L.A.C. ET AL. Auto suficiência na criação de maravalha utilizada na criação de animais de laboratório. **Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/artigo5.htm>**, 2006.

PEREIRA, D.M. et al. Efeitos da Alta Concentração de Oxigênio (Hiperóxia) por Tempo Prolongado no Tecido Pulmonar de Ratos Wistar. **Rev. Bioc. UNITAU**. v. 14, n. 2, 2008.

PLUMMER, J.L. et al. Hepatic injury in rats due to prolonged subanaesthetic halothane exposure. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v.53, p. 16-20, 1983.

PLUMMER, J.L. et al. Effects of chronic inhalation of halothane, enflurane or isoflurane in rats. **British Journal of Anaesthesia**, v.58, p.517-523, 1986.

PROPHET, E.B. et al. Laboratory methods in histotechnology. **Washington: American registry of pathology**, 274p., 1992.

PUIG, N.R. et al. Effects of halothane reexposure in female mice and their offspring. **Reproductive Toxicology**, v.13, p.361-367, 1999.

PUIG, N.R. et al. Effects of sevoflurane general anesthesia: immunological studies in mice. **Int Immunopharmacol**, v.2, p.95-104, 2002.

QUASHA, A.L.; EGER II, E.I. & TINKER, J.H. Determination and applications of MAC. **Anesthesiology**, v.53, p.315-334, 1980.

RIBEIRO, S.M.L.; CAMPOS, P. & TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Rev Farm Bioquím Univ, São Paulo**, v.31, n.1, p. 21-28, 1995.

RICE, S.A.; BADEN, J.M. & KUNDOMAL, Y.R. Effects of subchronic intermittent exposure to isoflurane in Swiss Webster mice. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v.6, p.285-293, 1986.

RIVERA, E.A.B. Ética e bem-estar na experimentação animal. **Rev. Cons. Fed. Méd. Vet.**, v.1, p.12-15, 1992.

SAIDMAN, L.J. & EGER, E.I. Effect of nitrous oxide and of narcotic premedication on the alveolar concentration of halothane required for anesthesia. **Anesthesiology**, v.25, p.302-306, 1964.

SAIZ MORENO, L. et al. Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario. **Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrárias/Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación**, 25p., 1983.

SALÉN, J.C.W. Animal models: principles and problems. In: ROLLIN, B.E.; KESSEL, M.L. **The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species**. 3rd.ed. Boston: CRC Press, 560p., 1995.

SANTOS, B.F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, p.115-8, 2002.

SAS Institute Inc<sup>®</sup>. SAS Ver. 9.1 . 3 SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA. Lic. UDESC, 2003.

SHELLER, M.S. New volatile anesthetics: desflurane and sevoflurane. **Seminars Anesth.**, v. 11, p. 114-122, 1992.

SETOYAMA, K. et al. Effects of propofol-sevoflurane anesthesia on the maternal and fetal hemodynamics blood gases, and uterine activity in pregnant goats. **J Vet Med Sci**, v.65, p.1075-1081, 2003.

SILVER, L.M. Mouse Genetics, **Oxford University Press**, 1995.

SNITKOFF, G.G. Testes biológicos. In: GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.556-568, 2004.

SONNER, J.M.; GONG. D. & EGER. E.I. Naturally occurring variability in anesthetic potency among inbred mouse strains. **Anesth Analg**, v.91, p.720-726, 2000.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. & DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics – a biomerical approach**. 3. Ed. McGraw-Hill : New York, USA, 1997, 666 p.

STEFFEY, E.P. & EGER II, E.I. Hyperthermia and halothane MAC on dog. **Anesthesiology**. v.41, p. 392-6, 1974.

STEVENS, W.C. et al. Comparative toxicities of halothane, isoflurane and diethyl ether at subanaesthetic concentrations in laboratory animals. **Anesthesiology**, v. 42, p.438-419, 1975.

STURROCK, J. E. Effect of volatile anaesthetics on cell survival as measured by colony forming ability. **British Journal of Anaesthesia**, England, v. 47,n. 8, jan. p. 831-835, 1975.

THEILER, K. The house mouse: Atlas of Embryonic development. **Spring-Verlag**, Nova York, Berlim, Heidelberg. 2º Ed, 1989.

VAISMAN, A.I. Working conditions in surgery and their effects on the health of anesthesiologists. **Eksp Khir Anesteziol**, v.3, p.44-49, 1967.

VALENÇA, S.S et al. Efeito da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. **J. bras. pneumol.** v.33 n.6, São Paulo Nov./Dec. 2007

VALVERDE, A. et al. Validation of several types of noxious stimuli for use in determining the minimum alveolar concentration for inhalation anesthetics in dogs and rabbits. **Am J Vet Res**, v.64, p.957-62, 2003.

WARD, G.S. & BYLAND, R.R. Concentration of halothane in veterinary operating and treatment rooms. **J.Am. Vet. Med. Assoc.** Jan. v.180, n.2, p.174-177, 1982.

WARREN, J.R.; SHAW, B. & STEINKAMPF, M.P. Inhibition of preimplantation mouse embryo development by isoflurane. **Am J Obstet Gynecol**, v.166, p.693-698, 1992.

WEINBERG, C.R.; WICOX, A.J. Reproductive epidemiology. In: ROTHMANN, K.J & GREENLAND, S. **Modern epidemiology**, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p.585-608, 1998.

WHARTON, R. S. et al. Fertility, reproduction and postnatal survival in mice chronically exposed to halothane. **Anesthesiology**, Palo Alto, v. 48, n. 3, p. 167-174, 1978.

WHARTON, S. W. et al. Fetal Morphology in mice exposed to halothane. **Anesthesiology**, v.51, p.532-537, 1979.

WHARTON, R.S.; MAZZE, R.I. & WILSON, A. Reproduction and fetal development in mice chronically exposed to enflurane. **Anesthesiology**, v.54, p. 505-510, 1981.

WHITCHER, C.E.; COHEN, E.N. & TRUDELL, J.R. Chronic Exposure to Anesthetic Gases in the Operating Room. **Anesthesiology**, v. 35, n. 4, 1971.

## 7. ANEXOS

A seguir estão representados os valores individuais das camundongas, e dos fetos dos grupos halotano (GH), isofluorano (GI), sevofluorano (GS), oxigênio (GO) (n=20 cada), e do grupo controle (GC) (formado por quatro grupos controle correspondentes a cada grupo experimental n=80)

**Controle de temperatura (T°C) no interior da caixa de exposição aferida a cada 30 minutos durante a mesma para os grupos GH, GI, GS e GO.**

<b>Tempo</b>	<b>½ hora</b>	<b>1º hora</b>	<b>1 e ½ hora</b>	<b>2º hora</b>	<b>2 e ½ horas</b>	<b>3º hora</b>	<b>3 e ½ horas</b>	<b>4º hora</b>
<b>Grupo e dia</b>								
<b>GH 1º dia</b>	20	20	22	24	24	21	21	21
<b>GH 2º dia</b>	22	22	22	24	22	22	24	21
<b>GH 3º dia</b>	23	21	21	24	21	22	23	24
<b>GH 4º dia</b>	21	20	20	23	22	23	23	23
<b>GH 5º dia</b>	21	22	22	21	22	22	22	23
<b>GI 1º dia</b>	20	21	22	22	22	22	22	22
<b>GI 2º dia</b>	21	20	20	22	21	22	21	22
<b>GI 3º dia</b>	21	22	21	21	21	21	21	22
<b>GI 4º dia</b>	22	21	21	21	23	21	22	21
<b>GI 5º dia</b>	22	22	22	22	22	21	21	22
<b>GS1º dia</b>	21	23	23	23	21	24	22	22
<b>GS 2º dia</b>	21	24	24	22	24	24	22	21
<b>GS 3º dia</b>	22	20	20	23	24	24	22	22
<b>GS 4º dia</b>	24	21	22	22	21	23	21	22
<b>GS 5º dia</b>	22	22	21	23	23	23	24	23
<b>GO 1º dia</b>	22	23	22	21	23	23	23	23
<b>GO 2º dia</b>	23	24	22	22	22	21	23	21
<b>GO 3º dia</b>	22	21	20	22	21	22	21	22
<b>GO 4º dia</b>	22	20	20	21	23	22	22	22
<b>GO 5º dia</b>	23	22	22	23	23	22	21	24

**Grupo Halotano (GH)****Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	3
	<b>2º dia</b>	3
	<b>3º dia</b>	2
	<b>4º dia</b>	5
	<b>5º dia</b>	0
	<b>total</b>	13

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	3	1	0
2	3	9	5
3	1	9	0
4	0	0	11
5	0	0	0
6	0	0	2
<b>Total:</b>	7	19	18

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	0	0	0
2	3	6	9
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	10	10
6	0	10	10
7	2	11	13
<b>Total:</b>	5	37	42

**Grupo Isoflurano (GI)****Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	7
	<b>2º dia</b>	2
	<b>3º dia</b>	5
	<b>4º dia</b>	1
	<b>5º dia</b>	1
	<b>Total</b>	16

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	11	1	0
2	9	0	1
3	6	0	4
4	4	8	0
5	7	2	0
6	2	1	0
7	2	7	0
8	3	5	0
9	0	0	0
<b>Total:</b>	44	24	5

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	6	3	9
2	0	13	13
3	3	7	10
4	0	9	9
5	2	12	14
6	0	12	12
7	0	12	12
8*	0	9	9
9*	1	16	17
10*	0	13	13
<b>Total:</b>	12	106	118

\*fêmea sem placa, porém prenhe após 14 dias de último acasalamento.

**Grupo Sevofluorano (GS)****Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	2
	<b>2º dia</b>	5
	<b>3º dia</b>	7
	<b>4º dia</b>	3
	<b>5º dia</b>	0
	<b>Total</b>	17

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	2	0	3
2	1	2	1
3	7	0	1
4	11	0	2
5	5	3	1
6	4	3	5
7	4	0	0
8	9	0	0
9	2	2	1
<b>Total:</b>	45	10	14

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	1	13	14
2	7	9	16
3	5	8	13
4	1	13	14
5	0	9	9
6	2	5	7
7	2	11	13
8	1	10	11
9*	3	12	15
<b>Total:</b>	22	90	112

\*fêmea sem placa, porém prenhe após 14 dias de último acasalamento.

**Grupo Oxigênio (GO)****Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	3
	<b>2º dia</b>	5
	<b>3º dia</b>	2
	<b>4º dia</b>	2
	<b>5º dia</b>	0
	<b>total</b>	12

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	6	2	5
2	7	2	2
3	0	5	1
4	4	1	2
5	6	4	1
6	2	0	0
7	4	5	1
<b>Total:</b>	29	19	12

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	0	6	6
2	2	11	13
3	1	11	12
4	2	7	9
5	2	9	11
6*	2	8	10
<b>Total:</b>	9	52	61

\*fêmea sem placa, porém prenhe após 14 dias de último acasalamento.

**Grupo Controle halotano (GC)      Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	1
	<b>2º dia</b>	6
	<b>3º dia</b>	3
	<b>4º dia</b>	4
	<b>5º dia</b>	0
	<b>total</b>	14

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	2	0	0
2	13	0	1
3	10	1	2
4	2	6	0
5	4	3	3
6	10	1	3
7	0	7	2
<b>Total:</b>	41	18	11

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	0	12	12
2	6	5	11
3	1	10	11
4	0	0	0
5	0	0	0
6	3	12	15
7	6	8	14
<b>Total:</b>	16	47	63

\*fêmea sem placa, porém prenhe após 14 dias de último acasalamento.

**Grupo Controle isofluorano (GC) Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	<b>3</b>
	<b>2º dia</b>	<b>1</b>
	<b>3º dia</b>	<b>9</b>
	<b>4º dia</b>	<b>0</b>
	<b>5º dia</b>	<b>1</b>
	<b>Total</b>	<b>14</b>

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	4	2	0
2	3	9	4
3	8	3	0
4	3	8	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	3	6	1
<b>Total:</b>	<b>21</b>	<b>28</b>	<b>5</b>

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	0	13	13
2	3	9	12
3	0	11	11
4	2	9	11
5	0	11	11
6	0	0	0
7	2	7	9
<b>Total:</b>	<b>7</b>	<b>60</b>	<b>67</b>

**Grupo Controle Sevofluorano (GC)      Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	3
	<b>2º dia</b>	2
	<b>3º dia</b>	5
	<b>4º dia</b>	4
	<b>5º dia</b>	2
	<b>Total</b>	16

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	1	7	0
2	6	1	5
3	3	2	0
4	11	2	4
5	1	0	0
6	6	2	0
7	1	0	0
8	3	5	1
<b>Total:</b>	32	19	10

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	0	0	0
2	2	10	12
3	1	14	15
4	1	12	13
5	0	5	5
6	4	10	14
7	1	5	6
8	7	7	14
9*	1	9	10
<b>Total:</b>	17	72	89

\*fêmea sem placa, porém prenhe após 14 dias de último acasalamento.

**Grupo Controle oxigênio (GC)      Número de fêmeas e acasaladas: 20**

<b>Avaliação de plug:</b>	<b>1º dia</b>	3
	<b>2º dia</b>	2
	<b>3º dia</b>	5
	<b>4º dia</b>	4
	<b>5º dia</b>	2
	<b>Total</b>	16

**Avaliação de embriões:**

<b>Camundonga</b>	<b>Mórulas</b>	<b>Blastocistos</b>	<b>Degenerados</b>
1	1	5	0
2	6	3	0
3	3	4	0
4	9	2	5
5	1	0	0
6	4	4	5
7	3	0	0
8	3	3	2
<b>Total:</b>	30	21	12

**Avaliação de gestação:**

<b>Camundonga</b>	<b>Reabsorções</b>	<b>Fetos</b>	<b>Implantações</b>
1	1	0	1
2	2	12	14
3	1	12	13
4	1	12	13
5	0	5	5
6	4	10	14
7	1	5	6
8	4	7	11
9*	3	9	12
<b>Total:</b>	17	72	89

\*fêmea sem placa, porém prenhe após 14 dias de último acasalamento.

**Tamanho Fetal**  
**grupo Halotano (GH), Isoflurano (GI), Sevoflurano (GS) e Oxigênio (GO).**

Feto	Grupo	Tamanho (mm)	Feto	Grupo	Tamanho (mm)
1	GH	10	43		12
2		11	44		13
3		11	45		13
4		9	46		12
5		8	47		13
6		9	48		12
7		9	49		12
8		10	50		12
9		11	51		13
10		11	52		12
11		11	53		13
12		12	54		12
13		11	55		12
14		10	56		12
15		10	57		13
16		10	58		12
17		9	59		12
18		9	60		12
19		9	61		12
20		9	62		12
21		11	63		12
22		12	64		12
23		11	65		12
24		11	66		12
25		11	67		12
26		12	68		12
27		12	69		12
28		9	70		12
29		9	71		12
30		9	72		12
31		8	73		12
32		8	74		12
33		9	75		12
34		9	76		12
35		10	77		12
36		10	78		11
37		10	79		12
38	GI	13	80		12
39		12	81		12
40		12	82		11
41		12	83		11
42		12	84		11

Feto	Grupo	Tamanho (mm)	Feto	Grupo	Tamanho (mm)
85		11	127		11
86		11	128		11
87		11	129		11
88		11	130		11
89		11	131		11
90		11	132		12
91		12	133		12
92		11	134		12
93		12	135		11
94		12	136		11
95		11	137		10
96		11	138		10
97		12	139		10
98		12	140		11
99		11	141		10
100		11	142		11
101		12	143		11
102		11	144		11
103		12	145		12
104		12	146		11
105		12	147		12
106	GS	11	148		11
107		11	149		11
108		11	150		12
109		11	151		12
110		11	152		11
111		11	153		11
112		12	154		11
113		11	155		11
114		12	156		11
115		11	157		12
116		11	158		12
117		12	159		12
118		13	160		12
119		12	161		10
120		12	162		10
121		12	263		10
122		10	164		10
123		10	165		10
124		10	166		12
125		10	167		11
126		10	168		11

<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho(mm)</b>	<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho (mm)</b>
169		12	211		12
170		12	212		11
171		12	213		11
172		12	214		11
173		12	215		10
174		12	216		9
175		13	217		9
176		11	218		9
177		11	219		9
178		11	220		11
179		11	221		11
180		10	222		9
181		10	223		9
182		11	224		10
183		12	225		12
184	GO	12	226		12
185		12	227		12
186		12			
187		12			
188		12			
189		13			
190		11			
191		11			
192		11			
193		11			
194		10			
195		10			
196		11			
197		10			
198		10			
199		10			
200		11			
201		11			
202		11			
203		11			
204		10			
205		12			
206		12			
207		12			
208		12			
209		12			
210		12			

**Tamanho Fetal Grupo controle (GC).**

<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho(mm)</b>	<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho (mm)</b>
1	GC	11	43		12
2		11	44		12
3		12	45		11
4		12	46		11
5		11	47		11
6		12	48		11
7		12	49		11
8		12	50		10
9		11	51		10
10		12	52		11
11		12	53		11
12		12	54		10
13		11	55		10
14		12	56		11
15		12	57		11
16		13	58		12
17		13	59		12
18		13	60		12
19		11	61		12
20		13	62		12
21		11	63		10
22		11	64		11
23		11	65		11
24		11	66		12
25		12	67		10
26		12	68		9
27		12	69		9
28		13	70		10
29		12	71		10
30		12	72		9
31		12	73		11
32		13	74		11
33		12	75		11
34		12	76		11
35		11	77		11
36		12	78		10
37		12	79		10
38		12	80		11
39		12	81		11
40		10	82		11
41		11	83		11
42		12	84		10

<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho (mm)</b>	<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho (mm)</b>
85		12	127		11
86		12	128		11
87		12	129		11
88		12	130		11
89		12	131		11
90		12	132		12
91		13	133		12
92		11	134		12
93		11	135		12
94		11	136		12
95		11	137		12
96		11	138		12
97		11	139		11
98		11	140		9
99		11	141		10
100		11	142		11
101		11	143		11
102		10	144		12
103		10	145		12
104		10	146		12
105		9	147		11
106		10	148		11
107		11	149		11
108		11	150		10
109		11	151		9
110		11	152		11
111		11	153		11
112		11	154		12
113		11	155		12
114		10	156		12
115		12	157		10
116		12	158		12
117		12	159		12
118		12	160		12
119		12	161		12
120		12	162		12
121		11	263		13
122		11	164		11
123		11	165		11
124		10	166		11
125		10	167		11
126		11	168		11

<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho (mm)</b>	<b>Feto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tamanho (mm)</b>
169		11	211		11
170		11	212		9
171		11	213		10
172		11	214		11
173		11	215		11
174		10	216		12
175		10	217		12
176		10	218		12
177		9	219		11
178		10	220		11
179		11	221		11
180		11	222		10
181		11	223		9
182		11	224		11
183		11	225		11
184		11	226		12
185		11	227		12
186		10	228		12
187		12	229		10
188		12	230		12
189		12	231		12
190		12	232		11
191		12	233		12
192		12			
193		11			
194		11			
195		11			
196		10			
197		10			
198		11			
199		11			
200		11			
201		11			
202		11			
203		11			
204		12			
205		12			
206		12			
207		12			
208		12			
209		12			
210		12			