

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO SEVOFLURANO EM CAMUNDONGOS MACHOS SOBRE PARÂMETROS RELACIONADOS AO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO NA PROLE

CATIANE PRESTES DOS SANTOS¹; SABRINA KOHLS DE ARAUJO²; IZANI ABONEL COSTA³; MARTIELO IVAN GEHRCKE⁴; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR⁵; CARINE DAHL CORCINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – catianeprestes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – saakohls@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – izaniboel@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – martielogehrcke@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Rio Grande - antoniovarela@furg.br

⁶Universidade Federal de Pelotas - corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é um grupo de distúrbios do neurodesenvolvimento e condições caracterizadas por deficiências nas interações sociais, comunicação, comportamentos restritivos e repetitivos (SCHAAF et al., 2020; LORD et al., 2020). A complexibilidade da etiologia do TEA inclui fatores de risco genéticos e ambientais, porém, variáveis ligadas a genética são encontradas em apenas 30% dos pacientes diagnosticados com a doença (SCHAAF et al., 2020; LYALL et al., 2017; MODABBERNIA et al., 2017).

Diversos estudos demonstram a associação entre idade paterna com o risco de autismo, e em menor grau também a idade avançada materna, fatores que implicam no envelhecimento das células germinativas (BOTLE et al., 2019; LORD et al., 2020).

Em um trabalho publicado por Jill Escher e colaboradores (2022), se ressalta a possibilidade de interrupção do epigenoma das células germinativas, induzidos por alguma substância tóxica exógena durante o desenvolvimento dos gametas dos pais. Semelhante a casos de mutação germinativa, essas influências externas podem desregular a transcrição de genes relacionados ao cérebro no desenvolvimento fetal e inicial da vida, resultando em fenótipos anormais.

Evidências recentes sugerem uma importante associação entre a exposição à anestésicos inalatórios, alteração no cérebro, alterações de comportamento e desenvolvimento, mudanças comportamentais, dificuldade cognitiva e de linguagem (VUTZKITS & XIE, 2016; BRIONI et al., 2017).

O sevoflurano é um anestésico inalatório mais utilizado em humanos (CESAROVIC et al., 2010) que vem sendo usado a mais de vinte anos. Sua segurança e eficácia são bem estabelecidas e continuam sendo estudadas mais precisamente para definir seus efeitos em diferentes populações, pacientes e organismos (BRIONI et al., 2017). Diversos estudos veem mostrando que anestésicos inalatórios podem causar danos ao sistema reprodutor masculino, toxicidade reprodutiva e danos na espermatogênese possivelmente causados pelo sevoflurano, e podem estar relacionados à exposição precoce (BADEN et al., 1979; CEYHAN et al., 2005; COATE et al., 1979).

Portanto, o objetivo do estudo será avaliar a influência do sevoflurano na prole dos animais expostos de forma aguda e crônica, e sua possível correlação com alterações epigenéticas das células germinativas e alterações comportamentais ligadas à TEA.

2. METODOLOGIA

O experimento será conduzido no biotério da Universidade Federal de Pelotas, já aprovado pelo comitê de ética sob número 23110.022342/2023-33, onde serão utilizados 15 camundongos swiss albino macho de aproximadamente 5 semanas de vida. Os animais permaneceram 7 dias em aclimação no Biotério da UFPel recebendo ração de acordo com a idade e espécie, água *ad libitum* e ciclo de iluminação 12 horas claro, 12 horas escuro.

Os camundongos serão divididos aleatoriamente em três grupos de cinco indivíduos cada, grupo controle (G0) e grupo crônico (G1) e grupo agudo (G2). Todos os grupos serão acomodados durante 20 dias consecutivos, 5 horas por dia, em uma caixa acrílica de 28 litros (L) com entrada e saída de ar através de um orifício de 2 centímetros, sendo abertura da caixa coberta por filme plástico. O grupo G0 será exposto apenas a oxigênio em uma taxa de 1 L/minuto, enquanto o grupo G1 além do oxigênio será exposto ao sevoflurano na concentração de 25 partes por milhão (ppm), e o grupo G3 será submetido a anestesia geral durante 60 minutos a uma concentração de 2.5% de concentração alveolar mínima (CAM) de sevoflurano.

Após a exposição ao anestésico, os animais serão colocados para reprodução com fêmeas que não foram expostas, por acasalamento poligâmico, um macho para duas fêmeas conforme o CONCEA/2023. Serão utilizados cinco animais dos tratamentos de exposição controle, aguda e crônica, para dez fêmeas cada.

Na prole será feita a avaliação da distância urogenital ao nascimento, relação de machos e fêmeas, com 21, 25, 29 e 33 dias de vida, será avaliado a interação social e avaliações comportamentais através dos testes de sociabilidade de três câmaras, discriminação olfativa, medida de resposta nociceptiva a estímulo térmico nocivo, modelo de avaliação de resposta alodínica mecânica e teste de campo aberto. No 33 dia, será realizada a eutanásia dos animais para coleta de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, análise estresse oxidativo e superóxido dismutase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação entre a exposição do sevoflurano e o autismo tem sido investigada em alguns trabalhos, principalmente em modelos de animais, onde a influência do anestésico em momentos cruciais de desenvolvimento pode estar associada a alterações comportamentais semelhantes às do espectro autista.

No estudo conduzido por Ju et al., (2018), onde ratos Sprague-Dawley com 5 dias de vida foram expostos ao sevoflurano durante 357 minutos a uma concentração de 2.1% CAM e recuperados, posteriormente no seu 90º dia de vida foram colocados para acasalamento com animais não expostos para a avaliação posterior da prole. Em todos os animais foram realizados testes comportamentais e coleta de amostras como cérebro, gametas e sangue.

Foi observado que os animais expostos ao seu 5º dia de vida apresentaram maiores níveis de produção de cortisol em testes de restrição quando comparados com o grupo controle, e os machos demonstraram alterações comportamentais em todos os testes, enquanto as fêmeas não. Os resultados comportamentais na prole foram identificados em somente aqueles animais provindos dos pais, machos, expostos.

Além disso, os pesquisadores analisaram a metilação do DNA em relação à expressão de dois genes, *Kcc2* e *Nkcc2*, que desempenham papéis fundamentais no sistema GABAérgico e na homeostase do cloro nos neurônios. Observou-se um aumento na expressão gênica tanto em machos quanto em fêmeas expostos durante o período neonatal. No entanto, entre os descendentes, apenas os oriundos dos machos expostos apresentaram alterações na metilação do DNA. Esses resultados, segundo os autores, sustentam fortemente a hipótese de que mecanismos epigenéticos estão envolvidos nos efeitos da exposição ao sevoflurano, sendo esses efeitos transmitidos à próxima geração.

Em outro trabalho realizado por Wang, Forestier e Corses (2021), camundongos fêmeas adultas foram expostas ao sevoflurano a uma concentração de 3% CAM durante a gestação, sendo um grupo com exposição de 2 horas por 7 dias e o outro grupo com exposição de apenas um dia. Da progênie das fêmeas expostas (denominado grupo F0), os machos (F1) foram cruzados com fêmeas não expostas, e o mesmo replicado por duas vezes (F2 e F3). Testes comportamentais foram aplicados em todas as progênies na sua fase adulta, e o sêmen foi coletado para avaliação epigenética.

Na avaliação dos testes comportamentais, alguns machos F1 demonstraram alterações sociais e movimentos repetitivos, mesmo aqueles provindos das fêmeas expostas apenas um único dia da gestação. Cerca de 37 a 40% do grupo F1 foi classificado como animais TEA. Na próxima geração, os machos F2, foi possível identificar que os animais que apresentaram características TEA eram filhos dos pais que também apresentaram as características relacionadas ao TEA, sugerindo que a linha germinativa de seus pais foi alterada epigeneticamente pela exposição ao sevoflurano, e essas alteração passadas para a próxima geração. Em contraste, os machos F2 que não demonstraram alteração de comportamento e sociais, provinham de camundongos F1 não relacionados ao TEA.

O grupo F3 seguiu a mesma linha dos anteriores, onde filhos ligados a características TEA, tinham pais com as mesmas dificuldades comportamentais. Portanto, os resultados sugerem que exposição no útero, de embriões de camundongos a doses relevantes de sevoflurano podem levar à transmissão intergeracional e transgeracional de fenótipos semelhantes aos do TEA, sugerindo que a exposição ao sevoflurano altera o conteúdo epigenético da linha germinativa masculina.

4. CONCLUSÕES

Com a utilização ampla de anestésicos inalatórios, como o sevoflurano, em pacientes gestantes e pediátricos, e com o aumento de procedimentos cirúrgicos principalmente em pessoas jovens, a condução de mais estudos abordando o tema se faz necessário para reduzir os possíveis riscos em indivíduos expostos. Neste projeto é esperado que a influência do sevoflurano na exposição aguda e crônica promova uma alteração de comportamentos que são relacionados com o TEA, assim como achados de relevância nas amostras biológicas coletadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADEN, J. M.; KELLEY, M.; MAZZE, R. I.; SIMMON, V. F. Mutagenicity of inhalation anaesthetics: trichloroethylene, divinylether, nitrous oxide and cyclopropane. *British Journal of Anaesthesia*, v. 51, p. 417–421, 1979.

BRIONI, J. D.; VARUGHESE, S.; AHMED, R.; BEIN, B. A clinical review of inhalation anesthesia with sevoflurane: from early research to emerging topics. *Journal of Anesthesia*, v. 31, p. 764–778, 2017.

CESAROVIC, N.; NICHOLLS, F.; RETTICH, A.; KRONEN, P.; HÄSSIG, M.; JIRKOF, P.; ARRAS, M. Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. *Laboratory Animal*, v. 44, p. 329–336, 2010.

CEYHAN, A.; CINCIK, M.; BEDIR, S.; USTUN, H.; DAGLI, G.; KALENDER, H. Effects of exposure to new inhalational anesthetics on spermatogenesis and sperm morphology in rabbits. *Archives of Andrology*, v. 51, p. 305–315, 2005.

COATE, W. B.; KAPP, R. W. Jr.; LEWIS, T. R. Chronic exposure to low concentrations of halothane–nitrous oxide: reproductive and cytogenetic effects in the rat. *Anesthesiology*, v. 50, p. 310–318, 1979.

ESCHER, J.; YAN, W.; RISSMAN, E. F.; WANG, H. V.; HERNANDEZ, A.; CORCES, G. V. Beyond genes: germline disruption in the etiology of autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 52, p. 4608–4624, 2022.

JU, L.-S.; YANG, J.-J.; MOREY, T. E.; GRAVENSTEIN, N.; SEUBERT, C. N.; RESNICK, J. L.; ZHANG, J. Q.; MARTYNYUK, A. E. Role of epigenetic mechanisms in transmitting the effects of neonatal sevoflurane exposure to the next generation of male, but not female, rats. *British Journal of Anaesthesia*, v. 2, p. 406–416, 2018.

LYALL, K.; CROEN, L.; DANIELS, J.; FALLIN, M. D.; LADD-ACOSTA, C.; LEE, B. K.; PARK, B. Y.; SNYDER, N. W.; SCHENDEL, D.; VOLK, H.; WINDHAM, G. C.; NEWSCHAFER, C. The changing epidemiology of autism spectrum disorders. *Annual Review of Public Health*, v. 38, p. 81–102, 2017.

LORD, C.; BRUGHA, T. S.; CHARMAN, T.; CUSACK, J.; DUMAS, G.; FRAZIER, T.; JONES, E. J. H.; JONES, R. M.; PICKLES, A.; STATE, M. W.; TAYLOR, J. L.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Autism spectrum disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 6, p. 5, 2020.

MODABBARNIA, A.; VELTHORST, E.; REICHENBERG, A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, v. 8, p. 13, 2017.

SCHAAF, C. P.; BETANCUR, C.; YUEN, R. K. C.; PARR, J. R.; SKUSE, D. H.; GALLAGHER, L.; BERNIER, R. A.; BUCHANAN, J. A.; BUXBAUM, J. D.; CHEN, C. A.; DIES, K. A.; ELSABBAGH, M. A. Framework for an evidence-based gene list relevant to autism spectrum disorder. *Nature Reviews Genetics*, v. 21, p. 367–376, 2020.

VUTSKITS, L.; XIE, Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 17, p. 705–717, 2016.