



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Kátina Meneghetti de Souza

**Avaliação de *status redox*, resposta inflamatória,
telômeros e expressão gênica em anesthesiologistas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Anestesiologia na área de Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Gobbo Braz

Coorientador: Prof. Associado Leandro Gobbo Braz

**Botucatu
2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Kátina Meneghetti de Souza

Avaliação de *status redox*, resposta inflamatória,
telômeros e expressão gênica em anesthesiologistas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Anestesiologia na área de Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Gobbo Braz

Coorientador: Prof. Associado Leandro Gobbo Braz

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Souza, Kátina Meneghetti de.

Avaliação de status redox, resposta inflamatória, telômeros e expressão gênica em anesthesiologistas / Kátina Meneghetti de Souza. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Mariana Gobbo Braz

Coorientador: Leandro Gobbo Braz

Capes: 40102130

1. Estresse oxidativo. 2. Resposta imune. 3. Expressão gênica. 4. Anestésicos. 5. Exposição ocupacional. 6. Telômero.

Palavras-chave: Anestésicos inalatórios; Estresse oxidativo; Exposição ocupacional; Inflamação; Telômero.

Dedicatória

"Até aqui nos ajudou o Senhor"

1 Samuel 7:12b

Dedico este trabalho a Deus que em todos os momentos esteve ao meu lado.

"O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. Não maltrata, não procura seus interesses, não se ira facilmente, não guarda rancor. O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta"

1 Coríntios 13:4-7

Ao meu amado esposo, Eduardo de Souza Costa, amigo, companheiro, cúmplice, parceiro inseparável, espelho, parte fundamental da minha vida, apoio essencial para concretização deste trabalho.

"Os vivos, somente os vivos, te louvam, como hoje estou fazendo; os pais contam a tua fidelidade a seus filhos"

Isaías 38:19

Aos meus pais, Claudmir Meneghetti (*in memoriam*) e Maria Cristina Meira Meneghetti, que se dedicaram constantemente em me ensinar o caminho do bem, a andar com o Senhor, a amar o próximo como a mim mesma e sempre acreditar que com Deus nossos sonhos podem se tornar realidade.

Agradecimento Especial

**À minha orientadora
Mariana Gobbo Braz**

Não consigo expressar toda gratidão pelos ensinamentos que tive desde nosso primeiro encontro. Sou grata a Deus por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo e me sinto extremamente honrada em ter o seu nome no meu currículo.

“E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito”

Romanos 8:28

Agradecimento Especial

**Ao meu coorientador
Leandro Gobbo Braz**

Sua história de luta pela vida, resiliência, conquistas, humildade e carinho que trata a pessoas, sejam elas quem forem, o fazem inspiração para muitos de nós alunos agraciados com seus ensinamentos.

“Além de ser sábio, o mestre também ensinou conhecimento ao povo. Ele escutou, examinou e colecionou muitos provérbios”

Eclesiastes 12:9

Agradecimento Especial

Ao idealizador do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP)

Professor Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz

Por ter empenhado sua vida e amor à pesquisa, por toda generosidade em ensinar e compartilhar idéias brilhantes. É impossível mensurar quantas pessoas tiveram suas vidas transformadas pelo seu exemplo e dedicação.

“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”

Textos Budistas

Agradecimentos

Aos meus familiares e amigos que aceitaram minha ausência até em datas importantes e ainda assim continuaram me incentivando.

Às minhas queridas e inseparáveis amigas, Simone Aparecida Soares Cavalari e Alexandra Ribeiro Leite, que estão sempre ao meu lado e constantemente intercedendo por minha vida. A conclusão deste trabalho é certamente fruto dessas preciosas orações. “O homem de muitos amigos deve mostrar-se amigável, mas há um amigo mais chegado que irmão”. Provérbios 18:24.

Às minhas amigas intercessoras, especialmente a Susana Assoni Fracalossi, que me abençoaram com suas constantes orações, certamente elas fizeram toda diferença para a conclusão deste trabalho.

À querida Margareth Chan, por tornar meus dias em Boston mais alegres e especiais durante o doutorado sanduíche. Sou grata a Deus por ter passado esse tempo precioso em sua casa e com sua família, são todos maravilhosos.

Aos queridos professores Dr C-Y. Oliver Chen e Jeffrey Blumberg que gentilmente me receberam no “Antioxidants Research Laboratory (ARL), Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center and Aging (HNRCA)” na “Tufts University” (Boston, MA) para realização do doutorado sanduíche.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”

Albert Einstein

Ao bioquímico do “Antioxidants Research Laboratory”, Marc D'Amours por toda assistência no laboratório e paciência no início com meu inglês (risos).

À Prof^a Dr^a Immaculata De Vivo do "Department of Epidemiology, Harvard T.H. Chan School of Public Health" (Boston, MA), por disponibilizar as dependências do laboratório para realização dos experimentos e análises do comprimento dos telômeros (Edital 03/2015 PROPG-UNESP concedido para minha orientadora Mariana Gobbo Braz) e pelo compartilhamento do domínio da técnica.

À Prof^a Dr^a Daisy Maria Fávero Salvadori do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica (Omics) que gentilmente disponibilizou as dependências do laboratório para realização das análises do teste do cometa.

Aos médicos que cortesmente aceitaram participar deste estudo.

A todos que trabalharam para a realização deste trabalho, especialmente a equipe do Laboratório GENOTOX da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), que prefiro chamar de família. Quantas lágrimas, quantos risos, altas madrugadas fazendo experimentos, momentos doces, outros nem tanto, mas não trocaria por nada tudo que vivemos, fui muito agraciada por fazer parte desta equipe.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) por toda contribuição científica e compartilhamento de experiências que enobreceram ainda mais minha passagem por este renomado programa.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Tatiane de Fátima Pineiz Biondo, pela disponibilidade, paciência, amizade, conversas terapêuticas e por estar sempre pronta a nos salvar (risos).

À Joana Jacirene Costa Teixeira e à Neli Aparecida Pavan, funcionárias da secretaria do Departamento e do Serviço de Anestesiologia, respectivamente, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e ao guerreiro André Renato Passaroni, funcionário do serviço de computação do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), não apenas por toda ajuda administrativa, mas também por cada abraço acolhedor e palavras de incentivo, vocês fazem muita diferença nos nossos dias.

À Prof^a Dr^a Lídia Raquel de Carvalho do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), pelas preciosas instruções, receptividade e auxílio na execução das análises estatísticas.

Aos amigos André L. Ventura Sávio e Fábio H. Fernandes, do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica (Omics), pela parceria e ajuda imensurável durante a execução deste trabalho.

À minha amiga Ana Paula C. R. Ferraz por toda ajuda e principalmente pelas tardes dedicadas a me transmitir seus conhecimentos sobre cromatografia líquida (HPLC) e a como fazer as integrações, nessa segunda parte você teve muita paciência (risos).

À Prof^a Dr^a Camila R. Corrêa e Ana Paula C. R. Ferraz, do Laboratório redox/inflamação da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), por todo apoio e disponibilidade em esclarecer inúmeras dúvidas.

À Prof^a Dr^a Marjorie A. Golim, do Hemocentro/Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pelo apoio técnico durante as análises de citometria.

À Tais de Almeida e à Rosemeire Aparecida Vicente, funcionárias da Biblioteca do Campus de Botucatu da UNESP, pela revisão das referências e confecção da ficha catalográfica.

Ao “12th International Conference on Environmental Mutagens” pelo prêmio “Best Presentation Award” ao trabalho “Evaluation of genetic damage, oxidative stress and inflammatory biomarkers in anesthesiologists” apresentado na forma oral pela minha orientadora Mariana Gobbo Braz em novembro/2017 na Coréia do Sul.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudos (Nacional - #2016/23902-8 e Internacional - #2017/18045-1) e concessão de auxílio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho (#2016/155559-1).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo de Iniciação Científica aos alunos participantes do estudo, Mariane Aparecida Pereira Silva (CNPq-PIBIC) e Hector Roder Meira (PIBIC ENSINO MÉDIO/CNPq).

“Mas a sabedoria que vem do alto é, primeiramente, pura, depois, pacífica, moderada, tratável, cheia de misericórdia e de bons frutos, sem parcialidade e sem hipocrisia”.

Tiago 3:17

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Epígrafe	x
Resumo	xiii
<i>Abstract</i>	xv
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Resíduos de gases anestésicos (RGA) e exposição ocupacional	19
1.2 Exposição ocupacional aos RGA e danos no genoma	21
1.3 Exposição ocupacional aos RGA e estresse oxidativo	23
1.4 Óxido nítrico e ciclo da metionina e do folato	25
1.5 Anestésicos inalatórios e resposta inflamatória	27
1.6 Exposição ocupacional e comprimento de telômeros	29
1.7 Anestésicos inalatórios e expressão gênica	29
2 OBJETIVO	32
3 MÉTODO	33
3.1 Ética e registro	33
3.2 Participantes e exposição ocupacional	33
3.3 Coleta de amostra sanguínea	34
3.4 Avaliação do <i>status redox</i>	35
3.4.1 Danos oxidativos no DNA	35
3.4.2 Peroxidação lipídica	36
3.4.3 Metabólitos do óxido nítrico	37
3.4.4 Capacidade antioxidante	38
3.4.5 Antioxidantes lipofílicos	38
3.5 Vitaminas do complexo B e homocisteína	39
3.6 Avaliação de marcadores inflamatórios	40
3.7 Avaliação de telômeros	40

3.8 Avaliação da expressão gênica	41
3.9 Análise estatística	42
4 RESULTADOS	44
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	59
7 REFERÊNCIAS	60
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética	74
ANEXO B - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos	75

Resumo

Souza KM. Avaliação de *status redox*, resposta inflamatória, telômeros e expressão gênica em anesthesiologistas [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2020. 75 f.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo, a resposta inflamatória, a expressão de genes relacionados e o comprimento de telômeros em anesthesiologistas. O estudo transversal foi realizado no Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em 60 médicos, sendo 30 anesthesiologistas expostos ocupacionalmente aos resíduos de gases anestésicos (RGA) isoflurano, sevoflurano e desflurano (média de 10 partes por milhão - ppm) e óxido nitroso (150 ppm) e 30 sem exposição, os quais foram pareados por idade, sexo e estilo de vida. Para avaliação do estresse oxidativo, foram avaliados os danos oxidativos sistêmicos no genoma, a peroxidação lipídica, os metabólitos de óxido nítrico, a defesa antioxidante e antioxidantes lipofílicos individuais, além de vitaminas do complexo B e homocisteína. A resposta inflamatória foi avaliada por interleucinas pró-inflamatórias (IL6, IL8 e IL17A), pela determinação de proteína C reativa de alta sensibilidade e de enzimas hepáticas. O comprimento dos telômeros e a expressão de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA (*hOGG1* e *XRCC1*), à defesa antioxidante (*NRF2*), à manutenção do genoma (*TP53*) e relacionados à inflamação (*IL6*, *IL8* e *IL17A*) foram avaliados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Não houve diferença significativa entre os grupos para os parâmetros avaliados, exceto para a expressão do gene *IL8*, que foi maior no grupo exposto ($p = 0,04$). A exposição ocupacional aos halogenados mais utilizados, juntamente ao óxido nitroso, não está associada com estresse oxidativo, micronutrientes, resposta inflamatória sistêmica e instabilidade genética, mas está associada à modulação molecular da inflamação (superexpressão do gene pró-inflamatório *IL8*) em anesthesiologistas atuantes em hospital universitário, sugerindo que esse transcrito seja marcador de exposição ocupacional aos RGA. É prudente e necessário que haja redução da exposição

ocupacional aos RGA no ambiente de trabalho e que todos os profissionais expostos sejam monitorados.

Palavras-chave: exposição ocupacional, anestésicos inalatórios, estresse oxidativo, inflamação, instabilidade genética, expressão gênica.

Abstract

Souza KM. Evaluation of redox status, inflammatory response, telomeres and gene expression in anesthesiologists [thesis]. Botucatu: Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista; 2020. 75 p.

The current study aimed to evaluate oxidative stress, inflammatory response, the expression of related genes and telomere length in anesthesiologists. This cross-sectional study was conducted at the Botucatu Medical School Hospital, São Paulo State University - UNESP, in 60 physicians, allocated in two groups, as follows: 30 anesthetists occupationally exposed to waste anesthetic gases (WAG) - isoflurane, sevoflurane, desflurane (average of 10 parts per million - ppm), and nitrous oxide (150 ppm), and 30 physicians exposed-free, who were matched by age, sex and lifestyle. Oxidative stress was analyzed by systemic oxidative DNA damage, lipid peroxidation, nitric oxide metabolites, antioxidant defense and individual lipophilic antioxidants, and complex B vitamins and homocysteine. The inflammatory response was evaluated by pro-inflammatory interleukins (IL6, IL8 and IL17A), C-reactive protein, and liver enzymes. Telomere length and the expression of genes related to repair of oxidative DNA damage (*hOGG1* and *XRCC1*), antioxidant defense (NRF2), genome maintenance (*TP53*) and inflammation (*IL6*, *IL8* and *IL17A*) were evaluated by real-time quantitative polymerase chain reaction. There was no significant difference between groups for the evaluated parameters, except for *IL8* gene expression, which was higher in the exposed group ($p = 0.04$). Occupational exposure to commonly used halogenated, along with nitrous oxide, is not associated with oxidative stress, micronutrients, systemic inflammatory response and genetic instability, but is associated with molecular modulation of inflammation (*IL8* proinflammatory gene overexpression) in anesthesiologists working in a university hospital, suggesting that this transcript is a biomarker of occupational exposure to WAG. It is prudent and necessary to reduce WAG occupational exposure in the workplace and to monitor all exposed professionals.

Keywords: occupational exposure, inhalation anesthetics, oxidative stress, inflammation, genetic instability, gene expression.

Lista de Figuras

- Figura 1** Esquema do ciclo da metionina e do folato e possível mecanismo de ação tóxica do óxido nítrico (Adaptado de Amaral et al., 2018).....26
- Figura 2** Expressão relativa de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA (A-*XRCC1* e B-*hOGG1*), defesa antioxidante (C-*NRF2*) e manutenção do genoma (D-*TP53*) em ambos os grupos estudados.....48
- Figura 3** Expressão relativa de genes relacionados à inflamação (A-*IL17A*, B-*IL6* e C-*IL8*) nos grupos avaliados.....49

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características dos participantes.....	44
Tabela 2	Avaliação de estresse oxidativo no DNA, em lipídios e metabólitos do óxido nítrico.....	45
Tabela 3	Avaliação da defesa antioxidante pelo <i>Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)</i> e antioxidantes individuais.....	45
Tabela 4	Avaliação, em ambos os grupos, de vitaminas do complexo B e homocisteína.....	46
Tabela 5	Biomarcadores de inflamação dos participantes analisados.....	47
Tabela 6	Comprimento de telômeros em ambos os grupos.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resíduos de gases anestésicos (RGA) e exposição ocupacional

Estimativas epidemiológicas mostram anualmente que mais de 312,9 milhões de procedimentos cirúrgicos sejam realizados globalmente e a maioria deles é realizada sob anestesia geral (Weiser et al., 2016), que pode ser realizada utilizando anestésicos inalatórios ou intravenosos. Dentre as vantagens do uso de anestésicos inalatórios pode-se citar o baixo custo em comparação com anestésicos intravenosos, baixa metabolização, rápida indução e despertar anestésico (Duarte et al., 2012); entretanto, possuem alta capacidade de volatilização, o que favorece a emissão de resíduos de gases anestésicos (RGA).

A exposição ocupacional aos RGA depende de uma série de fatores, como métodos anestésicos aplicados e organização do ambiente de trabalho (Oliveira, 2009). Os RGA são os principais poluentes das salas cirúrgicas (SC) e de recuperação pós-anestésica (SRPA). Profissionais atuantes em centros cirúrgicos podem ser expostos às concentrações residuais do gás anestésico óxido nitroso (N_2O), especialmente pelo vazamento nas tubulações, bem como pelos anestésicos inalatórios halogenados, particularmente durante indução anestésica em paciente pediátrico (Byhahn et al., 2001). A utilização de baixo/médio fluxo de gases frescos e de aparelhos de anestesia que possuem sistema de exaustão para RGA bem como SC com sistema eficiente de exaustão de gases ainda não é universal, especialmente em países em desenvolvimento, o que contribui com a poluição anestésica no centro cirúrgico.

Diferentemente da exposição ocupacional por radiação ionizante, que conta com regulamentação insalubre de operações perigosas da exposição e biomonitorização dos profissionais (*International Commission on Radiological Protection-ICRP*, 1991; *International Commission on Radiation Units and Measurements-ICRU*, 1993), a exposição ocupacional aos RGA não possui nenhuma legislação ou recomendação de limites de exposição nem como proceder o biomonitoramento dos profissionais no Brasil (Souza et al., 2016) e

provavelmente na maioria dos países em desenvolvimento/subdesenvolvidos. De forma interessante, o estudo de Bilban et al. (2005) mostrou que profissionais expostos ocupacionalmente aos RGA apresentam mais danos no material genético (ácido desoxirribonucleico - DNA) que as radiologistas quando testes de aberrações cromossômicas (AC) estruturais, troca entre cromátides irmãs (TCI) e micronúcleos (MN) em linfócitos foram utilizados.

Agências internacionais como *National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH, 1977)* dos EUA e *European Public Health (EPH apud Hoerauf et al., 1999)* recomendam limites de exposição até 2 e 50 partes por milhão (ppm) para os anestésicos halogenados e até 25 e 100 ppm para N₂O nos EUA e no Reino Unido, respectivamente. Estudos pioneiros do nosso grupo de pesquisa, no Brasil, evidenciam a relevância em se conhecer as concentrações residuais anestésicas e a necessidade do uso consciente desses agentes para manutenção de limiares de RGA o mais baixo possível (Souza et al., 2016; Braz et al., 2017; Braz et al., 2020).

Existem inúmeros riscos ocupacionais relacionados à prática da anestesiologia, especialmente em relação à toxicidade dos anestésicos inalatórios, os quais possuem destaque devido à ampla utilização clínica. Relatos de irritabilidade, fadiga, cefaleia, náusea, tontura, alterações hematopoiéticas, hepáticas e renais, bem como distúrbios de memória já foram descritos em relação à exposição ocupacional aos RGA (Plummer et al., 1987; Sweeney et al., 1985; Helfenstein, 2006; Cordier et al., 2012, Al-Ashour et al., 2014; Casale et al., 2014). Alterações neurocomportamentais (Lucchini et al., 1996) também já foram relatadas em profissionais expostos ocupacionalmente ao N₂O e aos anestésicos inalatórios halogenados halotano e enflurano (os quais já estão em desuso em diversos países).

Adicionalmente, a literatura mostra associação entre a exposição prolongada aos RGA (especialmente em exposições ocupacionais ao N₂O) e alterações no processo reprodutivo, como redução da fertilidade, aumento da incidência de abortos e defeitos congênitos (Ahlborg et al., 1996; Boivin, 1997; Bodin et al., 1999; Borayek et al., 2018). O interesse pelo entendimento de possíveis alterações reprodutivas e especialmente as relacionadas às mulheres expostas

ocupacionalmente aos RGA não se restringe apenas às pesquisas realizadas em hospitais humanos, uma vez que hospitais veterinários também oferecem riscos às profissionais (Scheftel et al., 2017). De fato, a exposição aos RGA em veterinárias que atuam em SC sem sistema de exaustão é importante fator de risco para ocorrência de partos prematuros (Shirangi et al., 2009). Devido à baixa solubilidade sanguínea e tecidual do N_2O , este gás é rapidamente eliminado do organismo, contudo, já foi associado com alterações hematopoiéticas (Sweeney et al., 1985) e inativação da cobalamina (vitamina B12) (Weimann, 2003).

Assim, a exposição ocupacional ao N_2O e aos anestésicos halogenados mais antigos (enflurano, halotano, entre outros) por muitos anos/décadas, em profissionais que atuam em centros cirúrgicos e laboratórios de pesquisa, pode resultar em efeitos deletérios à saúde. Entretanto, existem poucas evidências se os anestésicos mais utilizados atualmente também podem induzir esses efeitos. Os anestésicos halogenados mais modernos e comumente utilizados para manutenção anestésica são isoflurano e desflurano bem como o sevoflurano, o qual também é utilizado para indução anestésica em pacientes pediátricos.

1.2 Exposição ocupacional aos RGA e danos no genoma

Observa-se um crescente interesse em se conhecer os potenciais efeitos tóxicos dos RGA nos profissionais expostos ocupacionalmente, contudo, existe escassez literária e essa temática carece de melhor elucidação. Nosso grupo de pesquisa relatou recentemente aumento de toxicidade em células da mucosa oral, as quais representam a primeira área de contato por onde os agentes inalatórios penetram no organismo (Souza et al., 2016; Braz et al., 2018).

Vários estudos realizados em profissionais atuantes em centro cirúrgico identificaram aumento de lesões no material genético (Sardas et al., 1998; Rozgaj & Kasuba, 2000; Chandrasekhar et al., 2006; Rozgaj et al., 2009).

Baysal et al., em 2009, avaliaram profissionais expostos, em média, a sete anos a mistura de RGA (desde o antigo halotano, aos mais novos halogenados e também ao N_2O) em SC com sistema de exaustão de ar e observaram aumento de

danos no DNA, avaliados pelo teste do cometa. Estudo realizado por El-Ebiary et al. (2013) também observou aumento significativo de danos genéticos em linfócitos de profissionais ocupacionalmente expostos (anestesiologistas, cirurgiões, enfermeiros e técnicos) aos RGA atuantes em SC sem sistema de exaustão de gases, quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, Wiesner et al. (2001) não observaram aumento significativo na frequência de MN avaliados em linfócitos periféricos de profissionais alemães expostos às baixas concentrações de N₂O e dos anestésicos inalatórios isoflurano, sevoflurano e desflurano. Entretanto, esses mesmos autores observaram aumento na frequência de MN em profissionais expostos às concentrações elevadas de N₂O e dos halogenados. Eroglu et al. (2006), em anestesiologistas que trabalharam em SC sem sistema de exaustão de gases, com altas concentrações de N₂O e sevoflurano, verificaram aumento na frequência de TCI em relação aos profissionais não expostos. Observaram também que houve diminuição na frequência desses danos após dois meses de afastamento de trabalho no centro cirúrgico.

Estudo realizado por Wrońska-Nofer et al. (2009), na Polônia, mostrou haver correlação positiva entre danos no genoma e valores de concentração de N₂O acima do limite recomendado no ambiente de trabalho em enfermeiras e anestesiologistas ocupacionalmente expostos em dez hospitais com diferentes sistemas de exaustão. Por outro lado, não houve alterações no genoma desses profissionais expostos a baixas concentrações de resíduos dos anestésicos isoflurano e sevoflurano.

No Brasil, são escassas as pesquisas sobre genotoxicidade e mutagenicidade dos anestésicos avaliadas em profissionais ocupacionalmente expostos, sendo a maioria realizada por nosso grupo de pesquisa. Chinelato & Froes (2002) descreveram aumento na frequência de AC quando avaliaram 11 anestesiologistas expostos ocupacionalmente, de forma predominante ao halotano, por período superior a cinco anos. Araujo et al. (2013) mostraram indução de MN em linfócitos periféricos, mas não de índice proliferativo, em profissionais expostos a mistura de RGA. Médicos residentes de Manaus expostos ocupacionalmente aos RGA isoflurano, sevoflurano e N₂O, em SC sem sistema de exaustão de gases,

tiveram aumento significativo de danos no DNA, avaliados pelo teste do cometa, aos oito, 16 e 22 meses durante a residência, quando comparados aos controles (Costa Paes et al., 2014). Lesões primárias no material genético e instabilidade cromossômica foram relatadas em jovens médicos expostos, no final da residência médica, aos anestésicos inalatórios quando comparados ao grupo controle (Braz et al., 2018; Braz et al., 2020). Adicionalmente, detectamos instabilidade genômica, citotoxicidade e diminuição da proliferação celular, detectadas pelo teste do MN bucal, em anesthesiologistas (Souza et al., 2016).

Assim, os mecanismos pelos quais os anestésicos inalatórios halogenados podem causar danos no DNA ainda não são totalmente conhecidos. Algumas hipóteses seriam a de alquilação na posição N7 das purinas (DNA) ou pela indução de estresse oxidativo (Jaloszynski et al., 1999). Entretanto, há escassez de dados relacionados aos danos oxidativos no DNA em profissionais expostos aos RGA.

1.3 Exposição ocupacional aos RGA e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é decorrente do desequilíbrio entre a formação de radicais livres (RL) ou as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Assim, a produção excessiva de ERO interage com as macromoléculas, podendo induzir danos no DNA, lipídios e aminoácidos/proteínas, causando até a morte celular (Migliore & Coppedè, 2009). O malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos de ácidos graxos polinsaturados e amplamente utilizado para avaliação da oxidação em lipídios. Poucos são os dados sobre exposição ocupacional aos RGA e a avaliação do estresse oxidativo. Exemplificando, Malekirad et al. (2005) observaram em profissionais expostos principalmente ao halotano e N₂O, aumento da peroxidação lipídica plasmática. Também foi verificado aumento de alguns marcadores de estresse oxidativo em enfermeiras expostas a concentrações superiores ao limite recomendado de N₂O na Polônia (Wrońska-Nofer et al., 2012).

O óxido nítrico (NO) é um composto molecular gasoso, incolor e

inorgânico, que possui reatividade elevada e está envolvido no relaxamento vascular, constituindo-se um dos mais importantes mediadores do processo intra e extracelular. Além disso, possui papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais e é um importante ERO e é mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais (Dusse et al., 2003). No entanto, este agente é potencialmente tóxico e essa toxicidade é presente, especificamente, em situações de estresse oxidativo e processo inflamatório (Archer, 1993; Dusse et al., 2003). O NO tem meia vida curta devido à sua rápida oxidação em nitrito e nitrato (produtos de oxidação) (Flora Filho & Zilberstein, 2000). Entretanto, ainda não há relatos na literatura das concentrações das frações de NO em indivíduos expostos ocupacionalmente aos RGA.

A inibição e/ou redução de danos causados pela ação deletéria dos RL e ERO é uma importante função exercida pelo sistema de defesa antioxidante, o qual é dividido em enzimático [superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx)] e não-enzimático (antioxidantes exógenos provenientes da alimentação) (Barbosa et al., 2010).

Türkan et al. (2005), ao avaliarem as enzimas SOD e GPx, verificaram, em 30 profissionais expostos por três anos aos RGA, diminuição do sistema de defesa antioxidante (tanto plasmática quanto eritrocitária) em relação ao grupo controle. Já Izdes et al. (2010) detectaram tanto diminuição da capacidade antioxidante e da enzima antioxidante GPx quanto aumento de danos no DNA, detectados pelo teste do cometa, em enfermeiras anesthesiologistas expostas aos RGA em SC e SRPA sem nenhum sistema de exaustão. Em outro trabalho, verificou-se correlação negativa entre danos no material genético e capacidade antioxidante em profissionais expostos ao antigo halotano, além de sevoflurano, isoflurano, desflurano e N₂O em centro cirúrgico com sistema de exaustão de gases (Baysal et al., 2009). Em estudo nacional, médicos expostos ocupacionalmente aos resíduos de isoflurano, sevoflurano e N₂O em SC sem nenhum sistema de exaustão de gases, durante a residência médica, tiveram alterações de enzimas antioxidantes, com correlação negativa com os danos no material genético (Costa Paes et al.,

2014). A suplementação da dieta com antioxidantes ainda é considerada controversa e precisa ser melhor estudada, entretanto, um estudo realizado por Sardas et al. (2006) mostrou diminuição de danos no DNA em profissionais atuantes em centro cirúrgico quando utilizaram vitaminas C e E, nas concentrações de 500 mg/dia e 300 mg/dia, respectivamente, por período de três meses.

Contudo, a avaliação abrangente de capacidade antioxidante/antioxidantes individuais e de marcadores oxidativos em profissionais expostos ocupacionalmente aos RGA ainda não foi descrita.

1.4 Óxido nitroso e ciclo da metionina e do folato

A metionina sintetase é uma enzima que desempenha papel crucial na geração de S-adenosilmetionina no ciclo do folato (vitamina B9). Uma das hipóteses de mecanismo tóxico do N₂O é a inibição da ação coenzimática dependente de vitamina B12 (Figura 1) na conversão de homocisteína (HCY) em metionina pela metionina sintetase, com consequente possibilidade de inibição do ciclo, causando prejuízo na síntese de ácidos nucleicos e diversas proteínas, além de causar acúmulo de HCY, a qual pode ser tóxica para o organismo (Sanders et al., 2008) por poder levar a maior risco cardiovascular, neuropatia, degeneração da medula espinal e demência (Rao et al., 2010; Nagele et al., 2011; Sharma et al., 2015; Kim et al., 2018). Estudo mostrou que indivíduos expostos ocupacionalmente ao N₂O tiveram menor concentração de vitamina B12 e maior concentração de HCY em relação ao grupo controle (Krajewski et al., 2007).

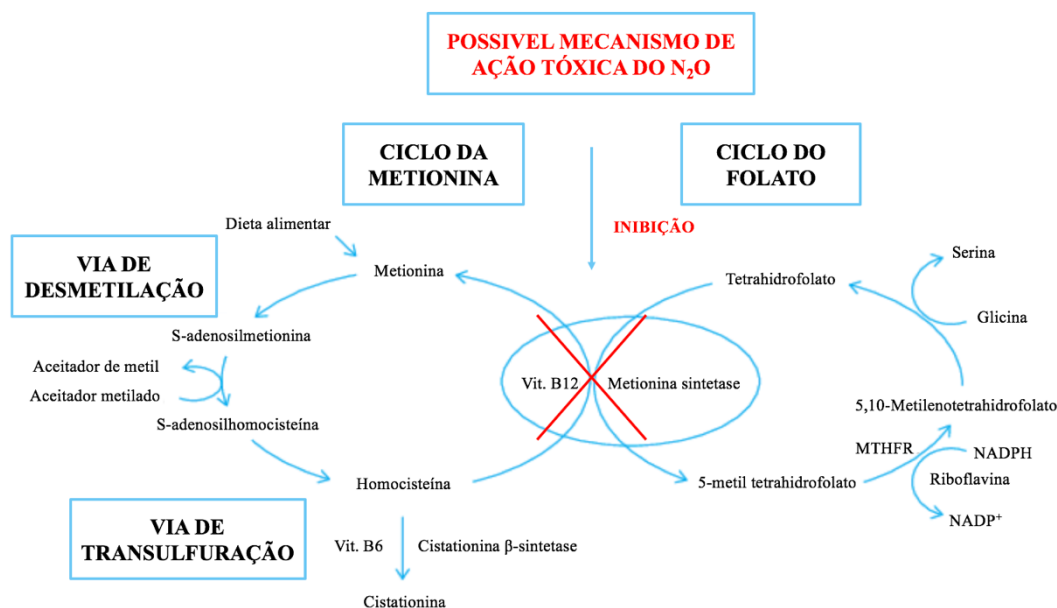


Figura 1 - Esquema do ciclo da metionina e do folato e possível mecanismo de ação tóxica do óxido nitroso (Adaptado de Amaral et al., 2018). N₂O = óxido nitroso. MTHFR = enzima metilenotetrahydrofolato redutase, NADPH = fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida, NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo.

A piridoxina (vitamina B6) está envolvida na biossíntese da maior parte dos neurotransmissores e atua como coenzima no metabolismo de aminoácidos, hidratos de carbono e ácidos orgânicos (Coburn, 2015). Deficiências de vitaminas B6, B9 e B12 foram associadas ao desenvolvimento de doença arterial coronariana, infarto do miocárdio e hiperhomocisteinemia (Iqbal et al., 2005). A vitamina B9 exerce papel fundamental em muitas vias metabólicas, principalmente em reações de transferência de carbono, tais como interconversões (conversão em outro isômero da mesma molécula) na biossíntese de aminoácidos e bases nitrogenadas do DNA, como purinas e pirimidinas (Mirmoghtadaie et al., 2015). Como a hipótese de inibição da vitamina B12 pelo N₂O ainda não foi bem estudada na exposição ocupacional, é relevante que sejam estudadas as concentrações sistêmicas desses micronutrientes e de HCY em profissionais expostos ocupacionalmente a esse gás.

1.5 Anestésicos inalatórios e resposta inflamatória

Existe estreita associação entre o estresse oxidativo e a inflamação. As células inflamatórias são capazes de produzir mediadores solúveis, como as citocinas, as quais também recrutam células para o local de lesão tecidual, liberando ainda mais ERO, intensificando o processo inflamatório (Ferguson, 2010). Dessa forma, as ERO exercem grande influência na iniciação do processo inflamatório.

As citocinas são fundamentais para a manutenção do sistema imune sendo secretadas ou liberadas rapidamente. Essas glicoproteínas estão envolvidas em importantes etapas dos processos inflamatórios agudos e crônicos, nos mecanismos de defesa do organismo e também na gênese de doenças (Sheeran & Hall, 1997). As citocinas são produzidas por diversos tipos celulares em resposta à agressão tecidual. Também estão associadas à liberação de outros mediadores inflamatórios, como ácido araquidônico, enzimas lisossomais e ERO (Hall & Ali, 1998).

A reação inflamatória desencadeia resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda, que se caracteriza pela produção de diversos hormônios, leucocitose e proteínas. As interleucinas IL1 β e IL6 e o fator de necrose tumoral (TNF α) gerados no local de inflamação têm papel fundamental na resposta inflamatória, por induzirem a produção de proteínas hepáticas, como a proteína C reativa (PCR), considerada marcador de lesão tecidual e mediador inflamatório da resposta imune (Garcia et al., 2002). As enzimas alanina transaminase (ALT), aspartato transferase (AST), fosfatase alcalina (ALKP) e gama glutamil transferase (GGT) também são consideradas marcadores inflamatórios e possibilitam a verificação de possíveis distúrbios provenientes de toxicidade. De fato, alterações hepáticas foram descritas em profissionais expostos ocupacionalmente ao halotano, enflurano e isoflurano, além do N₂O (Casale et al., 2014). Entretanto, ainda não se sabe se essas alterações também ocorrem com a exposição aos anestésicos halogenados mais modernos, juntamente ao N₂O.

Tecendo um paralelo em pacientes submetidos a procedimento anestésico-cirúrgico, há relatos que os anestésicos halogenados mais utilizados

estejam associados a alterações inflamatórias sistêmicas. Exemplificando, aumento da interleucina pró-inflamatória IL6 foi relatada no dia posterior ao ato cirúrgico em pacientes sem comorbidade submetidos a cirurgia otorrinológica sob anestesia balanceada com sevoflurano (Orosz et al., 2012). Entretanto, em outro estudo, verificou-se que, sob manutenção anestésica com isoflurano, pacientes submetidos a procedimento cirúrgico minimamente invasivo apresentavam resposta inflamatória mais precoce, ou seja, durante o ato anestésico-cirúrgico, quando comparados aos pacientes sob anestesia venosa com propofol (Mazoti et al., 2013). Em estudo recente, observou-se que pacientes submetidos a cirurgia minimamente invasiva com desflurano apresentaram aumento dos níveis de IL6 e IL8 após a cirurgia (Arruda et al., 2019).

Já em relação à exposição ocupacional aos RGA, dois estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que médicos residentes em exposição ocupacional aos RGA (isoflurano, sevoflurano e N₂O) por três anos apresentaram aumento da IL8, a qual é uma quimiocina relacionada a doenças do trato respiratório, e da IL17A, a qual induz a secreção de IL8 (Chaoul et al., 2015; Braz et al., 2020). Deste modo, pode se observar que mesmo em curtos períodos após a exposição, houve indícios de processos inflamatórios.

Exposições prolongadas a agentes ambientais podem levar a inflamação crônica, que é considerada uma importante fonte de mutação humana (Ferguson, 2010). Assim, o processo inflamatório prolongado está associado ao risco aumentado de doenças crônicas, ao aumento da taxa de mutação e ao acúmulo de ERO, os quais interagem com vários componentes celulares, uma vez que o processo inflamatório e o estresse oxidativo estão associados e ambos os processos podem contribuir para instabilidade genética, ressaltando a importância da avaliação desses marcadores em profissionais expostos aos RGA.

1.6 Exposição ocupacional e comprimento de telômeros

Os telômeros são repetições de sequência hexamérica de nucleotídeos TTAGGG, os quais protegem os cromossomos de fusão por recombinação homóloga ou não-homóloga, desempenhando, portanto, papel crítico na estabilidade cromossômica. Eles estão localizados no final dos cromossomos de células eucarióticas e são importantes para replicação dos cromossomos e viabilidade de proliferação celular, atuando na prevenção da ativação de respostas que agridem o DNA. O comprimento dos telômeros diminui a cada divisão celular, o que conseqüentemente, contribui para a instabilidade do genoma. Outros fatores como estresse oxidativo, resposta inflamatória e produtos químicos também influenciam no comprimento dos telômeros (Zhang et al., 2013).

O encurtamento dos telômeros, a diminuição da atividade da telomerase e o aumento da senescência celular já foram associados com a exposição a poluentes orgânicos (Møller et al., 2018). Algumas exposições ocupacionais, como a inalação de vapores de solda e de pesticidas, também já foram relacionadas à diminuição dos telômeros (Wong et al., 2014a; Kahl et al., 2016). Estudos que avaliaram profissionais expostos ocupacionalmente a metais relataram aumento de danos no DNA, de peroxidação lipídica e diminuição do comprimento de telômeros bem como de associação entre aumento de PCR e encurtamento de telômeros (Wong et al., 2014b; Ko et al., 2017). Como o estresse oxidativo e a inflamação são processos que podem estar relacionados com instabilidade genética (mudança no comprimento dos telômeros), e considerando a escassez de dados em relação à possível influência da exposição ocupacional aos RGA em biomarcadores, torna-se relevante e inédita a avaliação do comprimento de telômeros nos profissionais expostos.

1.7 Anestésicos inalatórios e expressão gênica

O avanço tecnológico na área da biologia molecular permitiu a análise de transcritos de interesse de estudo, favorecendo a detecção de alterações em nível

molecular de forma precoce. Entretanto, o estudo da expressão gênica ainda não foi realizado em profissionais expostos ocupacionalmente aos RGA.

O sistema de reparo por excisão de bases (*BER*) é responsável por reparar vários tipos de danos no material genético, incluindo as lesões oxidativas, as quais incluem proteínas codificadas pelos genes *human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1)* e *DNA repair protein (XRCC1)* (Collins & Gaivão, 2007; Zaha et al., 2014). Fazendo paralelo com trabalho clínico, pacientes cirúrgicos sob anestesia com isoflurano tiveram alterações da expressão de *hOGG1* e *XRCC1* durante ou após exposição à anestesia (Braz et al., 2011).

O fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (*NRF2*) é um gene fundamental para regulação da homeostase celular, atuando em uma grande rede de enzimas antioxidantes, de proteínas desintoxicadoras xenobióticas, do reparo e remoção de proteínas danificadas além da inibição da inflamação e outros fatores de transcrição (Holmström et al., 2016). Já se observou que a exposição ocupacional ao arsênico está associada a alterações dos transcritos de *NRF2* (Janasik et al., 2018).

Um outro gene relevante (*TP53*) é o denominado proteína tumoral p53, que é um supressor tumoral. Este gene é conhecido como “guardião do genoma” e é ativado em resposta a sinais de dano celular e promove a parada do ciclo celular para realização de *check point*, permitindo o reparo do DNA danificado ou alternativamente induzindo apoptose caso os danos não sejam reparados (Fett-Conte & Salles, 2002). Correlação entre exposição ocupacional ao hidrocarboneto aromático estireno e modulação dos níveis transcricionais dos principais genes do ciclo celular, incluindo o *TP53*, já foi observada (Hanova et al., 2011). Entretanto, não se sabe, ainda, se a exposição ocupacional aos RGA pode interferir na expressão de vias gênicas importantes, relacionadas ao reparo de danos oxidativos, resposta antioxidante e manutenção do genoma.

Adicionalmente, a avaliação molecular de *IL6*, *IL8* e *IL17A* (expressão de genes pró-inflamatórios) pode fornecer informações precoces e complementares à análise sistêmica dessas interleucinas e assim, contribuir para melhor elucidação

da possível relação entre exposição ocupacional aos RGA e inflamação em profissionais expostos.

Diante do exposto e da ausência de estudos sobre a elucidação dos possíveis mecanismos de ação tóxica dos anestésicos inalatórios torna-se relevante estudar, de forma inédita e globalmente, a possível interferência desses agentes nos marcadores de instabilidade genética, no *status redox*, na inflamação e na modulação transcricional para se melhor compreender esses eventos na exposição ocupacional aos RGA.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo, a resposta inflamatória, o comprimento de telômeros e a expressão gênica em anesthesiologistas atuantes em hospital universitário expostos aos RGA mais utilizados atualmente.

3 MÉTODO

3.1 Ética e registro

Este estudo transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP (CAAE: 55861716.4.0000.5411; Anexo A) e registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (RBR-6gf6dx; Anexo B).

3.2 Participantes e exposição ocupacional

Foram recrutados 60 médicos atuantes no Hospital das Clínicas da FMB-UNESP (HCFMB) de ambos os sexos, separados em dois grupos (expostos e não expostos). O grupo exposto foi constituído por 30 anesthesiologistas expostos ocupacionalmente aos RGA isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O, por no mínimo dois anos. Os anesthesiologistas atuavam no centro cirúrgico do HCFMB, o qual possuía metade das SC sem qualquer sistema de exaustão de gases e metade com sistema de exaustão (portanto sistema de exaustão parcial) e estavam expostos a concentrações médias residuais, mensuradas por equipamento portátil por espectroscopia infravermelha no ambiente cirúrgico, de 5,5 ppm de isoflurano, 7,7 ppm de sevoflurano, 16,4 ppm de desflurano e de 150,3 ppm de N₂O (Souza et al., 2016). Um terço dos anesthesiologistas que participaram do presente estudo eram docentes e, portanto, não tinham exposição diária à poluição anestésica, por exercerem outras atividades profissionais na universidade. O grupo controle foi constituído por 30 médicos que atuavam em atendimentos clínicos nos ambulatórios, os quais não tinham exposição ocupacional aos anestésicos.

Todos os médicos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam questionário sobre dados demográficos (idade, sexo e índice de massa corporal - IMC), história médica (doenças, exposição à radiação, vacinação, medicação, etc.), estilo de vida (tabaco, álcool, dieta, exercício, etc.) e atividade profissional. Os médicos do grupo controle foram

pareados por idade, sexo, IMC e estilo de vida com os do grupo exposto (Tabela 1). Foram excluídos do estudo os portadores de doença maligna, infecciosa ou inflamatória, as gestantes, os tabagistas, os que faziam uso de “drogas ilícitas”, medicamentos e suplementos vitamínicos, além dos que faziam uso abusivo de álcool (NIAAA, 2015).

3.3 Coleta de amostra sanguínea

Amostras de sangue venoso, protegidas da luz, foram coletadas dos participantes, em jejum de 8 h, em tubos com anticoagulantes ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e heparina sódica, com gel separador e com estabilizador de ácido ribonucleico - RNA (*PAXgene[®] Blood RNA Tube*) de médicos expostos e não expostos. As coletas das amostras foram realizadas simultaneamente dos participantes dos grupos controle e exposto seguindo o pareamento. Todas as amostras foram codificadas e analisadas em teste encoberto. Tanto o processamento das amostras quanto os experimentos foram protegidos da luz e realizados no mesmo período, sob as mesmas condições, para se evitar possíveis vieses.

Após coleta do sangue em tubo contendo EDTA, parte foi utilizada para isolamento de células mononucleares (~ 95% linfócitos), as quais foram mantidas congeladas em *freezer* -80°C até avaliação de danos oxidativos no genoma; parte foi utilizada para extração do DNA para avaliação do comprimento dos telômeros; e parte foi usada para obtenção do plasma (centrifugação a 4°C por 15 min a 1.500 rotações por minuto - rpm), o qual foi armazenado em pequenas alíquotas a -80°C até o momento da avaliação de MDA, vitamina B6 e HCY.

O sangue coletado em tubos *PAXgene[®]* manteve-se *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, foi armazenado a -80°C até etapa da extração de RNA para subsequente avaliação da expressão gênica.

Os tubos contendo heparina sódica foram imediatamente centrifugados para obtenção de plasma, o qual foi separado em alíquotas (tubos de criopreservação armazenados em nitrogênio líquido até a transferência para *freezer*

-80°C). Destaca-se que o processo (início da centrifugação até o congelamento) não ultrapassou 5 min, para preservação das frações de NO.

Os tubos contendo gel separador foram centrifugados a 4°C por 15 min a 1.500 rpm e o soro foi obtido e colocado em pequenos volumes de alíquotas em *freezer* -80°C até o momento da avaliação de marcadores inflamatórios, bioquímicos e antioxidantes lipofílicos, vitaminas B9 e B12 e capacidade antioxidante.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata exceto a avaliação do comprimento do telômero e da expressão gênica, os quais foram realizados em triplicata. Ressalta-se que os marcadores de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante além das dosagens de vitaminas do complexo B e HCY foram analisados na *Tufts University*, enquanto que a análise de telômeros foi realizada na *Harvard T.H. Chan School of Public Health*.

3.4 Avaliação do *status redox*

3.4.1 Danos oxidativos no DNA

O teste do cometa foi realizado, sob luz amarela, de acordo com o protocolo descrito por Collins et al. (1996), com pequenas modificações (Braz et al., 2012). Linfócitos obtidos do sangue periférico de todos os participantes foram utilizados para avaliação dos danos oxidativos no DNA por meio da enzima formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG), para detecção de produtos da oxidação das purinas, como a 8-oxoguanina e a 8-oxo-7,8-diidroguanina-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) (Collins & Gaivão, 2007).

O congelamento e descongelamento dos linfócitos foi realizado conforme descrito anteriormente (Souza, 2016). A suspensão de linfócitos (10 µl) foi adicionada a 120 µl de agarose baixo ponto de fusão (0,5% a 37°C) para o preparo de lâminas previamente cobertas com agarose ponto de fusão normal, as quais foram cobertas por lamínula e houve solidificação da agarose. Após retiradas

das lâminas, as lâminas foram submetidas à solução de lise gelada (EDTA 100 mM, cloreto de sódio 2,5 M, (hidroximetil) aminometano 10 mM; potencial Hidrogeniônico (pH) 10, com 1% de triton e 10% de dimetilsulfóxido) por pelo menos 2 h. Posteriormente as lâminas foram lavadas em solução salina e três vezes em solução *Flare* (1x) (Hepes 40 mM, cloreto de potássio 0,1 M, albumina do soro bovino 0,2 mg/ml e EDTA 0,5 mM; pH 8).

Para determinar a oxidação das bases púricas, o DNA foi digerido com 50 µl de FPG (1:1.000) por meio de incubação (37°C) em câmara úmida. Concomitantemente na mesma incubação foram preparadas lâminas com 50 µl somente do tampão (sem enzima – controle; danos basais). As lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese e foi adicionado tampão alcalino (EDTA 1 mM, hidróxido de sódio - NaOH 300 mM, pH > 13) a 4°C para desespiralização do DNA (40 min). A eletroforese foi conduzida a 25 V, 0,3 A e 7 W por 30 min.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 80 µl de *SYBR Gold*, cobertas com lamínula e 200 nucleoides (50 nucleoides/lâmina/tipo de dano) por indivíduo foram analisados em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instruments*, Reino Unido), em aumento de 400x. Após análise de todas as lâminas, os dados foram tabulados e decodificados para avaliação de danos oxidativos no DNA (*tail moment* e *tail intensity* – como a análise estatística de ambos os parâmetros foram semelhantes, optou-se por apenas apresentar os dados do primeiro parâmetro).

3.4.2 Peroxidação lipídica

O conteúdo plasmático do MDA foi determinado, sob luz vermelha, por cromatografia líquida de alta performance (*HPLC*), que é considerada técnica *gold standard*, de acordo com o protocolo de Volpi & Tarugi (1998) com ligeiras modificações (Gao et al., 2011). Em tubos de microcentrifugação foram adicionados 100 µl de plasma e 20 µl de di-terc-butil metil fenol - BHT 1%. Em seguida foi adicionado volume de 5,5 µl de NaOH 10 N e os tubos foram

homogeneizados em vórtex e incubados a 60°C por 30 min. Foi adicionado volume de 600 µl de ácido tricloroacético, homogeneizado em vórtex, seguido de incubação em gelo por 10 min e centrifugação (1.400 rpm por 10 min). Quatrocentos µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e 200 µl de ácido tiobarbitúrico 0,6% seguido de 10 µl de cloreto de ferro III foram adicionados. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 95°C, sendo em seguida colocados em gelo por 5 min e centrifugados. Cinquenta µl da amostra foram injetadas no equipamento. Para a quantificação de MDA, utilizou-se o sistema de *HPLC Agilent 1100 Series* (EUA) equipado com uma coluna C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm, *Zorbax*, EUA) e detector de fluorescência (*Shimadzu RF-10AXL*, EUA). As curvas padrão foram construídas em concentrações que variaram de 0,094 µM a 60,4 mM de tetrametoxipropano (TMP). As curvas padrão foram lineares com $R^2 \geq 99,99\%$. Os resultados foram analisados utilizando o *ChemStation software (Rev. B.01.03) [204]* (*Agilent Technologies 2001-2005*, EUA).

3.4.3 Metabólitos do óxido nítrico

Nitrito e nitrato foram analisados pela tecnologia de ozônio-quimioluminescência. Para medir os metabólitos utilizou-se agentes redutores, 1% *wt/vol* de iodeto de sódio em ácido acético para conversão do nitrito e cloreto de vanádio III para o nitrato. O plasma (0,5 ml) foi desproteinizado com 1 ml de etanol gelado (submetido à refrigeração prévia por no mínimo 24 h). As amostras foram homogeneizadas e incubadas em gelo por 30 min e em seguida foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Alíquotas de 20 µl foram injetadas no *Sievers Nitric Oxide Analyzer – NOA 280i* (*GE Analytical Instruments*, EUA) e os valores obtidos foram corrigidos pelo fator de diluição da desproteinização (Best et al., 1998; Alves et al., 2002). A quantificação foi obtida de forma comparativa com a curva padrão, a qual foi preparada utilizando dez concentrações diferentes de nitrito e nitrato (0,05 µM a 20 µM), cuja qualidade foi assegurada pela obtenção de R^2 a 99,99%.

3.4.4 Capacidade antioxidante

A avaliação da defesa antioxidante foi realizada pelo método *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)* sob luz vermelha. Assim, a capacidade antioxidante foi avaliada no soro por espectrofotometria seguindo os protocolos descritos anteriormente (Benzie & Strain, 1996; Braz et al., 2020).

Esse método mede a capacidade da amostra em reduzir o ferro ao pH 3,5. O complexo Fe^{3+} -tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) é reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}) e uma intensa cor lilás se forma, sendo a absorbância medida no comprimento de onda de 593 nanômetros (nm). Esta reação de redução favorece mudança na cor pela presença de agentes redutores (antioxidantes). Na reação do ensaio *FRAP*, o Fe^{3+} (forma férrica) está presente em excesso, de modo que sua redução a Fe^{2+} -TPTZ e a consequente mudança de cor refere-se à quantidade de antioxidantes nas amostras. Quanto maior a intensidade da coloração, maior é o poder antioxidante da amostra.

As soluções utilizadas no ensaio foram preparadas diariamente e mantidas em gelo. As alíquotas de soro foram diluídas em água (1:4) e adicionadas em cuvetas específicas, bem como o padrão *Trolox* (análogo hidrofílico de tocoferol), amostras de controle de qualidade e branco. Subsequentemente, a solução *cocktail* foi adicionada rapidamente a cada cuveta, sendo em seguida, incubadas em temperatura ambiente por 60 min. A absorbância foi mensurada a 593 nm em espectrofotômetro (*Shimadzu UV-1800*, Japão). Os resultados do *Trolox* foram utilizados para a construção da curva padrão (Chen & Blumberg, 2008). O valor de $R^2 \geq 99,99\%$ foi obtido para todas as curvas padrão.

3.4.5 Antioxidantes lipofílicos

Utilizando-se cromatografia líquida (*HPLC*), os antioxidantes lipossolúveis carotenoides e retinol foram avaliados sob luz vermelha, conforme protocolo descrito por Braz et al. (2015), com algumas modificações. Após o descongelamento gradual, 100 μl das amostras de soro de todos os participantes

foram extraídas em 2 ml de solventes lipofílicos (clorofórmio/metanol - 2:1) e foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min. Em seguida, foram adicionados 3 ml de hexano e as amostras foram submetidas à nova centrifugação. Adicionou-se 100 µl de equinenona como padrão interno e o sobrenadante foi filtrado em membrana de *nylon* 2 µm e submetido à secagem em nitrogênio gasoso. Após secagem, as amostras foram ressuspensas em 100 µl de etanol grau *HPLC* e em seguida foram injetadas no cromatógrafo *Waters Alliance 2695 separations module* (*Waters*, EUA) e os componentes foram separados utilizando-se coluna C30 (3 µm, 150 × 3,0 mm, *YMC*, EUA).

As fases móveis foram compostas por solução A contendo acetato de amônia em água *Milli-Q*[®]:metanol:éter metil terc-butílico - MBTE (3:85:12) e solução B contendo acetato de amônia em água *Milli-Q*[®]:metanol:MBTE (2:8:90) em eluição em gradiente no fluxo de 1 ml/min em 32 min de corrida e foram identificadas por detector de fotodiodo (*Waters PDA 2998 detector*, EUA) ajustado a 450 nm para avaliação de carotenoides (luteína, criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e licopeno) e 325 nm para retinol. Os resultados foram ajustados com o padrão interno (controle), que foi injetado diariamente durante a execução dos experimentos. Os dados foram analisados em *software* acoplado ao equipamento para obtenção das dosagens individuais. Cada composto foi identificado e quantificado de acordo com a área dos picos apresentados nos cromatogramas.

3.5 Vitaminas do complexo B e homocisteína

A vitamina B6 e a HCY foram analisadas em amostras plasmáticas por *HPLC* (*Waters WISP 717 plus, Pump 510*, EUA) com detector de fluorescência (*Perkin Elmer 650-15 Fluorescence Spectrophotometer*, EUA) de acordo com protocolos previamente descritos (Camp et al., 1983, Araki & Sako, 1987).

As vitaminas B9 e B12 foram detectadas no soro por quimiluminescência (*Siemens*, EUA) utilizando os *kits IMMULITE* (L2KFO2) e *IMMULITE 2000* (L2KVB2), respectivamente (*Siemens Healthcare Diagnostics*, EUA).

3.6 Avaliação de marcadores inflamatórios

As interleucinas pró-inflamatórias IL6, IL8 e IL17A foram avaliadas por ensaio *Cytometric Bead Array (CBA) Enhanced Sensitivity Flex Sets (Becton Dickinson-BD, EUA)* em citômetro de fluxo *FACSCalibur™ (BD, EUA)*, conforme instruções do fabricante. Em resumo, as *beads* são microesferas marcadas com fluorocromos específicos que possuem afinidade pelo componente a ser estudado, como as citocinas, com a vantagem de possibilitar a avaliação de diferentes marcadores ao mesmo tempo utilizando uma quantidade reduzida de amostra (25 µl). As *beads* foram adicionadas às amostras sorológicas juntamente com o detector de anticorpos específicos para cada interleucina. Após período de incubação, as amostras contendo as interleucinas se aglutinaram com as *beads* e com o detector de anticorpos, formando um complexo similar a um “sanduíche”, que após serem lavadas (solução de lavagem do *kit*) foram submetidas à análise por citometria de fluxo com o *software BD CellQuest Pro*. O resultado foi calculado em comparação com uma curva de calibração que foi preparada com diferentes concentrações de forma seriada, com $R^2 \geq 99,99\%$. Os limites de detecção das citocinas IL17A, IL6 e IL8 foram 0,026, 0,069 e 0,070 pg/ml, respectivamente.

A determinação de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as) foi detectada no soro por ensaio imunométrico quimioluminescente (*High Sensitivity CRP, IMMULITE 2000, EUA*), conforme instruções do fabricante. As enzimas hepáticas ALT, AST, ALKP e GGT foram analisadas em amostras séricas por química seca utilizando-se o sistema automatizado *Vitros 950 (Johnson & Johnson, EUA)*.

3.7 Avaliação de telômeros

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o *kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare Life Sciences, EUA)*, de acordo com as instruções do fabricante. A pureza das amostras foi determinada em espectrofotômetro *Nano Drop One (Thermo Fisher Scientific,*

EUA) enquanto a quantificação do DNA genômico foi realizada por *Pico-Green* em espectrofotômetro de 96 poços da *Molecular Devices (Sunnyvale, EUA)*. As amostras de DNA foram armazenadas em *freezer -80°C* até a análise dos telômeros.

O comprimento relativo dos telômeros foi determinado como descrito anteriormente (Cawthon, 2002; Crous-Bou et al., 2014) por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*qPCR*), que foi realizada no equipamento *Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System (Foster City, EUA)*. A média relativa dos telômeros foi calculada em relação ao número de cópias (T:S) repetidas por número de cópias de um único gene (*36B4*). O comprimento dos telômeros foi expresso como a razão exponencial do número de cópias repetidas dos telômeros para um número de cópia de gene único corrigido por amostra de referência. A média do coeficiente de variação das amostras controle de qualidade (T:S exponencial) foi de 11,6%, sendo o máximo permitido até 20%. A análise foi feita por meio do método *cycle threshold (Ct)* comparativo, utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo do valor relativo do comprimento dos telômeros (Livak & Schmittgen, 2001).

3.8 Avaliação da expressão gênica

Os tubos com estabilizador de RNA foram descongelados em temperatura ambiente por 2 h, sendo em seguida utilizados para extração de RNA utilizando o *PAXgene® Blood RNA kit (Qiagen/PreAnalytiX, Suíça)*, conforme instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro *Nano Drop One (Thermo Fisher Scientific, EUA)*. A absorbância foi demonstrada pela razão A260/280 que variou de 1,9 a 2,0. Após a quantificação, as amostras de RNA foram armazenadas em *freezer -80°C* até a etapa de transcrição reversa (*cDNA*) que foi realizada pelo *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, EUA)*, com as seguintes etapas de ciclagem: 25°C durante 10 min sendo depois incubadas por 120 min a 37°C e depois mantidas em 4°C. As amostras de *cDNA* foram armazenadas a -80°C até a detecção dos

transcritos.

A *qPCR* foi realizada em termociclador automático (*Applied Biosystems Prism 7500 Fast*, EUA) utilizando sondas e *primers Taqman™ FAM-MGB* (*ThermoFisher Scientific*, USA) para os genes envolvidos em: reparo de lesões oxidativas no DNA (*hOGG1* - Hs00213454_m1 e *XRCC1* - Hs00959834_m1); defesa antioxidante (*NRF2* - Hs00975960_m1) e manutenção do genoma (*TP53* - Hs01034249_m1). Além disso, a avaliação da expressão dos genes pró-inflamatórios *IL6* (Hs00985639_m1), *IL8* (Hs00174103_m1) e *IL17A* (Hs00174383_m1) foi determinada para fornecer informações moleculares complementares à análise dessas citocinas. O controle endógeno selecionado (*housekeeping*) foi o gene β-actina - *ACTB* (Hs99999903_m1). Um *pool* de amostras de *cDNA* de voluntários saudáveis foi preparado como controle e foi adicionado em cada placa de 96 poços, bem como um controle negativo, de acordo com protocolo anterior (Braz et al., 2011).

Para preparação das placas utilizou-se *TaqMan™ Fast Universal PCR Master mix* (*ThermoFisher Scientific*, EUA) e as reações foram realizadas em um volume final de 10 µl, com as seguintes condições de termociclagem para todos os genes: 94°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C durante 15 s e 60 durante 60 s. A fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi aplicada para a quantificação relativa da expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001).

3.9 Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral foi determinado baseando-se em estudo piloto para o MDA, estimando-se uma diferença média (*X*) esperada entre o grupo controle e o exposto em torno de 0,26 (desvio padrão - DP ± 0,36), utilizando-se o poder do teste de 80%, ficando estabelecido 30 participantes por grupo. Para as comparações entre os grupos das características dos participantes, *status redox*, vitaminas B9 e B12, HCY, biomarcadores de inflamação, telômeros e expressão de alguns genes aplicou-se o teste t de Student com os resultados apresentados como

$X \pm DP$ ou $X \pm$ erro padrão (EP). O teste de Mann-Whitney foi aplicado para as mesmas comparações para análise da vitamina B6 e criptoxantina (dados apresentados em mediana [25%;75%]) e expressão dos genes *NRF2*, *IL6* e *IL17A* (resultados apresentados em *boxplot*).

A distribuição do sexo (valores numéricos) foi analisada pelo teste do qui-quadrado. As correlações entre todos os biomarcadores foram analisadas utilizando-se os testes de Pearson ou Spearman. Adicionalmente, influência das variáveis idade, sexo, tempo de exposição e profissionais docentes *versus* não docentes também foi analisada para todos os parâmetros. As análises foram feitas no programa *SAS for Windows*, v. 9.3, EUA. Considerou-se nível de significância (p) de 5%.

4 RESULTADOS

Observa-se homogeneidade dos grupos estudados, já que os participantes foram pareados (Tabela 1). Dos 30 participantes do grupo exposto, 60% foi exposto há dez anos ou mais aos RGA enquanto 40% teve exposição de dois até cinco anos. Os profissionais estavam, em média, atuantes há 16 anos no centro cirúrgico e com média de 35 horas semanais (40% com atuação menor e 60% com atuação maior que essa média de carga horária).

Tabela 1 - Características dos participantes

Características	Grupo controle (n = 30)	Grupo exposto (n = 30)	Valor de p
Idade (anos)	43 ± 16	42 ± 16	0,9
Sexo (Masculino/Feminino)	20 / 10	20 / 10	1,0
Índice de massa corpórea (kg/m²)	26 ± 5	26 ± 3	0,8
Atividade física	22	22	1,0

Dados apresentados como X ± DP ou como valores numéricos.

A Tabela 2 mostra os resultados da avaliação de danos basais e oxidativos no DNA, de peroxidação lipídica (MDA) e dos metabólitos do NO. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os parâmetros avaliados.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do *status* antioxidante, avaliados pela capacidade antioxidante e por antioxidantes individuais em ambos os grupos. De forma semelhante ao comportamento dos marcadores oxidantes, não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos marcadores de defesa antioxidante.

Tabela 2 - Avaliação de estresse oxidativo no DNA, em lipídios e metabólitos do óxido nítrico

Parâmetros	Grupo controle	Grupo exposto	Valor de p
Danos basais no DNA (u.a.)	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,5	0,32
Danos oxidativos no DNA (u.a.)	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,79
Malondialdeído (µM)	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,4	0,86
Nitrito (µM)	2,8 ± 1,0	3,1 ± 1,2	0,38
Nitrato (µM)	4,3 ± 1,4	4,5 ± 1,5	0,61

Dados apresentados como X ± DP. u.a. = unidade arbitrária.

Tabela 3 - Avaliação da defesa antioxidante pelo *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)* e antioxidantes individuais

Parâmetros	Grupo controle	Grupo exposto	Valor de p
FRAP (µM)	376 ± 94	370 ± 86	0,77
Luteína (µM)	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,36
Criptoxantina (µM)	0,4 [0,3;0,9]	0,4 [0,3;0,7]	0,91
α-caroteno (µM)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,54
β-caroteno (µM)	1,7 ± 2,7	1,2 ± 1,7	0,43
Licopeno (µM)	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,44
Retinol (µM)	1,8 ± 0,6	1,9 ± 0,7	0,51

Dados apresentados como X ± DP ou mediana [25%;75%].

As concentrações das vitamínicas do complexo B e de HCY são apresentadas na Tabela 4. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os parâmetros avaliados. Todos os valores médios dos dois grupos foram encontrados dentro da faixa normal, com exceção da vitamina B6, cujo valor mediano do grupo exposto ficou ligeiramente acima da faixa. Dentre os participantes do estudo apenas um indivíduo do grupo exposto era vegetariano e um do grupo controle informou não fazer ingestão de carne bovina, no entanto essas

condições não se destacaram nos respectivos grupos para nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 4 - Avaliação, em ambos os grupos, de vitaminas do complexo B e homocisteína

Parâmetros	Grupo controle	Grupo exposto	Valor de p	Valores de referência
Vitamina B12 (pg/ml)	447,1 ± 183,0	473,7 ± 227,9	0,63	193 - 982
Vitamina B6 (nM)	62,5 [48;104]	73,6 [58;85]	0,61	14,7 - 72,8
Vitamina B9 (ng/ml)	10,1 ± 3,9	11,3 ± 5,9	0,38	3 - 17
Homocisteína (µM)	8,1 ± 2,7	7,4 ± 1,8	0,26	6 - 15

Dados apresentados como X ± DP ou mediana [25%;75%].

Na Tabela 5 são apresentados os diversos marcadores inflamatórios sistêmicos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as concentrações de proteína PCR-as e nem para as enzimas hepáticas. Destaca-se, porém, que apesar de não significativo ($p = 0,1$), o grupo exposto apresentou aumento de 1,57 vezes em relação ao grupo não exposto de concentração sérica de IL8. Mesmo com a utilização de método de alta sensibilidade, os valores de IL6 e IL17. A ficaram abaixo do limite de detecção, por isso não foram mostrados. Os resultados obtidos pela média da avaliação da PCR-as e de todas as enzimas hepáticas estavam dentro dos valores considerados normais.

A análise do comprimento relativo dos telômeros mostrou ausência de diferença significativa entre os grupos avaliados (Tabela 6).

Tabela 5 - Biomarcadores de inflamação dos participantes analisados

Parâmetros	Grupo controle	Grupo exposto	Valor de p	Limites de detecção* ou valores de referência
IL8 (pg/ml)	3,5 ± 2,9	5,5 ± 5,8	0,10	0,07*
PCR-as (mg/l)	2,7 ± 3,5	2,4 ± 3,5	0,73	< 3
ALKP (U/l)	59,7 ± 11,9	63,1 ± 21,5	0,45	38 - 126
GGT (U/l)	23,5 ± 11,3	25,2 ± 22,3	0,72	12 - 43 F / 15 - 73 M
AST (U/l)	26,2 ± 7,9	25,6 ± 7,7	0,78	14 - 36 F / 17 - 59 M
ALT (U/l)	17,4 ± 10,0	19,9 ± 11,1	0,35	9 - 52 F / 21 - 72 M

Dados apresentados como X ± DP. IL8 = interleucina pró-inflamatória 8, PCR-as = proteína C reativa de alta sensibilidade, ALKP = fosfatase alcalina, GGT = gama glutamil transferase, AST = aspartato transaminase, ALT = alanina transaminase, F = sexo feminino, M = sexo masculino.

Tabela 6 - Comprimento de telômeros em ambos os grupos

Parâmetro	Grupo controle	Grupo exposto	Valor de p
Comprimento relativo de telômeros (T/S)	0,69 ± 0,15	0,77 ± 0,21	0,12

Dados apresentados como X ± DP. T/S = razão do comprimento de telômero (T) com o comprimento de um gene de cópia única (S).

A expressão dos genes *XRCC1* (Figura 2A), *hOGG1* (Figura 2B), *NRF2* (Figura 2C) e *TP53* (Figura 2D) foi similar nos dois grupos ($p > 0,05$).

A expressão do gene *IL17A* foi similar em ambos os grupos ($p = 0,6$) assim como o gene *IL6*, o qual mostrou leve aumento na expressão ($p = 0,06$) no grupo exposto em comparação com o grupo não exposto (Figuras 3A e 3B). Já em relação ao gene *IL8*, pode-se observar uma expressão aumentada de 1,62 vezes ($p = 0,04$) no grupo exposto quando comparado ao grupo controle (Figura 3C). Esse resultado está de acordo com o observado sistemicamente.

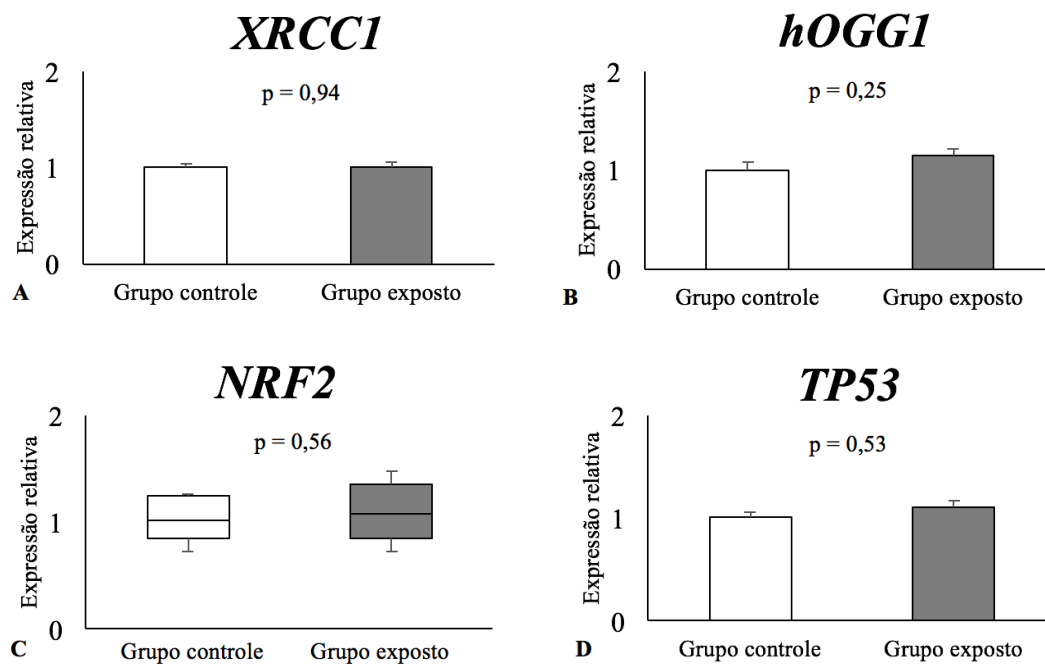


Figura 2 - Expressão relativa de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA (**A**-*XRCC1* e **B**-*hOGG1*), defesa antioxidante (**C**-*NRF2*) e manutenção do genoma (**D**-*TP53*) em ambos os grupos estudados. Dados expressos em $X \pm EP$ ou *boxplot*.

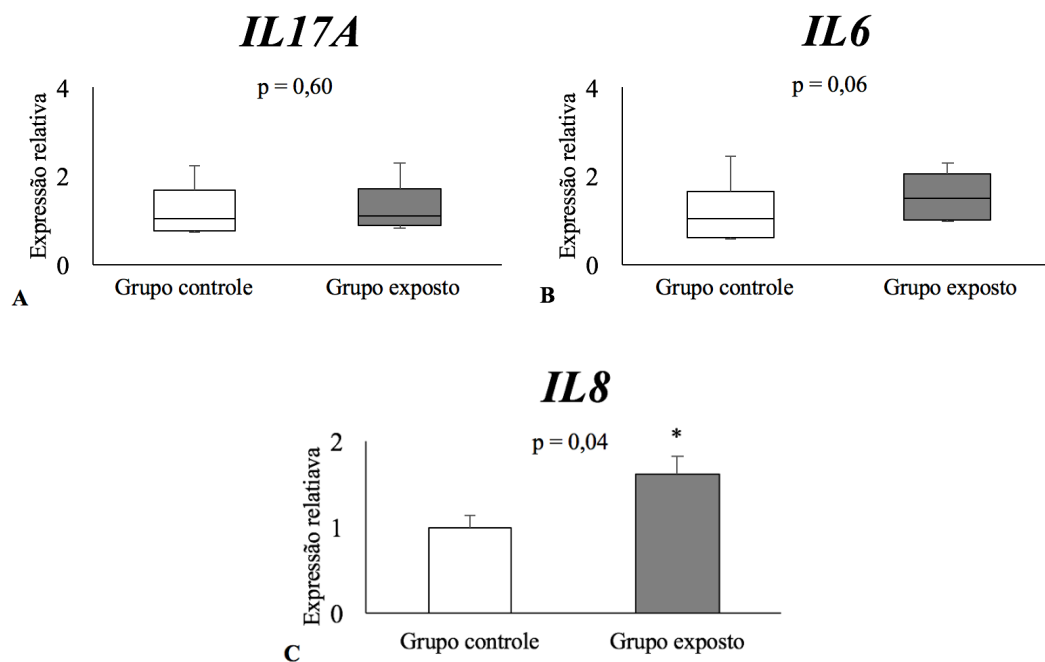


Figura 3 - Expressão relativa de genes relacionados à inflamação (**A-IL17A**, **B-IL6** e **C-IL8**) nos grupos avaliados. Dados expressos em $X \pm EP$ ou *boxplot*. * $p < 0,05$.

Adicionalmente, não foi observada nenhuma influência significativa das variáveis idade, sexo, tempo de exposição e profissionais docentes *versus* não docentes para todos os parâmetros avaliados nem correlação entre os parâmetros ($p > 0,05$; dados não apresentados).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo não mostrou influência da exposição ocupacional aos RGA na oxidação do DNA, na peroxidação lipídica, nas frações de NO, na defesa antioxidante (antioxidantes lipofílicos e capacidade antioxidante), nas vitaminas do complexo B e na HCY, em marcadores inflamatórios hepáticos, na expressão de genes de reparo de DNA, de defesa antioxidante, de manutenção do genoma, bem como de alguns genes relacionados à inflamação nem alterações no comprimento dos telômeros em anesthesiologistas atuantes em hospital universitário. No entanto, esses profissionais apresentaram aumento da expressão do gene *IL8*, o que sugere que essa exposição ocupacional estimule a resposta inflamatória. Assim, sugere-se que esse gene possa ser candidato a biomarcador precoce de inflamação na exposição ocupacional aos RGA.

Considerando os limites de exposição aos RGA recomendados por agências internacionais, observa-se que nos EUA os valores são mais restritos do que no Reino Unido. As concentrações ambientais dos RGA as quais os anesthesiologistas avaliados no presente estudo estavam expostos foram superiores aos valores recomendados pela *NIOSH* tanto para os anestésicos halogenados quanto para o N_2O , entretanto não excederam os valores recomendados pela *EPH*, exceto o N_2O , o qual estava um pouco acima do valor recomendado.

A avaliação de danos oxidativos no DNA é crítica, pois esse tipo de dano tem sido descrito como uma possível causa de mutações que podem levar ao desenvolvimento de câncer (Collins et al., 1993). Há somente um único estudo na literatura ao nosso alcance que avaliou a associação da exposição ocupacional aos RGA e danos oxidativos no DNA de enfermeiras polonesas expostas ao isoflurano, sevoflurano e N_2O (Wrońska-Nofer et al., 2012). Estes autores verificaram correlação entre aumento de danos oxidativos e N_2O , cujas concentrações residuais foram avaliadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e estavam em demasia acima dos limites recomendados na Polônia (até 8,4 vezes superior), nas profissionais expostas. Diferentemente do estudo citado, na presente pesquisa não foi associada indução de danos em purinas oxidadas nem danos basais

no DNA em anesthesiologistas expostos ao N₂O e aos halogenados mais modernos. Em outro estudo polonês, no qual 100 profissionais expostos aos RGA foram avaliados, não se observou indução de lesões basais no DNA quando comparados com o grupo controle (Szyfter et al., 2016).

De forma semelhante ao dano oxidativo no DNA, não se observou indução de dano oxidativo em lipídios (MDA). Aumento de peroxidação lipídica e diminuição da capacidade antioxidante foi relatada em enfermeiras expostas a altas concentrações de N₂O (Wrońska-Nofer et al., 2012). Um outro estudo realizado em profissionais de ambos os sexos expostos principalmente ao halotano e N₂O em SC sem sistema de exaustão de gases também mostrou aumento da peroxidação lipídica, entretanto, os níveis da capacidade antioxidante não diferiram entre os grupos (Malekirad et al., 2005).

A literatura é escassa em relação à avaliação do estresse oxidativo em indivíduos ocupacionalmente expostos aos RGA e a avaliação das frações de NO ainda não foi descrita. De forma coerente com a ausência de oxidação no genoma e nos lipídios também não foi observada influência da exposição ocupacional aos RGA na oxidação de NO pela avaliação dos metabólitos nitrito e nitrato.

O sistema de defesa antioxidante atua de forma eficaz para impedir acúmulo de moléculas danificas por RL e/ou ERO que são constantemente produzidos *in vivo* (Halliwell & Chirico, 1993). Para avaliação da capacidade antioxidante, também é possível avaliar o efeito cumulativo de antioxidantes presentes sistemicamente (Ghiselli et al., 2000). A redução da capacidade antioxidante foi observada em profissionais turcos e poloneses expostos ocupacionalmente aos RGA (Türkan et al., 2005; Wrońska-Nofer et al., 2012). Utilizando-se de metodologia para avaliação da capacidade antioxidante global pelo *FRAP*, não foram observadas diferenças entre grupo controle e exposto aos RGA em nosso estudo, semelhantemente aos achados de um estudo realizado no Irã com a mesma metodologia, entretanto, com exposição aos RGA halotano e N₂O (Malekirad et al., 2005). Um estudo que avaliou médicos residentes expostos ocupacionalmente aos RGA em SC sem sistema de ventilação/exaustão mostrou

correlação negativa entre níveis de enzimas antioxidantes e danos basais no DNA (Costa Paes et al., 2014).

Destaca-se que os estudos na literatura diferem quanto aos profissionais e hospitais avaliados (universitários ou não), tempo de exposição e carga de trabalho, exposição aos anestésicos modernos ou mais antigos, frequência de anestésias intravenosas ou inalatórias, SC com ou sem sistemas de exaustão, se a poluição anestésica foi avaliada, as diferentes metodologias aplicadas, entre outros, o que pode justificar os dados divergentes.

Os antioxidantes endógenos não enzimáticos lipossolúveis juntamente com outros antioxidantes participam da primeira linha de defesa contra danos oxidativos e são possíveis de serem avaliados individualmente (Vasconcelos et al., 2007). Embora não existam valores de referência para esses antioxidantes não enzimáticos (pois vários são dependentes da dieta e da população estudada), e embora nenhum estudo tenha avaliado os efeitos da exposição ocupacional aos RGA nesses compostos, as concentrações da maioria dos micronutrientes encontradas no presente estudo foram similares às encontradas em estudos prévios que avaliaram indivíduos saudáveis (Correa et al., 2014; Braz et al., 2015), exceto para criptoxantina e especialmente β -caroteno, os quais estavam em concentrações superiores às descritas anteriormente. Vale salientar que a maioria dos médicos de ambos os grupos relatou ter boa alimentação e ausência de comorbidades. Wrońska-Nofer et al. (2012) não observaram diferenças significativas nos níveis do antioxidante α -tocoferol entre enfermeiras expostas e não expostas ocupacionalmente aos RGA. Portanto, na avaliação individual e global de antioxidantes, nossos achados se corroboraram e estão de acordo com os marcadores oxidativos.

Assim, sugere-se que o sistema de defesa antioxidante permaneça eficaz em anesthesiologistas, apesar da exposição ocupacional. É possível que alterações nos marcadores de estresse oxidativo possam ter ocorrido mais precocemente, ou seja, durante a exposição ocupacional inicial dos profissionais avaliados no presente estudo, mas não sejam mais evidentes após exposição mais prolongada. De fato, nosso grupo de pesquisa mostrou aumento de marcadores

oxidativos em jovens médicos expostos aos RGA durante o primeiro ano de residência médica (Aun, 2017); no entanto, nenhuma indução de estresse oxidativo foi encontrada nesses profissionais no final do programa de residência médica (Braz et al., 2020), o que é consistente com nossa hipótese. Assim, os anestesiológicos podem ter se adaptado à exposição residual anestésica e pode-se sugerir que a exposição ocupacional média de mais de uma década aos anestésicos halogenados modernos, juntamente com o N₂O, não está associada ao estresse oxidativo.

Ressalte-se que o N₂O não é metabolizado, sendo eliminado rapidamente pelos pulmões. Já os anestésicos halogenados mais modernos têm baixa taxa de metabolização (0,02% a 5%), a qual ocorre pela citocromo P540 (enzima CYP2E1) (Kharasch & Thummel, 1993; Souza & Tardelli, 2011). Portanto, diferentemente dos anestésicos mais antigos, esses halogenados mais modernos geram poucos metabólitos reativos, o que pode ter contribuído com nossos achados.

Embora seja sugerido na literatura que os mecanismos tóxicos dos anestésicos halogenados possam incluir o estresse oxidativo, e que o N₂O pode interferir no ciclo da vitamina B9/B12, nenhum dos parâmetros avaliados diferiu entre os grupos estudados (expostos *versus* não expostos). Portanto, nosso estudo não confirmou a hipótese sugerida por Krajewski et al. (2007), os quais avaliaram enfermeiras atuantes em hospitais diferentes, expostas residualmente aos halogenados (halotano, isoflurano e sevoflurano) e N₂O. Os autores encontraram diminuição significativa da vitamina B12 e aumento significativo de HCY sem alterações significativas na vitamina B9 nas profissionais expostas, quando comparadas com o grupo controle. Além disso, esses autores observaram que as mudanças no *status* da vitamina B12 foram agravadas em enfermeiras expostas ao N₂O em concentrações substancialmente superiores (260 ppm) ao limite de exposição ocupacional. É importante ressaltar as diferenças entre nosso estudo e o estudo supracitado, cujo tamanho da amostra foi maior que o nosso. Além disso, as enfermeiras trabalhavam no meio ambiente poluído durante toda atividade profissional e foram expostas por pelo menos cinco anos, diferente do nosso estudo, que incluiu anestesiológicos de ambos os sexos, atuantes em SC/SRPA de um

hospital universitário, sendo que um terço desses profissionais era composto de docentes e que, portanto, não estavam diariamente expostos à poluição anestésica.

De forma similar aos nossos achados, Uzun et al. (2014) não encontraram alterações significativas nos níveis de vitaminas B12 e B9 nem de HCY quando avaliaram profissionais do sexo feminino das áreas de anestesiologia e cirurgia expostas aos mesmos anestésicos que os nossos profissionais por pelo menos três anos. Além disso, Staubli et al. (2016) compararam dois grupos de indivíduos que trabalhavam no mesmo hospital terciário, o primeiro composto por profissionais expostos ao N₂O por mais de um ano e o segundo por profissionais não expostos ao N₂O. Os autores também não observaram diferenças significativas entre os grupos quanto à vitamina B12 e HCY, e observaram que todas as médias dos parâmetros investigados estavam dentro do intervalo de referência. Assim, esses dois estudos relatados respaldam nossos achados.

Sabe-se que a influência genética pode interferir no metabolismo de várias vias, incluindo o ciclo da vitamina B6. Assim, dois polimorfismos mostraram-se relevantes em reduzir a atividade da enzima MTHFR e assim levar ao acúmulo de HCY, como o C677>T e o A1298>C no gene *MTHFR* (Baluz et al., 2002). De fato, levando em consideração a suscetibilidade genética e a exposição ao N₂O, Nagele et al. (2008) relataram que pacientes cirúrgicos com as variações de *MTHFR* 677C>T ou 1298A>C homocigotos (genótipos TT e CC, respectivamente) têm maior risco de desenvolverem hiperhomocisteinemia após esse tipo de anestesia quando comparados com indivíduos do tipo selvagem (CC e AA, respectivamente) ou heterocigotos (CT e AC, respectivamente). No entanto, há escassos dados publicados sobre a exposição ocupacional ao N₂O e polimorfismos do *MTHFR*. Staubli et al. (2016) avaliaram o polimorfismo C677>T do *MTHFR* em 29 indivíduos expostos ocupacionalmente ao N₂O (três homocigotos), cujos resultados das concentrações de HCY não diferiram significativamente quando comparados a 31 trabalhadores não expostos ao N₂O (dois homocigotos). Entretanto, os autores destacaram que a falta de diferença significativa poderia estar relacionada ao pequeno tamanho amostral. Assim, mais estudos nessa área poderiam contribuir para melhor entendimento se as mudanças nos níveis de HCY podem estar

relacionadas aos polimorfismos de *MTHFR* e se isso poderia ser agravado pela exposição aos RGA, especialmente ao N₂O.

Quanto à avaliação de enzimas hepáticas, profissionais (anestesiologistas, cirurgiões, enfermeiros e técnicos) expostos ocupacionalmente a concentrações desconhecidas de halotano, enflurano e isoflurano, além do N₂O, por mais de 20 horas semanais tiveram alterações hepáticas, com aumento das enzimas ALT, AST e GGT além de bilirrubina total em comparação com o grupo controle não exposto (Casale et al., 2014).

Diferentemente, no nosso estudo não houve alterações hepáticas em nenhum dos marcadores enzimáticos. Vale ressaltar que os anestésicos halogenados mais modernos são menos metabolizados e menos solúveis em sangue e em gordura que os halogenados mais antigos. Estudo realizado no Irã mostrou aumento das enzimas ALT e AST, mas não de ALKP, em diferentes profissionais (técnicos e enfermeiras) expostos a concentrações residuais abaixo e acima dos valores recomendados pela *NIOSH* para os anestésicos sevoflurano e isoflurano respectivamente, concomitantemente ao uso de N₂O, o qual, diferentemente dos outros anestésicos, não foi mensurado (Jafari et al., 2018). Por outro lado, em outro estudo não foram detectadas alterações de função hepática entre os diversos profissionais expostos a concentrações residuais de anestésicos enflurano e N₂O em comparação com o grupo não exposto (De Zotti et al., 1983). Outro estudo também não detectou aumento das atividades enzimáticas AST e GGT em anestesiologistas expostos a halogenados e N₂O (Nunn et al., 1982), corroborando com nossos achados. Destaca-se que a avaliação de maior tempo de exposição aos RGA mais modernos necessita de estudos complementares, já que a literatura mostra dados de hepatotoxicidade relacionada aos anestésicos inalatórios mais antigos, especialmente o halotano (Safari et al., 2014).

A resposta inflamatória é desencadeada sempre que o organismo é exposto a situações que colocam em risco a homeostasia. As células inflamatórias produzem mediadores solúveis, como citocinas, que recrutam células para o local da lesão tecidual; a liberação adicional de ERO intensifica o processo inflamatório (Migliore & Coppedè, 2009). Tanto a IL8 quanto a IL17A são mediadores pró-

inflamatórios envolvidos nas vias aéreas humanas. Estudo recente relatou aumento na concentração de IL17A em médicos residentes expostos aos RGA (Braz et al., 2020). No entanto, como mostrado pelos dados do estresse oxidativo, não houve aumento sistêmico nas concentrações de IL8 e PCR-as em anesthesiologistas. A IL8 é uma potente citocina quimiotática e ativadora de neutrófilos, tendo sua liberação aumentada mediante quadros inflamatórios (Huber et al., 1991). Devido à sua atividade quimiotática no recrutamento de outras interleucinas inflamatórias, também foram avaliadas a IL6 e a IL17A, entretanto suas concentrações sorológicas ficaram abaixo do limite de detecção.

O comprimento de telômero tem sido sugerido como importante biomarcador de inflamação cumulativa e estresse oxidativo ao longo da vida (Miri et al., 2019). Nossos achados referentes ao comprimento de telômeros corroboram com os dados relacionados aos danos no DNA, marcadores de estresse oxidativo e marcadores inflamatórios sistêmicos. No entanto, estudos adicionais com maior tamanho amostral são necessários para confirmar esses achados. O único estudo disponível na literatura sobre a temática mostrou encurtamento de telômeros em anesthesiologistas egípcios (Zanaty et al., 2017); entretanto o objetivo primário da pesquisa mencionada foi avaliar o bem-estar emocional e físico desses profissionais, os quais podem enfrentar estresse psicológico crônico, e o objetivo secundário foi analisar o envelhecimento da pele e o comprimento dos telômeros; portanto a avaliação não foi relacionada com a exposição ocupacional aos RGA, a qual foi o enfoque do nosso estudo.

A avaliação da expressão gênica é uma ferramenta importante para a detecção de alterações precoces (Lin & Barbosa, 2002), a qual ainda não foi realizada na exposição ocupacional aos RGA. Assim, foram avaliadas a expressão de genes-chave envolvidos nas respostas de reparo, na defesa antioxidante, na manutenção do genoma e na inflamação para verificação dos possíveis efeitos moleculares da exposição aos RGA.

A modulação dos genes *hOGG1* e *XRCC1* foi relatada em pacientes anestesiados com isoflurano (Braz et al., 2011; Freire et al., 2018). No entanto, o presente estudo não mostrou alterações nesses genes na exposição ocupacional aos

RGA. De fato, como não se observou aumento na oxidação das bases púricas do DNA, provavelmente não houve estímulo para a ativação do sistema de reparo de danos oxidativos. Salienta-se que enquanto os pacientes são expostos de forma aguda a altas concentrações anestésicas, os profissionais ficam expostos a menores concentrações (residuais), entretanto por longos períodos (ao longo da vida profissional). Da mesma forma, os transcritos *NRF2* e *TP53* também não foram modulados em anesthesiologistas expostos e esse achado também se deve pela ausência de lesões no DNA e de alterações nos níveis de antioxidantes encontrados.

Já a expressão do gene inflamatório *IL6* parece ser mais sensível e melhor marcador de exposição ocupacional aos RGA que o nível sistêmico de *IL6*, que foi encontrado em pequenas concentrações na corrente sanguínea. A *IL8*, associada a inflamação do trato respiratório, teve suas concentrações aumentadas em médicos residentes expostos a altas concentrações de RGA, mesmo que por um período relativamente curto de exposição (Chaoul et al., 2015). De forma interessante, os níveis séricos e a expressão gênica da interleucina pró-inflamatória *IL8* mostraram padrões semelhantes nos anesthesiologistas (aumento de 60%). Dessa maneira, a superexpressão desse gene pode ser um biomarcador molecular da resposta inflamatória relacionada aos RGA. Certamente, mais estudos epidemiológicos nessa temática são necessários para melhor compreensão das alterações moleculares inflamatórias frente à exposição ocupacional aos RGA, considerando que milhares de profissionais ao redor do mundo são expostos cronicamente a esses agentes.

A alteração da expressão de genes nas células periféricas pode indicar precocemente uma alteração toxicológica antes que ocorra um possível dano funcional, refletindo o que ocorre em um organismo na exposição a agentes, embora nenhuma avaliação específica de tecido/órgão tenha sido realizada (Zhou et al., 2009). A análise da expressão gênica em sangue tem se mostrado relevante devido a esse biofluido ser de fácil obtenção e os leucócitos serem sentinelas para a resposta do sistema imunológico, o que possibilita a identificação de biomarcadores, especialmente os de inflamação (Whitney et al., 2003; Feezor et al., 2004). Portanto, com este estudo, abre-se a possibilidade de melhor se investigar vias e processos

inflamatórios no organismo de profissionais expostos aos RGA nas diferentes tecnologias ômicas.

Algumas possíveis limitações do presente estudo precisam ser reconhecidas. A população estudada pode não refletir as populações avaliadas pela maioria dos estudos na literatura sobre o tema pois foram avaliados anestesiolistas que trabalhavam em um único hospital universitário; 35% deles eram docentes e não passavam 8 horas diárias nas SC, as quais possuíam sistema parcial de exaustão; e os profissionais faziam uso de equipamentos modernos de anestesia. Adicionalmente, aproximadamente 1/3 das anestésias gerais foram realizadas com uso de anestésicos inalatórios (*versus* 2/3 com uso de anestésicos intravenosos). A alta frequência de uso de anestesia venosa certamente diminuiu a exposição ocupacional aos RGA.

Os pontos fortes da pesquisa, que garantem a robustez e a confiabilidade dos resultados, incluem critérios rígidos de exclusão, grupos adequadamente pareados, metodologias padrão-ouro e poluição anestésica conhecida.

Esforços contínuos são necessários para investigação dos efeitos biológicos e na saúde dos profissionais ocupacionalmente expostos aos RGA para entender melhor os possíveis mecanismos tóxicos dessa exposição, incluindo aqueles relacionados à suscetibilidade genética e padrões epigenéticos.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que, considerando as condições deste estudo, a exposição aos RGA não está associada à instabilidade *redox* ou genética, aos marcadores hepáticos, aos micronutrientes, ao comprimento de telômeros nem às alterações de transcritos dos genes relacionados ao reparo de dano oxidativo, de defesa antioxidante e manutenção do genoma. No entanto, influencia a resposta inflamatória molecular em anesthesiologistas atuantes em hospital universitário. Assim, a redução da exposição aos RGA e o aumento do biomonitoramento devem ser considerados para todos os profissionais ocupacionalmente expostos.

7 REFERÊNCIAS

- Ahlborg GJr, Axelsson G, Bodin L. Shift work, nitrous oxide exposure and subfertility among Swedish midwives. *Int J Epidemiol*. 1996;25(4):783-90. doi: 10.1093/ije/25.4.783.
- Al-Ashour IAK, Abd-Ali DK, Fallah MA, Kteo IQ. Effect of inhaled anesthetics gases on health staff health status in Al-Najaf city. *IJSTR* [Internet]. 2014;3(12):383-8. [citado 2019 Jan 10]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317993895_Effect_Of_Inhaled_Anesthetics_Gases_On_Health_Staff_Health_Status_In_Al-Najaf_City.
- Alves GM, Barão MA, Odo LN, Nascimento Gomes G, Franco Md Mdo C, Nigro D, et al. L-Arginine effects on blood pressure and renal function of intrauterine restricte rats. *Pediatr Nephrol*. 2002;17(10):856-62. doi: 10.1007/s00467-002-0941-z.
- Amaral J, Ezequiel M, Luís Catarina. Acidente vascular cerebral isquémico num lactente filho de mãe vegana. *Acta Pediatr Port*. 2018;49(1):66-70. doi: 10.21069/APP.2018.9001.
- Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Cromatogr*. 1987;422:43-52. doi: 10.1016/0378-4347(87)80438-3.
- Araujo TK, Silva-Grecco RL, Bisinotto FM, Roso NC, Pissetti CW, Cruz RM, et al. Genotoxic effects of anesthetics in operating room personnel evaluated by micronucleus test. *J Anesthesiol Clin Sci*. 2013;2-26. doi: 10.7243/2049-9752-2-26.
- Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*. 1993;7(2):349-60. doi: 10.1096/fasebj.7.2.8440411.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2018 [Last Reviewed 2018 Apr 26]; cited 2019 Nov 4]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Arruda NM, Braz LG, Nogueira FR, Souza KM, Aun AG, Figueiredo DBS, et al. Inflammation and DNA damage induction in surgical patients maintained with desflurane anesthesia. *Mutat Res.* 2019;846:403073. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.07.003.

Aun AG. Monitoramento genético e de balanço redox em médicos residentes ocupacionalmente expostos aos anestésicos inalatórios [Internet] [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu; 2017. [citado 2018 Fev 15]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150044>.

Baluz K, Carmo MGT, Rosas G. The role of folic acid on oncologic prevention and intervention: review. *Rev Bras Cancerol* [Internet]. 2002;48(4):597-607. [citado 2018 Jul 22]. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-406024>.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* [Internet]. 2010; 23(4):629-43. [citado 2019 Dez 12]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13.pdf>.

Baysal Z, Cengiz M, Ozgonul A, Cakir M, Celik H, Kocyigit A. Oxidative status and DNA damage in operating room personnel. *Clin Biochem.* 2009;42(3):189-93. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.09.103.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6. doi: 10.1006/abio.1996.0292.

Best PJ, Berger PB, Miller VM, Lerman A. The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-levels in postmenopausal women. *Ann Inter Med.* 1998;128(4):285-8. doi: 10.7326/0003-4819-128-4-199802150-00006.

Bilban M, Jakopin CB, Ogrinc D. Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). *Int Arch Occup Environ Health.* 2005;78(1):60-4. doi: 10.1007/s00420-004-0579-1.

Bodin L, Axelsson G, Ahlborg GJr. The association of shift work and nitrous oxide exposure in pregnancy with birth weight and gestational age. *Epidemiology*. 1999;10(4):429-36. doi: 10.1097/00001648-199907000-00012.

Boivin JF. Risk of spontaneous abortion in women occupationally exposed to anaesthetic gases: a meta-analysis. *Occup Environ Med*. 1997;54(8):541-8. doi: 10.1136/oem.54.8.541.

Borayek GE, Abou El-Magd SA, El-Gohary SS, El-Nagggar AM, Hammouda MA. Occupational genotoxic effects among a group of nurses exposed to anesthetic gases in operating rooms at Zagazig university hospitals. *Egypt J Occup Med* [Internet]. 2018;42(1):105-22. [citado 2019 Fev 19]. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/6e19/de63f2697e0b7fc357e76b2dfdbbb2efeaba.pdf>.

Braz LG, Braz JRC, Cavalcante GAS, Souza KM, Lucio LMC, Braz MG. [Comparison of waste anesthetic gases in operating rooms with or without an scavenging system in a Brazilian University Hospital]. *Rev Bras Anesthesiol*. 2017;67(5):516-20. doi: 10.1016/j.bjan.2017.02.001.

Braz MG, Mazoti MA, Giacobino J, Braz LG, Golim MA, Ferrasi AC, et al. Genotoxicity, cytotoxicity and gene expression in patients undergoing elective surgery under isoflurane anaesthesia. *Mutagenesis*. 2011;26(3):415-20. doi: 10.1093/mutage/geq109.

Braz MG, Braz LG, Mazoti MA, Pinotti MF, Pardini MI, Braz JR, et al. Lower levels of oxidative DNA damage and apoptosis in lymphocytes from patients undergoing surgery with propofol anesthesia. *Environ Mol Mutagen*. 2012;53(1):70-7. doi: 10.1002/em.20690.

Braz MG, Braz LG, Freire CM, Lucio LM, Braz JR, Tang G, et al. Isoflurane and propofol contribute to increasing the antioxidant status of patients during minor elective surgery: a randomized clinical study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(31):e1266. doi: 10.1097/MD.0000000000001266.

Braz MG, Souza KM, Lucio LMC, Di Renzo GCC, Feliciano LM, Marcondes JPC, et al. Detrimental effects detected in exfoliated buccal cells from anesthesiology medical residents occupationally exposed to inhalation anesthetics: an

observational study. *Mutat Res.* 2018;832-833:61-4. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.07.001.

Braz MG, Carvalho LI, Chen CY, Blumberg JB, Souza KM, Arruda NM, et al. High concentrations of waste anesthetic gases induce genetic damage and inflammation in physicians exposed for three years: a cross-sectional study. *Indoor Air.* 2020;30(3):512-20. doi: 10.1111/ina.12643.

Byhahn C, Heller K, Lischke V, Westphal K. Surgeon's occupational exposure to nitrous oxide and sevoflurane during pediatric surgery. *World J Surg.* 2001;25(9):1109-12. doi: 10.1007/bf03215855.

Camp VM, Chipponi J, Faraj BA. Radioenzymatic assay for direct measurement of plasma pyridoxal 5'-phosphate. *Clin Chem [Internet].* 1983;29(4):642-4. [citado 2018 Ago 13]. Disponível em: <http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/29/4/642.full.pdf>.

Casale T, Caciari T, Rosati MV, Gioffré PA, Schifano MP, Capozzella A, et al. Anesthetic gases and occupationally exposed workers. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;37(1):267-74. doi: 10.1016/j.etap.2013.12.003.

Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47. doi: 10.1093/nar/30.10.e47.

Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Sailaja N, Rahman MF, Reddy JP, Mahboob M, et al. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis.* 2006;21(4):249-54. doi: 10.1093/mutage/gel029.

Chaoul MM, Braz JR, Lucio LM, Golim MA, Braz LG, Braz MG. Does occupational exposure to anesthetic gases lead to increase of pro-inflammatory cytokines? *Inflamm Res.* 2015;64(12):939-42. doi: 10.1007/s00011-015-0881-2.

Chen CY, Blumberg JB. In vitro activity of almond skin polyphenols for scavenging free radicals and inducing quinone reductase. *J Agric Food Chem.* 2008;56(12):4427-34. doi: 10.1021/jf800061z.

Chinelato AR, Froes ND. Genotoxic effects on professionals exposed to inhalation anesthetics. *Rev Bras Anesthesiol.* 2002;52(1):79-85. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942002000100010>.

- Coburn SP. Vitamin B-6 metabolism and interactions with TNAP. *Subcell Biochem.* 2015;76:207-38. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9_11.
- Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis.* 1993;14(9):1733-5. doi: 10.1093/carcin/14.9.1733.
- Collins AR, Dusinská M, Gedik CM, Stětina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect.* 1996;104 Suppl 3:465-9. doi: 10.1289/ehp.96104s3465.
- Collins AR, Gaivão I. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Mol Aspects Med.* 2007;28(3-4):307-22. doi: 10.1016/j.mam.2007.05.005.
- Correa CR, Chen CY, Aldini G, Rasmussen H, Ronchi CF, Berchieri-Ronchi C, et al. Bioavailability of plant pigment phytochemicals in *Angelica keiskei* in older adults: a pilot absorption kinetic study. *Nutr Res Pract.* 2014;8(5):550-7. doi: 10.4162/nrp.2014.8.5.550.
- Cordier PY, Michel F, Pellegrini L, Lando A, Martin C. Occupational exposure to anaesthetic gases: risk perception and reported practices by anaesthesiologists and nurse anaesthetists: 1AP7-5. In: Martin RT, editor. *Euroanaesthesia 2012. Proceedings of the European Anaesthesiology Congress-Euroanaesthesia; 2012 Jun 9-12; Paris, France.* France: Eur J Anaesthesiol [Internet]; 2012. p. 22. [citado 2019 Dez 6]. Disponível em: https://journals.lww.com/ejanaesthesiology/fulltext/2012/06001/occupational_exposure_to_anaesthetic_gases__risk.73.aspx.
- Costa Paes ER, Braz MG, Lima JT, Silva MRG, Sousa LB, Lima ES, et al. DNA damage and antioxidant status in medical residents occupationally exposed to waste anesthetic gases. *Acta Cir Bras.* 2014;29(4):280-6. doi: 10.1590/s0102-86502014000400010.
- Crous-Bou M, Fung TT, Prescott J, Julin B, Du M, Sun Q. Mediterranean diet and telomere length in Nurses' Health Study: population based cohort study. *BMJ.* 2014;349:g6674. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.g6674>.

- De Zotti R, Negro C, Gobbato F. Results of hepatic and hemopoietic controls in hospital personnel exposed to waste anesthetic gases. *Int Arch Occup Environ Health*. 1983;52(1):33-41. doi: 10.1007/bf00380605.
- Duarte LTD, Durval Neto GF, Mendes FF. Uso do óxido nitroso em pediatria. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012;62(3):451-67. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942012000300017>.
- Dusse LM, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39(4):343-50. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442003000400012>.
- El-Ebiary AA, Abuelfadl AA, Sarhan NI, Othman MM. Assessment of genotoxicity risk in operation room personnel by the alkaline comet assay. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32(6):563-70. doi: 10.1177/0960327111426584.
- Eroglu A, Celep F, Erciyes N. A comparison of sister chromatid exchanges in lymphocytes of anesthesiologists to nonanesthesiologists in the same hospital. *Anesth Analg*. 2006;102(5):1573-7. doi: 10.1213/01.ane.0000204298.42159.0e.
- Feezor RJ, Baker HV, Mindrimos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH, et al. Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics*. 2004;19(3):247-54. doi: 10.1152/physiolgenomics.00020.2004.
- Ferguson LR. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res*. 2010;690(1-2):3-11. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.03.007.
- Fett-Conte AC, Salles ABCF. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24(2):85-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842002000200004>.
- Flora Filho R, Zilberstein B. Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity- metabolism, synthesis and functions. *Rev Assoc Med Bras*. 2000;46(3):265-71. doi: 10.1590/s0104-42302000000300012.
- Freire CMM, Braz MG, Marcondes JPC, Arruda NM, Braz JRC, Rainho CA, et al. Expression and promoter methylation status of two DNA repair genes in leukocytes from patients undergoing propofol or isoflurane anaesthesia. *Mutagenesis* 2018;33(2):147-52. doi: 10.1093/mutage/gey001.

Gao S, Qin T, Liu Z, Caceres MA, Ronchi CF, Chen CY, et al. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H₂O₂-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. *Mol Vis* [Internet]. 2011;17:3180-90. [citado 2019 Out 18]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3244479/pdf/mv-v17-3180.pdf>.

Garcia J, Issy A, Sakata R. Citocinas e Anestesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52(1):86-100. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942002000100011>.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(11):1106-14. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00394-4.

Hall GM, Ali W. The stress response and its modification by regional anaesthesia. *Anaesthesia*. 1998;53 Suppl 2:10-2. doi: 10.1111/j.1365-2044.1998.tb15132.x.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57(5 Suppl):715S-724S. doi: 10.1093/ajcn/57.5.715S.

Hanova M, Vodickova L, Vaclavikova R, Smerhovsky Z, Stetina R, Hlavac P, et al. DNA damage, DNA repair rates and mRNA expression levels of cell cycle genes (TP53, p21(CDKN1A), BCL2 and BAX) with respect to occupational exposure to styrene. *Carcinogenesis*. 2011;32(1):74-9. doi: 10.1093/carcin/bgq213.

Helfenstein E. Farmacodinâmica dos anestésicos inalatórios. In: Cangiani LM, Posso IP, Potério GMB, Nogueira CS, editores. *Tratado de anesthesiologia*. 6th ed. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 791-802.

Hoerauf KH, Wiesner G, Schroegendorfer KF, Jobst BP, Spacek A, Harth M, et al. Waste anaesthetic gases induce sister chromatid exchanges in lymphocytes of operating room personnel. *Br J Anaesth*. 1999;82(5):764-6. doi: 10.1093/bja/82.5.764.

Holmström KM, Kostov RV, Dinkova-Kostova AT. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol*. 2016;1:80-91. doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.002.

- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*. 1991;254(5028):99-102. Erratum in: *Science*. 1991;254:631,1435. doi: 10.1126/science.1718038.
- ICRP. Recommendations of the international commission on radiological protection. Oxford Pergamon Press, V. 60, 1991. 201 p.
- ICRU. Quantities and units in radiation protection dosimetry. Maryland: IRCU, V. 51, 1993. 19 p.
- Iqbal MP, Ishaq M, Kazmi KA, Yousuf FA, Mehboobali N, Ali AS, et al. Role of vitamins B6, B12 and folic acid on hiperhomocysteinemia in a Pakistani poputaltion of patients with acute myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15(2):100-8. doi: 10.1016/j.numecd.2004.05.003.
- Izdes S, Sardas S, Kadioglu E, Karakaya AE. DNA damage, glutathione, and total antioxidant capacity in anesthesia nurses. *Arch Environ Occup Health*. 2010;65(4):211-7. doi: 10.1080/19338244.2010.486421.
- Jafari A, Jafari F, Mohebbic I. Effects of occupational exposure to trace levels of halogenated anesthetics on the liver, kidney, and oxidative stress parameters in operating room personnel. *Toxin Rev*. 2018:1-10. doi: 10.1080/15569543.2018.1498898.
- Jaloszynski P, Kujawski M, Wasowicz M, Szulc R, Szyfter K. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutat Res*. 1999;439(2):199-206. doi: 10.1016/s1383-5718(98)00195-8.
- Janasik B, Reszka E, Stanislawski M, Jablonska E, Kuras R, Wieczorek E, et al. Effect of Arsenic Exposure on NRF2-KEAP1 Pathway and Epigenetic Modification. *Biol Trace Elem Res*. 2018;185(1):11-9. doi: 10.1007/s12011-017-1219-4.
- Kharasch ED, Thummel KE. Identification of cytochrome P4502E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane. *Anesthesiology*. 1993;79(4):795-807. doi: 10.1097/00000542-199310000-00023.

- Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch Pharm Res.* 2018;41(4):372-83. doi: 10.1007/s12272-018-1016-4.
- Ko J-L, Chen Y-J, Liu G-C, Hsin I-L, Cehn H-L. The association of occupational metals exposure and oxidative damage, telomere shortening in fitness equipments manufacturing workers. *Ind Health.* 2017;55(4):345-53. doi: 10.2486/indhealth.2016-0148.
- Krajewski W, Kucharska M, Pilacik B, Fobker M, Stetkiewicz J, Nofer JR, et al. Impaired vitamin B12 metabolic status in healthcare workers occupationally exposed to nitrous oxide. *Br J Anaesth.* 2007;99(6):812-8. doi: 10.1093/bja/aem280.
- Lin CJ, Barbosa AS. Técnicas de análise da regulação da transcrição gênica e suas aplicações na endocrinologia molecular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(4):330-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302002000400004>.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lucchini R, Placidi D, Toffoletto F, Alessio L. Neurotoxicity in operating room personnel working with gaseous and nongaseous anesthesia. *Int Arch Occup Environ Health.* 1996;68(3):188-92. doi: 10.1007/bf00381630.
- Malekirad AA, Ranjbar A, Rahzani K, Kadkhodae M, Rezaie A, Taghavi B, et al. Oxidative stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases. *Hum Exp Toxicol.* 2005;24(11):597-601. doi: 10.1191/0960327105ht565oa.
- Mazoti MA, Braz MG, Golim MA, Braz LG, Dias NH, Salvadori DM, et al. Comparison of inflammatory cytokine profiles in plasma of patients undergoing otorhinological surgery with propofol or isoflurane anesthesia. *Inflamm Res.* 2013;62(10):879-85. doi: 10.1007/s00011-013-0643-y.
- Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res.* 2009;674(1-2):73-84. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.013.

- Miri M, Nazarzadeh M, Alahabadi A, Ehrampoush MH, Rad A, Lotfi MH, et al. Air pollution and telomere length in adults: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Environ Pollut.* 2019;244:636-47. doi: 10.1016/j.envpol.2018.09.130.
- Mirmoghtadaie L, Shamaeizadeh N, Mirzabasiri N. Folic acid determination using electrochemical sensor. *Int J Prev Med.* 2015;6(1):1-13. doi: 10.4103/2008-7802.167179.
- Møller P, Wils RS, Jensen DM, Andersen MHG, Roursgaard M. Telomere dynamics and cellular senescence: an emerging field in environmental and occupational toxicology. *Crit Rev Toxicol.* 2018;48(9):761-88. doi: 10.1080/10408444.2018.1538201.
- Nagele P, Zeugswetter B, Wiener C, Burger H, Hüpfl M, Mittlböck M, et al. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on homocysteine concentrations after nitrous oxide anesthesia. *Anesthesiology.* 2008;109(1):36-43. doi: 10.1097/ALN.0b013e318178820b.
- Nagele P, Tallchief D, Blood J, Sharma A, Kharasch ED. Nitrous oxide anesthesia and plasma homocysteine in adolescents. *Anesth Analg.* 2011;113(4):843-8. doi: 10.1213/ANE.0b013e31822402f5.
- National Institute of Occupational Safety and Health (US). Criteria for recommended standard: occupational exposure to waste anesthetic gases and vapors [Internet]. Atlanta: Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control; 1977 [citado 2016 Jan 5]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/1970/77-140.html>.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). Drinking levels defined [Internet]. Bethesda: NIAAA; 2015 [citado 2016 Jan 5]. Disponível em: <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>.
- Nunn JF, Sharer N, Royston D, Watts RW, Purkiss P, Worth HG. Serum methionine and hepatic enzyme activity in anaesthetists exposed to nitrous oxide. *Br J Anaesth.* 1982;54(6):593-7. doi: 10.1093/bja/54.6.593.

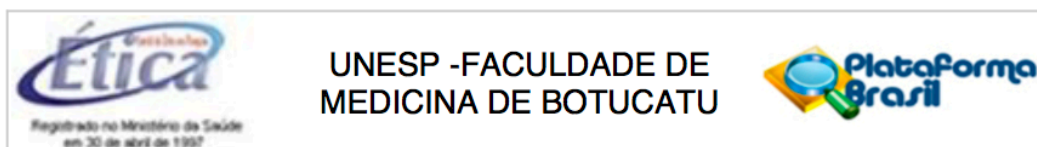
- Oliveira CR. Occupational exposure to anesthetic gases residue. *Rev Bras Anesthesiol.* 2009;59(1):110-24. doi: 10.1590/s0034-70942009000100014.
- Orosz JE, Braz MG, Golim MA, Barreira MA, Fecchio D, Braz LG, et al. Cytokine profile in patients undergoing minimally invasive surgery with balanced anesthesia. *Inflammation.* 2012;35(6):1807-13. doi: 10.1007/s10753-012-9501-2.
- Plummer JL, Sandison CH, Ilsley AH, Cousins MJ. Attitudes of anaesthetists and nurses to anaesthetic pollution. *Anaesth Intensive Care.* 1987;15(4):411-20. doi: 10.1177/0310057X8701500410.
- Rao LK, Francis AM, Wilcox U, Miller JP, Nagele P. Pre-operative vitamin B infusion and prevention of nitrous oxide-induced homocysteine increase. *Anaesthesia.* 2010;65(7):710-5. doi: 10.1111/j.1365-2044.2010.06375.x.
- Rozgaj R, Kasuba V. Chromosome aberrations and micronucleus frequency in anaesthesiology personnel. *Arh Hig Rada Toksikol* [Internet]. 2000;51(4):361-8. [citado 2017 Mar 2]. Disponível em:<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Tgi0RwdNiosJ:https://hrcak.srce.hr/file/1377+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>.
- Rozgaj R, Kasuba V, Brozovic G, Jazbec A. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Int J Hyg Environ Health.* 2009;212(1):11-7. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.09.001.
- Safari S, Motavaf M, Seyed Siamdoust SA, Alavian SM. Hepatotoxicity of halogenated inhalational anesthetics. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;16(9):e20153. doi: 10.5812/ircmj.20153.
- Sanders RD, Weimann J, Maze M. Biologic effects of nitrous oxide. *Anesthesiology.* 2008;109(4):707-22. doi: <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181870a17>.
- Sardas S, Aygün N, Gamli M, Unal Y, Unal N, Berk N, et al. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutat Res.* 1998;418(2-3):93-100. doi: 10.1016/s1383-5718(98)00113-2.

- Sardas S, Izdes S, Ozcagli E, Kanbak O, Kadioglu E. The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006;80(2):154-9. doi: 10.1007/s00420-006-0115-6.
- Scheftel JM, Elchos BL, Rubin CS, Decker JA. Review of hazards to female reproductive health in veterinary practice. *J Am Vet Med Assoc*. 2017;250(8):862-72. doi: 10.2460/javma.250.8.862.
- Sharma M, Tiwari M, Tiwari RK. Hyperhomocysteinemia: impact on neurodegenerative diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;117(5):287-96. doi: 10.1111/bcpt.12424.
- Sheeran P, Hall GM. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1997;78(2):201-19. doi: 10.1093/bja/78.2.201.
- Shirangi A, Fritschi L, Holman CD. Associations of unscavenged anesthetic gases and long working hours with preterm delivery in female veterinarians. *Obstet Gynecol*. 2009;113(5):1008-17. doi: 10.1097/AOG.0b013e31819fe996.
- Souza CM, Tardelli MA. Anestesia inalatória. In: Amaral JLG, Geretto P, Tardelli MA, Machado FR, Yamashita AM, editores. *Guia de anestesiologia e medicina intensiva* [Internet]. São Paulo: Manole; 2011 [citado 2017 Out 20]. p. 47-74. Disponível em: <http://www.davidferez.net.br/alunos/curso-elearning-de-anestesi/anestesiainalatoria.pdf>.
- Souza KM. Avaliação de danos no material genético em anesthesiologistas [Internet] [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu; 2016. [citado 2017 Jan 8]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/137981>.
- Souza KM, Braz LG, Nogueira FR, Souza MB, Bincoletto LF, Aun AG, et al. Occupational exposure to anesthetics leads to genomic instability cytotoxicity and proliferative changes. *Mutat Res*. 2016;791-2:42-8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2016.09.002.
- Staubli G, Baumgartner M, Sass JO, Hersberger M. Laughing gas in a pediatric emergency department-fun for all participants: vitamin B12 status among medical staff working with nitrous oxide. *Pediatr Emerg Care*. 2016;32(12):827-9. doi: 10.1097/PEC.0000000000000582.

- Sweeney B, Bingham RM, Amos RJ, Petty AC, Cole PV. Toxicity of bone marrow in dentists exposed to nitrous oxide. *Br Med J*. 1985;291(6495):567-9. doi: 10.1136/bmj.291.6495.567.
- Türkan H, Aydın A, Sayal A. Effect of volatile anesthetics on oxidative stress due to occupational exposure. *World J Surg*. 2005;29(4):540-2. doi: 10.1007/s00268-004-7658-z.
- Szyfter K, Stachecki I, Kostrzevska-Poczekaj M, Szaumkessel M, Szyfter-Harris J, Sobczyński P. Exposure to volatile anaesthetics is not followed by a massive induction of single-strand DNA breaks in operation theatre personnel. *J Appl Genet*. 2016;57(3):343-8. doi: 10.1007/s13353-015-0329-y.
- Uzun S, Saricaoglu F, Ayhan B, Topatan B, Akinci SB, Aypar U. Homocysteine levels and bad obstetric outcome among female operating room personnel occupationally exposed to nitrous oxide. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(6):372-6. doi: 10.4149/bll_2014_073.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30(5):1323-38. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>.
- Volpi N, Tarugi P. Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;713(2):433-7. doi: 10.1016/s0378-4347(98)00195-9.
- Weimann J. Toxicity of nitrous oxide. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2003;17(1):47-61. doi: 10.1053/bean.2002.0264.
- Weiser TG, Haynes AB, Molina G, Lipsitz SR, Esquivel MM, Uribe-Leitz T, et al. Size and distribution of the global volume of surgery in 2012. *Bull World Health Organ*. 2016;94(3):201-9. doi: 10.2471/BLT.15.159293.
- Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(4):1896-901. doi: 10.1073/pnas.252784499.

- Wiesner G, Hoerauf K, Schroegendorfer K, Sobczynski P, Harth M, Ruediger HW. High-level, but not low-level, occupational exposure to inhaled anesthetics is associated with genotoxicity in the micronucleus assay. *Anesth Analg*. 2001;92(1):118-22. doi: 10.1097/00000539-200101000-00023.
- Wong JY, De Vivo I, Lin X, Christiani DC. Cumulative PM(2.5) exposure and telomere length in workers exposed to welding fumes. *J Toxicol Environ Health A*. 2014a;77(8):441-55. doi: 10.1080/15287394.2013.875497.
- Wong JYY, De Vivo I, Lin X, Fang SC, Christiani DC. The relationship between inflammatory biomarkers and telomere length in an occupational prospective cohort study. *Plos One*. 2014b;9(1):e87348. doi: 10.1371/journal.pone.0087348. eCollection 2014.
- Wrońska-Nofer T, Palus J, Krajewski W, Jajte J, Kucharska M, Stetkiewicz J, et al. DNA damage induced by nitrous oxide: Study in medical personnel of operating rooms. *Mutat Res*. 2009;666(1-2):39-43. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.03.012.
- Wrońska-Nofer T, Nofer JR, Jajte J, Dziubaltowska E, Szymczak W, Krajewski W, et al. Oxidative DNA damage and oxidative stress in subjects occupationally exposed to nitrous oxide (N₂O). *Mutat Res*. 2012;731(1-2):58-63. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.10.010.
- Zanaty OM, El Metainy S, Abdelmaksoud R, Demerdash H, Aliaa DA, El Wafa HA. Occupational stress of anesthesia: effects on aging. *J Clin Anesth*. 2017;39:159-64. doi: 10.1016/j.jclinane.2017.03.047.
- Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP. *Biologia molecular básica*. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
- Zhang X, Lin S, Funk WE, Ho L. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Postgrad Med J*. 2013;89(1058):722-8. doi: 10.1136/postgradmedj-2012-101350rep.
- Zhou T, Chou J, Watkins PB, Kaufmann WK. Toxicogenomics: transcription profiling for toxicology assessment. *EXS*. 2009;99:325-66. doi: 10.1007/978-3-7643-8336-7_12.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de status redox, resposta inflamatória, telômeros e expressão gênica em anesthesiologistas

Pesquisador: Kátina Meneghetti de Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55861716.4.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Anestesiologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.602.015

Situação do Parecer:

Aprovado


Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

ANEXO B - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

Saúde
Ministério da Saúde

 **REGISTRO BRASILEIRO DE**
Ensaios Clínicos

USUÁRIO SENHA **ENTRAR** [Esqueceu a senha?](#)
[Registrar-se](#)

[PT](#) | [ES](#) | [EN](#)

[NOTÍCIAS](#) | [SOBRE](#) | [AJUDA](#) | [CONTATO](#)

Buscar ensaios
[BUSCA AVANÇADA](#)

[HOME](#) / [ENSAIOS REGISTRADOS](#) /

RBR-6gf6dx

Avaliação de status redox, resposta inflamatória, telômeros e expressão gênica em anesthesiologistas

Data de registro: 20 de Jan. de 2017 às 15:41

Last Update: 28 de Ago. de 2019 às 11:01