



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

Drielle Baptista dos Santos Figueiredo

**Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em
profissionais expostos ao resíduo de anestésico isoflurano
que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário**

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Mariana Gobbo Braz

Botucatu

2020

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

Drielle Baptista dos Santos Figueiredo

**Avaliação de instabilidade genética e
citotoxicidade em profissionais expostos aos
resíduos de anestésico isoflurano que atuam em
centro cirúrgico de hospital veterinário**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana 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

Figueiredo, Drielle Baptista dos Santos.

Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos aos resíduos de anestésico isoflurano que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário / Drielle Baptista dos Santos Figueiredo. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Mariana Gobbo Braz
Capes: 20100000

1. Isoflurano. 2. Anestésicos. 3. Toxicologia genética. 4. Exposição ocupacional. 5. Saúde pública - Pesquisa.

Palavras-chave: Anestésico inalatório; Exposição ocupacional; Genotoxicidade; Instabilidade genômica; Saúde pública veterinária.

Dedicatória

A Deus,

Pelo amor, coragem, força e orientação nesta intensa jornada.

“Cuidarei das minhas ovelhas...”. Ezequiel 34:12

Meu esposo Eric, por toda ajuda com a nossa filha, que no início desta jornada tinha seis meses de vida, obrigada pela paciência diante da minha ausência, obrigada pela compreensão e principalmente obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

“O amor é paciente e bondoso (...) Não procura os seus próprios interesses (...) Suporta todas as coisas, acredita em todas as coisas, espera todas as coisas, persevera em todas as coisas. O amor nunca acaba”. 1ª Coríntios 13:4,7,8

A minha amada filha Natália, tudo isso só teve sentido pela sua existência na minha vida.

“Por você, faria isso mil vezes”. Khaled Hosseini, O caçador de Pipas.

Aos meus pais, Paulo e Selma e minha irmã Alessa, pelas referências, ajuda e incentivo. Mas principalmente, obrigada mãe, sou imensamente grata por cuidar da nossa pequena na minha ausência!

“Filha, a gente não tem dinheiro para o presente, mas escolhe uma estrela no céu, e fica com ela pra toda a vida”. Jeannette Walls, O Castelo de Vidro.

Agradecimentos Especiais

À Doutora Mariana Gobbo Braz,

Meus agradecimentos pela orientação, apoio e paciência, sou grata pela oportunidade que me foi dada neste trabalho. Pesquisadora e professora engajada, sua busca pela perfeição e excelência na ciência serve de inspiração.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para sua própria produção ou a sua construção”

Paulo Freire

Agradecimentos Especiais

A todos os residentes, professores, técnicos e médicos da FMVZ,

Obrigada por terem aceitado fazer parte deste trabalho, apesar de tantas dificuldades encontradas ao decorrer do estudo, se mostraram dispostos a colaborar. Sem vocês este estudo não seria possível!

Muito obrigada a todos.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King Jr.

Agradecimentos

A Deus pela infinita bondade em iluminar meu caminho e por ter-me dado força e saúde mental para poder enfrentar este e tantos outros desafios trazidos pela vida.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo e, em particular:

Aos meus familiares, pelo amor e apoio na compreensão das ausências, incentivo e estímulo nos momentos em que pensei em desistir.

A minha prima Letícia e minha irmã Alessa por cuidarem tão bem da Naná nos dias em minha mãe não podia.

À minha orientadora Profa Dra Mariana Gobbo Braz, pela paciência e disponibilidade em ensinar.

A toda equipe do Laboratório GENOTOX, na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB (UNESP).

À Nayara Micarelli Arruda, obrigada por toda atenção, e ajuda.

A Aline Aun, Juliana Rodrigues Lara, Mariane Pereira, pela amizade, parceria e ajuda nos experimentos, sem vocês eu não conseguiria, era impossível sozinha e ainda é. Agradeço os conselhos frente aos inúmeros momentos de angústia.

À Kátina Meneghetti de Souza, pela ajuda nas coletas e recrutamentos. Obrigada pelas orações, sei quantas vezes orou por mim.

Ao Prof. Associado Leandro Gobbo Braz, que assim como a minha orientadora, me acolheu no Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da FMB-UNESP, disponibilizando seu tempo para me ensinar e ajudar sempre que necessário. Um exemplo de ser humano, professor e pesquisador com sua serenidade, educação e humildade.

A todos os funcionários da UNIPEX da FMB-UNESP que contribuíram para a realização deste projeto, especialmente à Vickeline Namba Androcioli, Paula Dória e Igor de Carvalho Deprá, pela assistência e disponibilidade no desenvolvimento dos protocolos.

A toda equipe do Laboratório OMICS, na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB (UNESP).

À Kamila Sauer, pela amizade e desabafos, nossas conversas sempre traziam alívio e conforto.

À Profa Dra Luciane Alarcão Dias Melicio e sua aluna Amanda Della Coletta do laboratório LIAI, na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB (UNESP), pela ajuda e disponibilidade em ensinar.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da FMB-UNESP por todo empenho em formar profissionais e pesquisadores de excelência.

À Tatiane de Fátima Pineiz Biondo, pela disponibilidade, paciência e simpatia em dar orientações nos processos pertencentes ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da FMB-UNESP. À Nelí Aparecida Pavan, funcionária da secretaria do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP, por toda ajuda na realização deste projeto.

À Profa Dra Marjorie de Assis Golim, do Laboratório de Citometria de Fluxo (Hemocentro do Hospital das Clínicas, FMB-UNESP) por toda sua

contribuição e experiência para este trabalho e a funcionária Aline Braz por toda sua disponibilidade nas padronizações do projeto.

À Profa Dra Lídia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu - IBB (UNESP), pela excelência e paciência nas instruções e na execução do processo de análise estatística.

Ao Prof. Associado Francisco Jose Teixeira Neto, pela ajuda no recrutamento dos residentes e por liberar nossa permanência nas salas cirúrgicas veterinárias.

À Dra Natache Arouca Garofalo, sua contribuição foi crucial para que este trabalho fosse realizado. Agradeço também as pós-graduandas pertencentes ao programa de Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Mariana Werneck, Nathalia Celeita Rodriguez, Tabata Larissa Dalmagro, Rubia Mitalli e Mayara Travalini de Lima, pelo incentivo, apoio e simpatia. E à Dra Luciane dos Reis Mesquita, sempre simpática e disposta a ajudar, grande responsável por atingirmos o número de voluntários que precisávamos, receba minha eterna gratidão.

A todos os docentes da Cirurgia de Pequenos e de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Campus de Botucatu, por permitir que permanecêssemos nas salas cirúrgicas veterinárias.

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2018/20900-0 e nº 2020/08455-0) pelo auxílio e bolsa de treinamento concedidos.

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem’.

Guimarães Rosa, O grande sertão: Veredas.

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos Especiais	iii
Agradecimentos	v
Epígrafe	viii
Resumo	x
Abstract	xii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xv
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 História da anestesiologia veterinária.....	16
1.2 Risco ambiental dos resíduos de gases anestésicos (RGA).....	18
1.3 Exposição ocupacional aos RGA.....	19
1.4 Anestésicos inalatórios, genotoxicidade e citotoxicidade.....	21
1.5 Impacto da exposição ocupacional aos RGA na toxicidade genética e celular.....	28
1.6 Justificativa do estudo.....	30
2 OBJETIVO	32
3 MÉTODO	33
3.1 Ética e delineamento do estudo.....	33
3.2 Mensuração das concentrações residuais de isoflurano nas SC.....	33
3.3 Coleta de amostras biológicas.....	34
3.4 Avaliação de genotoxicidade, indução de danos e reparo pelo teste do cometa.....	35
3.5 Avaliação de viabilidade, apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo.....	36
3.6 Avaliação de instabilidade genética, proliferação e morte celular pelo <i>BMCyt assay</i>	39
3.7 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS	43
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERÊNCIAS	68
ANEXO A - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	84
ANEXO B - Aprovação de Mudança de Título pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	85
ANEXO C - Projeto Aprovado pelo Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos.....	86
APÊNDICE A - Questionário Grupo Controle.....	87
APÊNDICE B - Questionário Grupo Exposto.....	101
APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Controle.....	119
APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Exposto.....	122

Resumo

Figueiredo DBS. **Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos ao resíduo de anestésico isoflurano que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário [Dissertação]**. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2020. 123 f.

Há escassez de dados científicos em relação aos possíveis efeitos tóxicos no material genético e em nível celular frente à exposição ocupacional aos resíduos do anestésico inalatório isoflurano em profissionais atuantes em salas cirúrgicas veterinárias (SCV). Assim, considerando a relevância do tema, o presente estudo objetivou, de forma inédita, monitorar a poluição anestésica em SCV e avaliar os impactos biológicos dessa exposição nos profissionais. Foram recrutados para o estudo do tipo transversal profissionais atuantes em SCV expostos no mínimo há um ano aos resíduos de isoflurano (grupo exposto) e indivíduos sem exposição ocupacional a anestésico (grupo controle), os quais foram pareados com o grupo exposto. Realizou-se a avaliação de danos basais no ácido desoxirribonucleico (DNA) e do sistema de reparo do DNA em células mononucleares pelo teste do cometa e, por citometria de fluxo, foram analisados viabilidade e processo apoptótico em células mononucleares bem como as fases do ciclo celular em mononucleares e polimorfonucleares. Concomitantemente, células esfoliadas orais foram coletadas para realização do *buccal micronucleus cytome assay* para identificação de marcadores de instabilidade genética (incluindo o micronúcleo - MN), proliferação e morte celular. As concentrações residuais de isoflurano foram mensuradas em SCV sem sistema de exaustão de gases por espectrofotômetro infravermelho portátil e a concentração média de isoflurano foi de 11 partes por milhão, excedendo em 5,5 vezes o limite de recomendação internacional. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos para os parâmetros avaliados do teste do cometa, exceto que os profissionais com menor faixa etária apresentaram maior nível de danos basais no DNA que os controles da mesma faixa etária, e em relação ao grupo exposto, os indivíduos mais jovens (com maior carga horária semanal) e indivíduos mais experientes com mais tempo (anos) de exposição apresentaram os maiores níveis de danos no DNA. Também não houve diferenças significativas entre os grupos em relação às análises de citometria de fluxo. Por outro lado, o grupo exposto apresentou maior frequência de MN, broto nuclear, células binucleadas, cariorrexe e cariólise, e menor frequência de células basais que o grupo controle. As mulheres expostas foram mais susceptíveis à instabilidade genética e

índice proliferativo enquanto que os homens expostos apresentaram mais alterações de citotoxicidade. Adicionalmente, o grupo exposto com faixa etária mais jovem apresentou maior frequência de MN tanto quando comparado com indivíduos com ≥ 31 anos de idade expostos por até cinco anos como comparado com indivíduos da mesma faixa etária expostos por ≥ 5 anos devido a maior carga horária semanal, portanto com maior exposição residual ao isoflurano. Concluindo, a alta exposição ao isoflurano está associada aos danos no material genético, processo citotóxico e alteração proliferativa na mucosa bucal, mas não altera o sistema de reparo do DNA, o ciclo celular e a frequência de apoptose, quando avaliados em células do sangue periférico. Assim, é necessário mitigar a poluição anestésica no ambiente de trabalho para reduzir a exposição ocupacional em profissionais atuantes em SCV com o intuito de se minimizar o impacto da toxicidade anestésica.

Palavras-chave: exposição ocupacional, anestésico inalatório, genotoxicidade, instabilidade genômica, apoptose.

Abstract

Figueiredo DBS. **Evaluation of genetic instability and cytotoxicity in professionals who work in veterinary surgical center and are exposed to isoflurane anesthetic [Master]**. Botucatu: Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP; 2020. 123 p.

Scarce literature is found about possible toxic effects on genome and cell concerning the occupational exposure to waste anesthetic isoflurane in professionals who work in veterinary operating room (VOR). Because of the relevance of this issue, this is the first study to monitor anesthetic pollution in VOR and assess the biological impact of this exposure on professionals. This cross-sectional study recruited professionals who have been exposed for at least one year to waste anesthetic gas isoflurane (exposed group) and subjects without occupational exposure to anesthetics (control group), who were matched with the exposed group. We evaluated basal deoxyribonucleic acid (DNA) damage and DNA repair system in mononuclear cells by the comet assay, and by flow cytometry, viability and apoptosis were assessed in mononuclear cells and cycle cell phases were detected in both mononuclear and polymorphonuclear cells. Concomitantly, oral exfoliated cells were collected to evaluate the buccal micronucleus cytome assay to detect markers of genetic instability (including micronucleus - MN), cell proliferation and cell death. Concentrations of waste isoflurane were measured in the VOR lacking scavenging system to assess anesthetic pollution by infrared spectrophotometry, and the mean concentration was 11 parts per million, which is 5.5 times higher than the international recommended threshold. There were no significant differences between groups for comet assay parameters, with the exception that younger exposed professionals presented higher basal DNA damage than the matched controls; regarding the exposed group, the younger professionals (with higher week workload) and older professionals with greater time of exposure (years) showed the highest DNA damage levels. No significant differences were also found to analyses obtained by flow cytometry. Differently, the exposed group had higher frequency of MN, nuclear bud, binucleated cells, karyorrhexis and karyolysis, and lower frequency of basal cells than the control group. The exposed women were more vulnerable to genetic instability and proliferative index while the exposed men presented more cytotoxicity. Additionally, the exposed group with lower age range had a higher frequency of MN when compared with both older professionals (≥ 31 years) exposed for up to five years and professionals with the same age range exposed for ≥ 5 years; this

might be explained due to higher week workload, therefore they were more exposed to isoflurane. In conclusion, the high exposure to isoflurane is associated with DNA damage, apoptosis and proliferative changes in buccal cells, but does not impair the DNA repair capability, cell cycle or apoptosis rate when analyzed in peripheral blood cells. The findings highlight the need to mitigate anesthetic pollution in the work environment to reduce occupational exposure in professionals who work in VOR to minimize the impact of anesthetic toxicity.

Keywords: occupational exposure, inhalation anesthetics, genotoxicity, genomic instability, apoptosis.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do isoflurano.....	18
Figura 2. Representação das etapas do teste do cometa alcalino.....	22
Figura 3. Imagens representativas de nucleoides (A) sem danos e (B) com danos avaliados pelo teste do cometa.....	22
Figura 4. Esquema representativo da cavidade oral com os dois tipos celulares e diferentes parâmetros que podem ser analisados, com os possíveis mecanismos para sua origem, detectados pelo teste <i>BMCyt</i>	24
Figura 5. Representação de células viáveis, em apoptose precoce e em morte celular avançada por ligação à anexina V e 7-AAD.....	26
Figura 6. Fases do ciclo celular.....	27
Figura 7. Histograma que ilustra as diferentes fases do ciclo celular com o conteúdo de DNA. As populações G0/1, S e G2/M são representadas por picos. As porcentagens de células nas fases G1, S e G2/M são estimadas integrando as áreas sob os picos.....	28
Figura 8. Anel de mononucleares e polimorfonucleares obtidos após centrifugação por gradientes de separação.....	37
Figura 9. Identificação dos linfócitos $CD3^+$ e avaliação de viabilidade e citotoxicidade.....	38
Figura 10. Análises de ciclo celular realizadas por citometria de fluxo contendo (A) células mononucleares e (B) células polimorfonucleares com <i>gate</i> nos conteúdos de DNA, população celular de interesse e fases do ciclo celular em ambas as populações; G0/G1 = primeiro intervalo; S = fase de síntese; G2/M = segundo intervalo, mitose.....	39
Figura 11. Níveis de danos basais no DNA, danos induzidos no DNA por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e reparo do DNA em células de sangue periférico nos sexos feminino (Fem) e masculino (Masc) dos indivíduos do grupo controle (Contr) e do grupo exposto (Exp). Os resultados são expressos como $X \pm DP$; * $p < 0,05$: danos basais entre sexo masculino exposto e sexo feminino exposto.....	45

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição dos parâmetros analisados do <i>BM Cyt assay</i>	40
Tabela 2. Características da população estudada.....	43
Tabela 3. Avaliação dos danos no DNA (<i>tail intensity</i>) detectados pelo teste do cometa.....	44
Tabela 4. Avaliação de danos basais no DNA (<i>tail intensity</i> - %) nos dois grupos avaliados conforme a faixa etária.....	46
Tabela 5. Avaliação de danos basais no DNA (<i>tail intensity</i> - %) no grupo exposto quanto às variáveis idade e exposição em anos.....	46
Tabela 6. Avaliação de viabilidade e citotoxicidade linfocitária por citometria de fluxo.....	47
Tabela 7. Análise do ciclo celular nas populações de interesse em ambos os grupos estudados.....	47
Tabela 8. Frequência (‰) dos parâmetros em células esfoliadas bucais de ambos os grupos.....	49
Tabela 9. Frequência (‰) de danos no DNA e de células basais em esfoliado da mucosa bucal dos dois grupos.....	50
Tabela 10. Frequência (‰) de mortes celulares na mucosa bucal de ambos os grupos estudados conforme o sexo.....	51
Tabela 11. Frequência (‰) de todos os biomarcadores analisados em células esfoliadas orais de ambos os grupos conforme a idade.....	53
Tabela 12. Frequência (‰) de micronúcleos bucais no grupo exposto conforme anos de exposição.....	54
Tabela 13. Frequência (‰) de micronúcleos bucais no grupo exposto conforme anos de exposição e faixa etária.....	54
Tabela 14. Carga horária semanal de trabalho segundo faixa etária e anos de exposição.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 História da anestesiologia veterinária

A história da anestesiologia teve início com William Thomas Green Morton em 16 de outubro de 1846 quando demonstrou, pela primeira vez em público, a anestesia geral com éter (Carter & Story, 2013). Desde então os anestésicos inalatórios (AI) são utilizados em salas cirúrgicas (SC) por todo o mundo há mais de 150 anos. Durante este período os anestésicos mais antigos foram entrando em desuso, por apresentarem toxicidade orgânica, e novas substâncias foram surgindo na década de 1950, sendo os compostos orgânicos de flúor a base para o desenvolvimento de AI mais modernos. Atualmente, os AI halogenados isoflurano, sevoflurano e desflurano são amplamente utilizados na anestesiologia humana.

Em conjunto com os avanços no desenvolvimento da anestesiologia humana houve o desenvolvimento da anestesiologia veterinária. Existem escassos relatos sobre fármacos e técnicas sobre os procedimentos anestésicos em modelos animais até o século XIX (Carter & Story, 2013). Em 1800, Humphrey Davy descreveu o uso do gás anestésico óxido nitroso (N_2O) em porcos da Índia (Stevenson, 1963; Thurmon & Short, 2007). Um ano após a demonstração, com sucesso, da anestesia realizada por Morton, apareceram relatos do uso de éter em animais (Smithcors, 1957; Stevenson, 1963). Acredita-se que George Dadd foi o primeiro médico veterinário a utilizar o éter e o clorofórmio em procedimentos cirúrgicos (Carter & Story, 2013).

Devido aos efeitos colaterais, incluindo mortalidade, associados ao uso do éter e do clorofórmio na prática anestesiológica veterinária, começaram a surgir, no final do século XIX, relatos do uso de hidrato de cloral, um composto não inalatório, em cães, cavalos e bois e, mais adiante, começou-se a utilizar a cocaína como anestésico local em cirurgias oftalmológicas e em anestesia raquidiana e peridural em cães (Stevenson, 1963; Thurmon & Short, 2007).

Apesar da evolução na área da anestesiologia veterinária no século XIX, o uso de anestésicos em pacientes veterinários ainda era incomum e muitos veterinários nunca haviam realizado anestesia geral em cirurgias (Merillat, 1915). O avanço nesta área foi devido, especialmente, ao desenvolvimento da anestesiologia veterinária advinda de universidades da América do Norte e da Europa (Tranquilli & Grimm, 2015). Em 1941, John George Wright publicou o livro *Veterinary Anaesthesia*, que foi dedicado inteiramente à anestesiologia veterinária, o qual serviu como base para a difusão dessa

área do conhecimento em diversos países. Em 1943 descobriu-se a lidocaína, um anestésico local, e, a partir da década de 1950, o AI halogenado halotano começou a ser empregado na anestesiologia veterinária e posteriormente outros halogenados, mais modernos, foram introduzidos na prática veterinária (Spinosa *et al.*, 2011). Assim, o notório avanço da anestesiologia veterinária ocorreu nas últimas três décadas do século XX (Tranquilli & Grimm, 2015).

No Brasil, os primeiros relatos do uso rotineiro de AI na veterinária encetaram em 1946 (Massone, 2002). Considerou-se um marco para a anestesiologia veterinária brasileira quando foi criada, em 1975, a primeira disciplina de anestesiologia veterinária na Universidade Estadual Paulista – UNESP (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, câmpus de Botucatu). Nesta mesma Universidade, alguns anos depois, houve a criação do primeiro programa de residência em anestesiologia veterinária. Em 2003 houve o reconhecimento da anestesiologia veterinária como especialidade pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária. Atualmente, a anestesiologia veterinária continua a evoluir como ciência e especialidade, tendo como impulsionador os avanços tecnológicos e farmacêuticos (Tranquilli & Grimm, 2015).

Assim como na anestesiologia humana, os AI halogenados são amplamente utilizados para anestesia geral na anestesiologia veterinária por terem baixo custo e não necessitarem de bomba de infusão venosa (Carter & Story, 2013). Na anestesiologia veterinária, o halotano, o isoflurano e o sevoflurano são os AI mais utilizados, sendo o isoflurano o anestésico de maior preferência (Steffey *et al.*, 2015).

O isoflurano (Figura 1) passou a ser utilizado na prática clínica em 1980 nos EUA. Por ter baixa solubilidade sanguínea, acarreta rápida recuperação anestésica, além de ter biotransformação hepática menor ($\leq 0,2\%$) que o sevoflurano (3%) e o halotano (20%) (Safari *et al.*, 2014). Há demonstração de benefícios do uso do isoflurano em relação aos efeitos hemodinâmicos quando comparados a outros halogenados (Grubb *et al.*, 1999; Raisis *et al.*, 2000) e também acredita-se que o isoflurano seja o agente de manutenção anestésica mais seguro visto que apresenta menor taxa de mortalidade por parada cardiorrespiratória em animais jovens (principalmente em cavalos) e em pacientes de alto risco (com doença pré-existente) quando comparado com o halotano (Johnston *et al.*, 2004; Polis *et al.*, 2001).

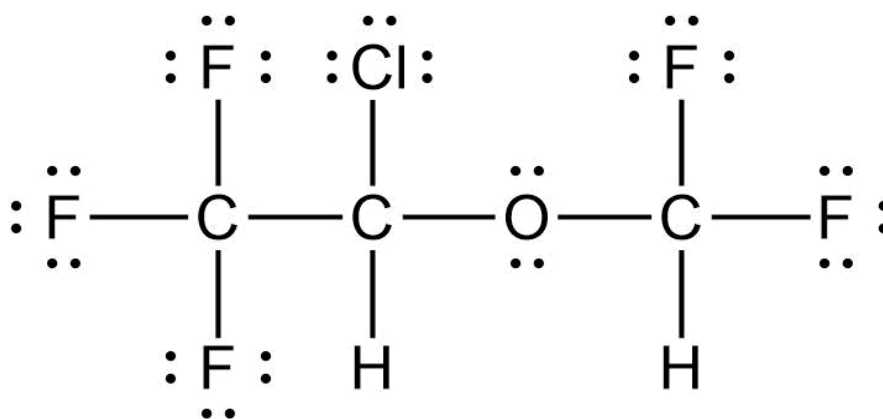


Figura 1. Estrutura química do isoflurano.

1.2 Risco ambiental dos resíduos de gases anestésicos (RGA)

Quando os AI halogenados são administrados, a contaminação do ar ambiente é inevitável (Hoerauf *et al.*, 1997). Deve-se notar que além da poluição nas SC, os resíduos de gases anestésicos (RGA) também são eliminados para a atmosfera. Pelo fato de conterem compostos halogenados que se assemelham aos clorofluorocarbonos, os RGA podem apresentar efeitos deletérios na camada de ozônio. Assim, eles são objeto de debate devido aos seus potenciais de efeito estufa e contribuições para destruição da camada de ozônio, o que contribui para as mudanças climáticas, as quais são apontadas como a maior ameaça à saúde pública da humanidade (Vollmer *et al.*, 2015).

Os danos ao meio ambiente advindos dos RGA dependem do seu peso molecular, da meia-vida na atmosfera e do potencial de aquecimento global (Ishizawa, 2011). Dessa forma, os AI comumente utilizados são gases de efeito estufa que possuem de centenas a milhares de vezes o impacto do aquecimento global comparado com o dióxido de carbono (CO₂) (Ryan & Nielsen, 2010). A meia-vida atmosférica do isoflurano é de 3,2 anos (maior que o sevoflurano e menor que o desflurano), porém esse anestésico tem potencial de aquecimento global superior ao sevoflurano e ao N₂O (Sulbaek Andersen *et al.*, 2010). Um estudo mostrou que o impacto climático médio por procedimento anestésico na Universidade de Michigan, nos EUA, é o mesmo que a emissão de 22 kg de CO₂ e estimou-se que as emissões anuais de RGA são equivalentes às emissões de CO₂ de uma usina de carvão (Sulbaek Andersen *et al.*, 2010).

De fato, o impacto dos AI é pequeno frente a outros poluidores, mesmo assim tem grande relevância se considerarmos o grande número de SC (humanas e veterinárias) existentes mundialmente. Em estudo multicêntrico, envolvendo hospitais universitários

dos EUA, Canadá e Reino Unido, os quais utilizavam os anestésicos isoflurano, sevoflurano e desflurano, relatou-se que as SC são fonte importante de emissão de gases de efeito estufa pois estimou-se emissão, nesses três países, de 9,7 milhões de toneladas de CO₂ por ano ou o equivalente a 2 milhões de veículos de passageiros (MacNeill *et al.*, 2017). Recentemente, diante do impacto do aquecimento global, autores britânicos têm destacado a oportunidade de os profissionais da área contribuírem com a sustentabilidade ambiental na anestesiologia veterinária (Jones & West, 2019).

Portanto, os anestésicos halogenados podem ser importantes alvos para mitigação do impacto ambiental; mudanças em seu uso rotineiro podem reduzir tanto a poluição interna (SC) como externa (meio ambiente), como por exemplo, a utilização de baixo fluxo de gases frescos (FGF) (Sherman & Berkow, 2019).

1.3 Exposição ocupacional aos RGA

Quando se utiliza AI, conseqüentemente diversos indivíduos são ocupacionalmente expostos aos RGA, especialmente os que atuam em centro cirúrgico, como os médicos e médicos veterinários anestesiológicos e cirurgiões, enfermeiros, técnicos, pessoal de limpeza, além de estudantes e residentes.

A presença dos RGA no ambiente cirúrgico se deve a três causas principais: sistema de exaustão das SC, técnicas anestésicas e equipamentos de anestesia empregados. A ausência de sistema de exaustão de gases/ar nas SC é um dos principais fatores que contribui para altas concentrações residuais anestésicas no ambiente de trabalho (Braz *et al.*, 2017; Yasny & White, 2012). De forma interessante, segundo um estudo publicado no início da década de 1990, no Reino Unido, já se relatava que as condições ventilatórias e de exaustão das SC veterinárias eram precárias e geralmente piores que as condições encontradas em centro cirúrgico humano (Gardner *et al.*, 1991). De fato, a exposição aos RGA é importante fator de risco para ocorrência de parto prematuro e aborto espontâneo em médicas veterinárias atuantes em SC sem sistema de exaustão (Shirangi *et al.*, 2008, 2009a,b). Ainda em relação aos efeitos reprodutivos, estudo conduzido em ratos expostos a altas concentrações de isoflurano mostrou diminuição significativa na produção de espermatozoides e danos testiculares (Xu *et al.*, 2012) e outro estudo mostrou que mulheres anestesiológicas e esposas de anestesiológicos têm maior risco de ocorrência de aborto que a população em geral (Nagella *et al.*, 2015).

Outros estudos também sugerem que a exposição aos RGA pode constituir riscos para a saúde dos profissionais expostos, incluindo aparecimento de cefaleia, náusea, sonolência e tontura (Epp & Waldner, 2012; Jeyaretnam *et al.*, 2000; OSHA, 2006). Profissionais expostos a diferentes AI demonstraram prejuízo no desempenho neurocomportamental (Lucchini *et al.*, 1996; Vouriot *et al.*, 2005). Hepatotoxicidade e nefrotoxicidade também foram associadas à exposição ocupacional aos RGA (Casale *et al.*, 2014; Neghab *et al.*, 2020; Safari *et al.*, 2014). Entretanto, a maioria desses estudos foi realizada em profissionais atuantes em SC humanas; assim, são limitados os estudos que se referem aos possíveis efeitos tóxicos em profissionais expostos aos RGA atuantes em SC veterinárias.

Dessa forma, para reduzir o impacto da exposição aos anestésicos na saúde dos profissionais, vários países estabeleceram seus próprios limites de exposição ocupacional aos AI (Molina Aragonés *et al.*, 2016). No Brasil, infelizmente, não há qualquer recomendação sobre os valores limites para exposição ocupacional aos RGA e o país carece de regulamentação da legislação trabalhista. O *National Institute of Occupational Safety and Health* dos EUA (NIOSH, 2007) recomenda o limite de até 2 partes por milhão (ppm) para os anestésicos halogenados. O *American College of Veterinary Anesthesiologists* (ACVA, 1996) publicou diretrizes e recomendações sobre o controle de RGA nas SC veterinárias como manutenção rotineira dos vaporizadores, atualização de procedimentos anestésicos que deveriam ser descontinuados na rotina cirúrgica, utilização de sistemas de eliminação de gases e instalação, nas SC, de sistema de ventilação/exaustão de gases sem recirculação de ar com 15 a 21 trocas de ar por hora.

Estudos realizados em SC veterinárias de países desenvolvidos, na década de 1990, mostraram que as concentrações residuais de isoflurano, halotano e N₂O excederam o limite máximo em 30% a 50% das medições (Gardner *et al.*, 1991; Korczynski, 1999). Segundo um estudo português, as concentrações residuais médias de isoflurano encontradas em SC com exaustão de gases foram menores que 2 ppm enquanto que na ausência de sistema de exaustão de gases essas concentrações médias subiram para 5,8 ppm durante anestesia em cães (Macedo *et al.*, 2018). Já em estudo conduzido em animais de experimentação (roedores) anestesiados com isoflurano em laboratórios de pesquisa, observou-se baixas concentrações residuais anestésicas, uma vez que as condições das salas eram apropriadas conforme a regulamentação australiana, com boa ventilação e sistema efetivo de exaustão de gases (27 trocas de ar/hora com renovação de 100% do ar)

em adição à utilização de modernos equipamentos de anestesia, acarretando mínima exposição ocupacional aos anestésicos (Johnstone *et al.*, 2017).

Traçando um paralelo com centro cirúrgico humano, nosso grupo de pesquisa mostrou, de forma inédita em hospital público universitário brasileiro, que as concentrações residuais de isoflurano excederam o limite internacional recomendado (NIOSH) durante anestesia em SC com sistema de fluxo turbulento que produzia sete trocas de ar por hora, com recirculação, mesmo utilizando modernos equipamentos de anestesia e baixo FGF (Braz *et al.*, 2017).

Considerando-se as condições das SC veterinárias, especialmente as de países em desenvolvimento/subdesenvolvidos, as quais geralmente não possuem sistema de exaustão eficiente, e pela ausência de estudo brasileiro que tenha avaliado o nível de exposição ocupacional aos RGA em profissionais atuantes em centro cirúrgico veterinário, destaca-se a importância e a originalidade em se conhecer a exposição aos RGA e seus possíveis efeitos deletérios em profissionais ocupacionalmente expostos.

1.4 Anestésicos inalatórios, genotoxicidade e citotoxicidade

Biomarcadores genéticos têm sido empregados para a monitorização da exposição a agentes genotóxicos e/ou mutagênicos com potencial efeito carcinogênico (Norppa, 2004). Assim, com a evolução de ferramentas e marcadores genéticos e celulares de toxicidade, há a possibilidade de melhor compreensão dos possíveis efeitos tóxicos/deletérios dos AI.

A genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético. Quando estas alterações passam a ser permanentes e transmissíveis, utiliza-se o termo mutagenicidade, assim, todo agente mutagênico é genotóxico (Sasaki *et al.*, 2000). Durante a mitose nas células somáticas, as mutações decorrentes são capazes de se propagar pelo organismo levando a consequências como a morte celular, formação de tumores e envelhecimento (Düsman *et al.*, 2012).

O teste do cometa detecta quebras de fita simples e dupla do ácido desoxirribonucleico (DNA), sítios álcali-lábeis além do sistema de reparo do DNA; é método sensível e de baixo custo, sendo importante ferramenta de avaliação de genotoxicidade (Collins *et al.*, 2008). A metodologia consiste em imersão de células eucarióticas em gel de agarose, lise da membrana celular e eletroforese (Figura 2), na qual os nucleoides que apresentarem danos no DNA terão migração da molécula em direção ao ânodo, imitando a aparência de um cometa (cabeça e cauda) (Figura 3). Trata-se de

um teste de *screening*, considerado o método de escolha para identificação de lesões no DNA, principalmente em estudos epidemiológicos de populações submetidas a diferentes exposições ocupacionais (Azqueta *et al.*, 2020; Vodicka *et al.*, 1995).

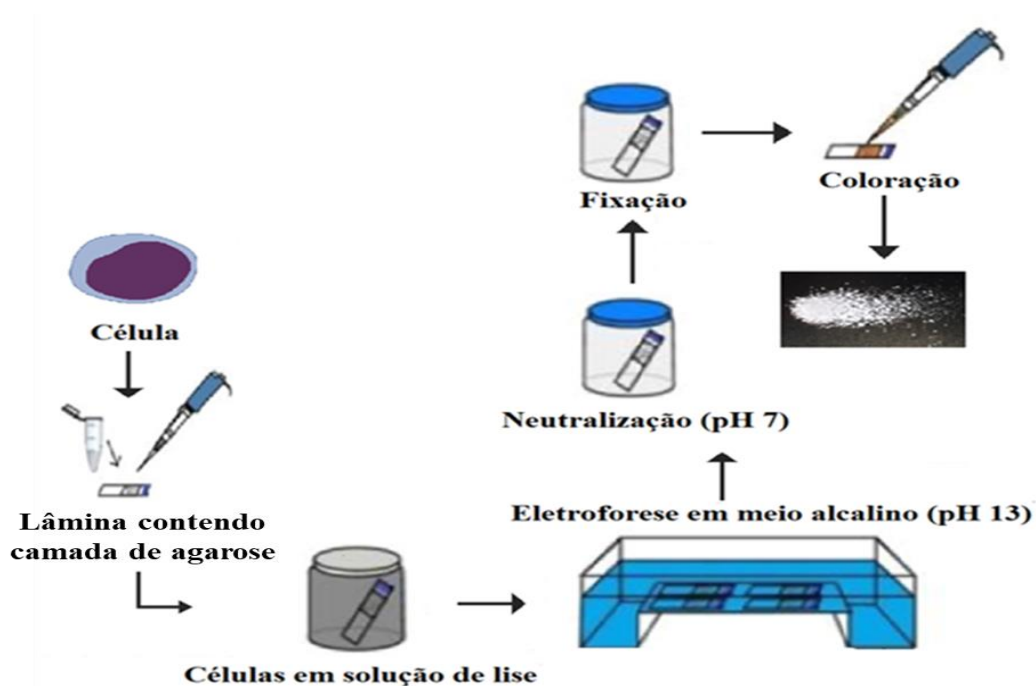


Figura 2. Representação das etapas do teste do cometa alcalino.

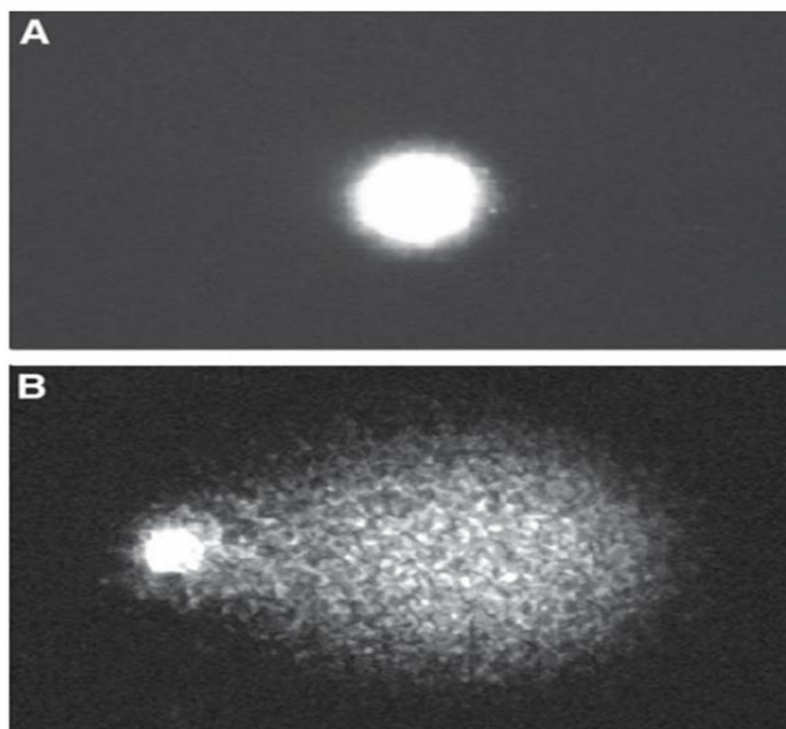


Figura 3. Imagens representativas de nucleoides (A) sem danos e (B) com danos avaliados pelo teste do cometa. Fonte: Speit & Hartmann (2005).

Há controvérsias sobre o possível potencial genotóxico dos AI halogenados, quando estudados *in vitro* ou em modelo animal. Utilizando o teste do cometa, linfócitos humanos foram expostos a diferentes concentrações (de 0,1 a 1 mM) de isoflurano e halotano; somente na maior concentração o isoflurano induziu danos no material genético enquanto o halotano foi capaz de induzir danos já na menor concentração testada (Jaloszyński *et al.*, 1999). Por outro lado, o isoflurano (0,1 mM a 100 mM), de forma semelhante ao sevoflurano, foi capaz de induzir danos no DNA tanto de linfócitos como de células espermáticas (Kaymak *et al.*, 2012). Um estudo conduzido em ratos *Wistar* mostrou que o sevoflurano, mas não o isoflurano, foi capaz de induzir danos no DNA, detectados pelo teste do cometa, em células de sangue periférico (Rocha *et al.*, 2015). Diferentemente, ratos *Sprague-Dawley* expostos ao isoflurano tiveram aumento de lesões no DNA, avaliadas pelo teste do cometa, em linfócitos e nos tecidos hepático e pulmonar de maneira dose dependente (Kim *et al.*, 2006). Tanto o isoflurano quanto o sevoflurano foram genotóxicos em células renais de camundongos suíços albinos, os quais foram expostos repetidamente aos anestésicos (Brozović *et al.*, 2017). Assim, os mecanismos pelos quais os AI podem induzir lesões no DNA não são completamente conhecidos, mas sugere-se que esses compostos possam ser genotóxicos por reagirem diretamente com a molécula do DNA ou pela formação de metabólitos reativos (Jaloszyński *et al.*, 1999).

Os micronúcleos (MN) são formados durante a divisão celular, sendo resultantes de fragmentos dos cromossomos ou cromossomos inteiros ou mesmo de dano no aparelho mitótico; assim, representam perda de cromatina (Salvadori *et al.*, 2003). Alguns estudos têm evidenciado que a frequência de MN pode estar associada ao desenvolvimento de câncer (Bonassi *et al.*, 2005; Fenech, 2002). Segundo Bonassi *et al.* (2007), há correlação positiva entre a frequência de MN e o aumento do risco relativo de ocorrência de neoplasias malignas principalmente do sistema urogenital (bexiga e rim) além do trato gastrointestinal, apesar de mais estudos serem necessários para validar o MN como marcador de risco para câncer.

Além de detectar instabilidade genética, com o teste do MN também é possível avaliar citotoxicidade pelos índices mitótico e de proliferação em diferentes tipos celulares (ICH, 1997). Assim, a principal metodologia utilizada atualmente para verificação de mutagenicidade e instabilidade genômica em seres humanos é a do MN, o qual pode ser detectado tanto em linfócitos periféricos como em células esfoliadas. De fato, verificou-se correlação positiva entre a frequência de MN em linfócitos e células esfoliadas da mucosa bucal (Ceppi *et al.*, 2010). O teste *Buccal Micronucleus Cytome*

(*BMCyt*) tem sido amplamente difundido na última década por estudos de biomonitoramento humano (Bolognesi *et al.*, 2015; Bonassi *et al.*, 2011) por apresentar diversas vantagens, como ser pouco invasivo, ter rápida preparação sem necessitar de cultivo celular, além de ser versátil, já que diversos parâmetros podem ser analisados, incluindo danos no DNA, diferenciação/proliferação celular e morte celular (Figura 4).

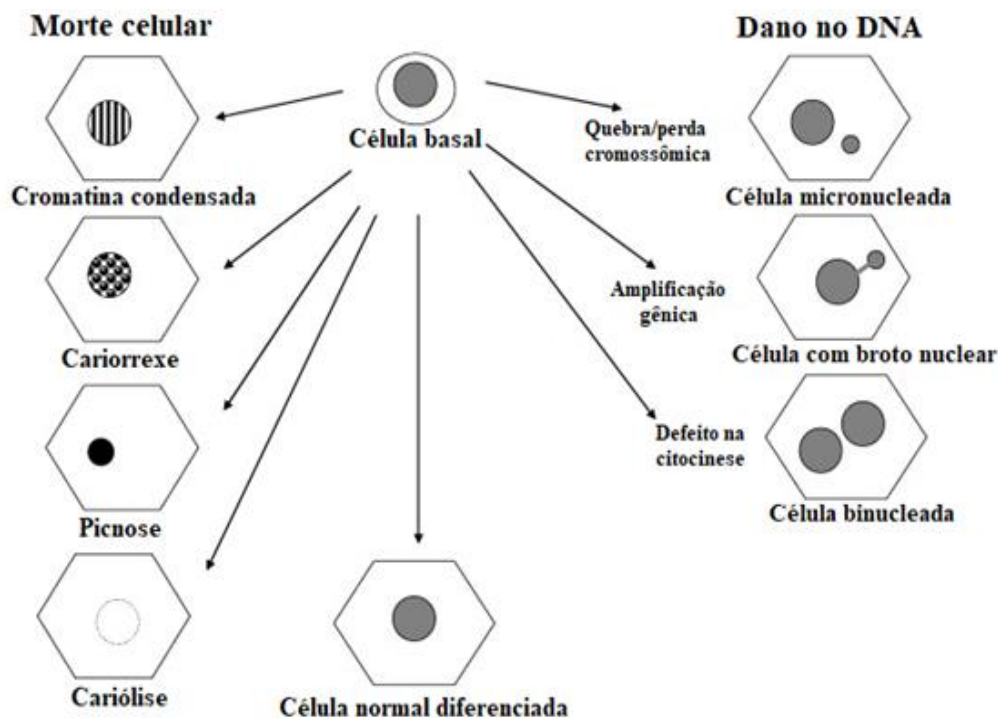


Figura 4. Esquema representativo da cavidade oral com os dois tipos celulares e diferentes parâmetros que podem ser analisados, com os possíveis mecanismos para sua origem, detectados pelo teste *BMCyt*. Fonte: adaptada de Holland *et al.* (2008).

Trabalhos *in vitro* e *in vivo* reportando mutagenicidade por AI são escassos. Efeito mutagênico foi observado quando o halotano, mas não o isoflurano, foi exposto por uma hora em moscas de fruta (*Drosophila melanogaster*) (Kundomal & Baden, 1985). Camundongos machos albinos expostos ao sevoflurano por duas horas por dia, por três dias, apresentaram frequência aumentada de MN em reticulócitos periféricos (Brozović *et al.*, 2010). Halotano, sevoflurano e isoflurano apresentaram efeito clastogênico ao formarem MN em células renais de ratos *Sprague-Dawley*, os quais receberam dose oral única de anestésico (Robbiano *et al.*, 1998).

O acúmulo de danos no material genético pode ser reparado; caso isso não ocorra, estas lesões podem ser fixadas, acarretando em mutações, morte celular ou neoplasias

(Anazetti & Melo, 2007). A apoptose é o contrapeso biológico à mitose na regulação celular e é a forma mais comum de morte celular programada; trata-se de processo complexo que pode ser induzido por vários fatores e que desempenha papel importante em processos como inflamação, tolerância imunológica e hematopoiese (Henry *et al.*, 2013; Tyther *et al.*, 2002).

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular desenvolvida na década de 1970, que mede de maneira simultânea múltiplas características físicas, químicas e biológicas de células em suspensão, marcadas com anticorpos monoclonais específicos, que se ligam a fluorocromos permitindo a identificação e quantificação por tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (Faldyna *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 1999). A viabilidade/citotoxicidade celular detectada utilizando o marcador anexina V (marcada com *Fluorescein IsoThioCyanate - FITC*) é uma das ferramentas mais sensíveis e amplamente utilizadas para detectar e distinguir entre apoptose precoce e morte avançada. A fosfatidilserina (fosfolípido de membrana) está ubiquamente presente na membrana de células procariontes e eucariontes; em células viáveis a fosfatidilserina permanece na camada interna da membrana celular; já em células em início de processo apoptótico (apoptose precoce), a membrana celular ainda permanece intacta, mas sofre desorganização e a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada (Vance & Steenbergen, 2005). Portanto, a anexina V é uma proteína que se liga a superfície dos fosfolípidos de carga negativa e dependente de cálcio (Ca^{2+}) (Brumatti *et al.*, 2008).

Dentre os marcadores nucleares e os corantes fluorescentes geralmente utilizados para análise e quantificação de apoptose pela citometria de fluxo destaca-se o *7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)*. Trata-se de um corante vital intercalante de DNA; enquanto a célula estiver com a membrana íntegra, o *7-AAD* não pode se ligar e/ou intercalar ao DNA; no entanto, quando a integridade da membrana é perdida, o *7-AAD* passa a ter acesso ao DNA (Zimmermann & Meyer, 2011). Dessa forma, a avaliação com anexina V/*7-AAD* por citometria de fluxo permite a identificação celular em: 1) anexina V negativa e *7-AAD* negativo (células vivas/viáveis), 2) anexina V positiva e *7-AAD* negativo (células em apoptose precoce) e 3) anexina V positiva ou negativa e *7-AAD* positivo (morte celular avançada) (Figura 5).

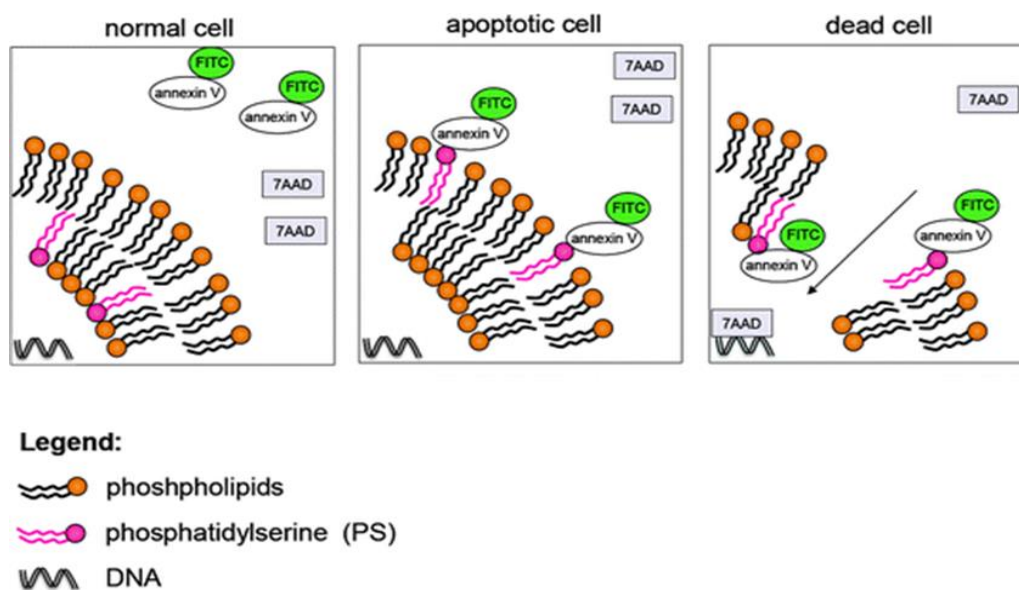


Figura 5. Representação de células viáveis, em apoptose precoce e em morte celular avançada por ligação à anexina V e 7-AAD. Fonte: Zimmermann & Meyer (2011).

Há evidência que os AI podem interferir no processo de citotoxicidade por apoptose, mas mais estudos na área são necessários para melhor entendimento. Já foram relatados que os AI podem causar alterações imunológicas, incluindo linfocitopenia. De fato, em estudo realizado *in vitro*, a exposição ao sevoflurano e ao isoflurano se mostrou citotóxica por aumentar a apoptose celular em linfócitos de maneira tanto dose como tempo dependentes (Matsuoka *et al.*, 2001). Em outro estudo, relatou-se indução de apoptose pela exposição ao sevoflurano e, em menor extensão pelo isoflurano, mas não pelo desflurano, em linfócitos T em cultura celular (Loop *et al.*, 2005). Sugere-se que o isoflurano possa induzir apoptose via ativação de receptores no inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) na membrana do retículo endoplasmático, produzindo liberação demasiada de Ca^{2+} (Wei *et al.*, 2008). Esse anestésico mostrou ser citotóxico por causar apoptose de neurônios e oligodendrócitos de macacos *Rhesus* expostos aos isoflurano por cinco horas, (Schenning *et al.*, 2017). Por outro lado, *in vitro*, o isoflurano se mostrou protetor em cardiomiócitos de ratos contra apoptose induzida por hipóxia, aumentando a expressão da proteína bcl-2, responsável pelo equilíbrio entre proliferação e morte celular programada (Jamnicki-Abegg *et al.*, 2005).

Em relação à vivacidade de uma célula, esta é ritmada pelo seu ciclo celular, no qual cada célula sofre alterações cíclicas que a conduzem à divisão celular. O ciclo celular (Figura 6) é dividido em quatro fases: G1 (G = *gap* = intervalo) - a célula cresce devido às sínteses proteicas; nesta fase as células estão sujeitas às influências externas sobre o

ciclo celular, principalmente durante a transição G1/S (S = síntese); na fase S ocorre a duplicação do DNA celular; a fase G2 representa a segunda fase de intervalo, no qual a célula tem maior crescimento e passa a produzir proteínas e organelas e se reorganiza preparando-se então para a fase M (M = mitose), a qual representa a divisão celular propriamente dita (Alberts *et al.*, 2002). A transmissão de informações genéticas de uma geração de célula para a próxima requer replicação do genoma durante a fase S e sua segregação para as duas novas células filhas durante a mitose ou a fase M. As fases S e M são eventos cruciais rigorosamente ordenados em um processo cíclico que permite a duplicação correta da célula sem o acúmulo de anormalidades genéticas. Assim, a citotoxicidade tem influência na cinética de divisão celular e nos sistemas controladores do ciclo celular.

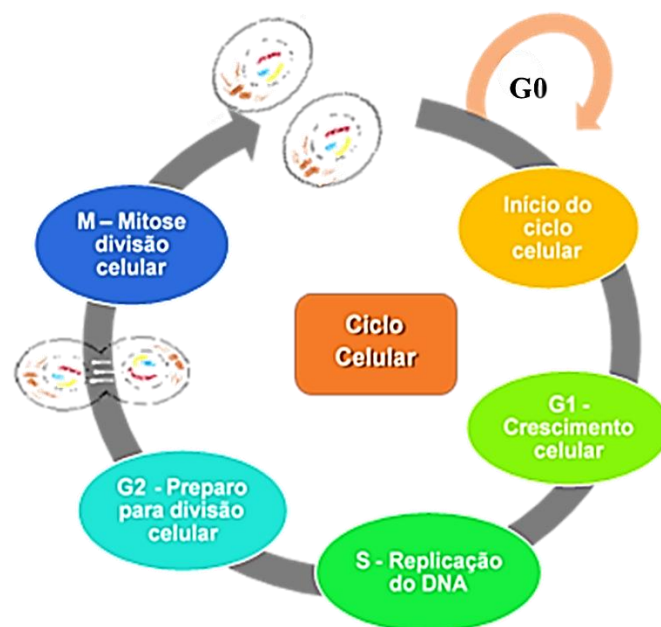


Figura 6. Fases do ciclo celular.

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo permite revelar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 7) e determinar a cinética da progressão dessas fases (Darzynkiewicz *et al.*, 2001). A avaliação do ciclo celular pela citometria pode ser realizada utilizando-se o corante fluorescente iodeto de propídeo (IP), o qual é o fluorocromo mais comumente usado devido à sua ótima capacidade de ligação ao DNA em uma variedade de diferentes tipos de células. O princípio da análise consiste no fato do conteúdo de DNA ser um marcador de maturidade celular (Henry *et al.*, 2013).

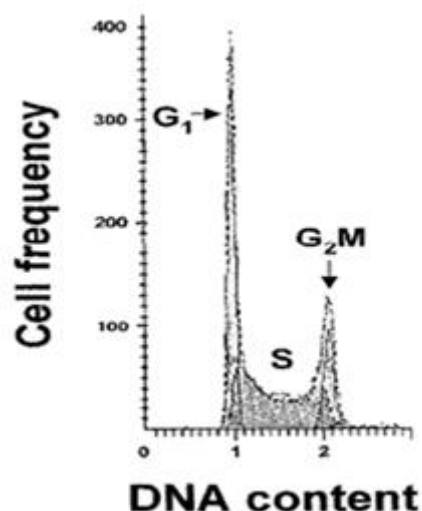


Figura 7. Histograma que ilustra as diferentes fases do ciclo celular com o conteúdo de DNA. As populações G0/1, S e G2/M são representadas por picos. As porcentagens de células nas fases G1, S e G2/M são estimadas integrando as áreas sob os picos. Fonte: Darzynkiewicz *et al.* (2001).

Chinelato & Froes (2002) sugeriram que o halotano, um AI halogenado, possa atuar de forma semelhante aos fármacos radiomiméticos, os quais induzem danos no genoma em qualquer fase do ciclo celular. O N₂O, mas não o sevoflurano, reduziu a proliferação de células mononucleares *in vitro* (Schneemilch *et al.*, 2005). Enquanto o isoflurano, *in vitro*, aumentou o potencial de malignidade de células ovarianas tumorais (Luo *et al.*, 2015), o sevoflurano foi capaz de induzir parada no ciclo celular e promover apoptose em células cancerígenas de ovário, mostrando atividade antitumoral (Zhang *et al.*, 2019). O sevoflurano também suprimiu a proliferação de células tumorais mamárias por parar o ciclo celular na fase G1 (Liu *et al.*, 2018).

Estudo recente demonstrou que camundongos recém-nascidos expostos ao isoflurano por seis horas contínuas resultou em aumento na expressão de marcadores relacionados ao ciclo celular, como a ciclina B1 (proteína responsável pela transição para fase G2/M), em amostras de cérebro (Huang *et al.*, 2019). O isoflurano também influenciou a proliferação celular de linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço, por aumentar a malignidade dessas células *in vitro* (Jun *et al.*, 2011).

1.5 Impacto da exposição ocupacional aos RGA na toxicidade genética e celular

Há algumas décadas tem se observado aumento no número dos trabalhos científicos em relação à exposição aos RGA e os possíveis efeitos no genoma dos

profissionais expostos, demonstrando uma preocupação no que se refere aos possíveis efeitos tóxicos frente à exposição ocupacional aos RGA, uma vez que milhões de profissionais têm exposição diária aos RGA em todo o mundo. Deste modo, estudos nesta área são relevantes e têm caráter multidisciplinar, envolvendo toxicologia, genética, anestesiologia e saúde pública.

Um trabalho esloveno mostrou, de forma interessante, que médicas anesthesiologistas expostas ao halotano, isoflurano e N₂O tiveram maior frequência de danos citogenéticos, tais como MN, aberrações cromossômicas (AC) e troca entre cromátides irmãs (TCI), quando comparadas com tecnólogas em radiologia e com voluntárias não expostas aos RGA (Bilban *et al.*, 2005). Já estudo realizado por Wiesner *et al.* (2001) não demonstrou aumento significativo na frequência de MN linfocitário em anesthesiologistas e enfermeiros alemães expostos a baixas concentrações residuais dos halogenados isoflurano, sevoflurano e desflurano além do N₂O. Entretanto, os mesmos autores observaram aumento na frequência de MN em profissionais expostos às concentrações elevadas desses halogenados e de N₂O, demonstrando que quanto maior a poluição anestésica e conseqüentemente a exposição ocupacional, maior a chance de ocorrência de danos no genoma. Estudo iraniano observou frequência aumentada de AC e MN em linfócitos de profissionais (enfermeiros, técnicos e cirurgiões) expostos ocupacionalmente ao isoflurano, sevoflurano e N₂O quando comparada a um grupo não exposto aos RGA (Kargar Shouroki *et al.*, 2019).

Há controvérsias na literatura quanto aos resultados de danos no DNA, detectados pelo teste do cometa, em profissionais que trabalham em SC humanas (Chandrasekhar *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2016; Szyfter *et al.*, 2016; Wrońska-Nofer *et al.*, 2009). Em estudo longitudinal não se observou, no primeiro ano de residência médica em anestesiologia e cirurgia, aumento de danos no material genético nos profissionais expostos a mistura de RGA (Aun *et al.*, 2018). Por outro lado, houve associação de indução de danos primários em médicos residentes expostos aos RGA quando comparados a um grupo não exposto (Costa Paes *et al.*, 2014). Observou-se, em estudo observacional transversal, associação entre alta exposição aos AI halogenados e N₂O e aumento de danos genéticos detectados pelo teste do cometa bem como indução de MN bucal em profissionais expostos por três anos a esses RGA (Braz *et al.*, 2018, 2020).

Pelo fato de médicos anesthesiologistas cronicamente expostos terem mostrado alterações em mucosa bucal (proliferação celular, citotoxicidade e instabilidade genética), sugere-se que a análise de *BM*Cyt deva ser utilizada para biomonitoramento de possíveis

efeitos tóxicos no material genético decorrentes da exposição ocupacional aos RGA em todos os profissionais expostos (Souza *et al.*, 2016). Este fato se torna mais relevante uma vez que ainda não se investigou biomarcadores genéticos e celulares detectados pelo teste do *BMCyt* em profissionais expostos aos RGA que atuam em SC veterinárias. De fato, em referência aos possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos em relação à prática veterinária, na literatura ao nosso alcance, há somente um estudo publicado no final da década de 1990 realizado em cirurgiões veterinários expostos ao isoflurano e N₂O, o qual demonstrou aumento na formação de TCI, mas não de MN nem de índice proliferativo ou mitótico, quando analisados em linfócitos periféricos (Hoerauf *et al.*, 1999), evidenciando a escassez de artigos em relação aos possíveis danos genéticos e celulares em profissionais expostos aos RGA em centro cirúrgico veterinário.

São escassos e divergentes os estudos científicos que investigaram a possível associação entre exposição ocupacional aos RGA e apoptose em leucócitos. Um estudo conduzido na Irlanda investigou a taxa de apoptose em neutrófilos, mantidos em cultura, de profissionais da saúde expostos cronicamente a baixas concentrações dos resíduos de N₂O, sevoflurano e isoflurano; os resultados mostraram que houve inibição de apoptose celular mantida em cultura por 24 horas, mas não por uma hora ou 12 horas, em comparação aos neutrófilos de voluntários não expostos (Goto *et al.*, 2000). Em estudo semelhante, contudo, observou-se, em 12 anestesiológicos expostos a mistura de RGA, em comparação com 12 voluntários não expostos, diminuição significativa somente de apoptose de neutrófilos cultivados por uma hora, mas não os cultivados por 12 horas ou 24 horas (Tyther *et al.*, 2002). Aun *et al.* (2018) não observaram, no primeiro ano de residência, citotoxicidade avaliada por apoptose precoce em células mononucleares de jovens médicos expostos a mistura de RGA. Por outro lado, tanto médicos no período de especialização bem como os cronicamente expostos a mistura de RGA apresentaram indícios de citotoxicidade avaliada em mucosa oral (Braz *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2016). Em nosso conhecimento, não há estudos na literatura em relação à exposição ocupacional aos RGA e avaliação de ciclo celular em leucócitos periféricos, demonstrando que a literatura carece de trabalhos sobre a temática.

1.6 Justificativa do estudo

Sempre houve a preocupação com os possíveis efeitos tóxicos de fármacos, incluindo os anestésicos. Uma vez que milhões de pessoas ao redor do mundo estão continuamente expostas ocupacionalmente aos RGA, é relevante e necessário entender o

impacto do resíduo de isoflurano em profissionais que atuam em centro cirúrgico veterinário. Considerando-se também a ausência de regulamentação da exposição ocupacional aos RGA em nosso país, é fundamental a avaliação dos possíveis riscos a que estão sujeitos os profissionais expostos, para conscientização e possíveis melhorias no ambiente de trabalho.

Nosso grupo de pesquisa tem avaliado os possíveis efeitos deletérios da exposição ocupacional aos RGA em profissionais que atuam em centro cirúrgico humano (Aun *et al.*, 2018; Braz *et al.*, 2018, 2020; Chaoul *et al.*, 2015; Costa Paes *et al.*, 2014; Lucio *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2016). Portanto, considerando a escassez de dados na literatura no que tange à temática da anestesiologia veterinária, este estudo foi pioneiro em mensurar o resíduo de isoflurano (e não uma mistura de RGA, como descrito na maioria dos artigos científicos) em ambiente de trabalho, contribuindo assim para conhecimento da exposição anestésica de profissionais atuantes em SC bem como avaliar marcadores de genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade, para melhor compreensão dos possíveis efeitos deletérios/tóxicos da exposição ocupacional ao RGA isoflurano, o halogenado mais utilizado na anestesiologia veterinária a fim de se contribuir para o avanço científico da área.

Assim, a hipótese do estudo é que, de forma semelhante aos profissionais que atuam em SC humanas, nas quais em sua maioria, no Brasil, são desprovidas de sistema de exaustão/eliminação de gases, os profissionais atuantes em SC veterinárias estão expostos a elevadas concentrações residuais anestésicas, com possibilidade de apresentarem instabilidade genética.

2 OBJETIVO

Frente à escassez de dados e considerando a relevância do tema, o presente estudo, de forma pioneira, teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos (genético e celular) frente à exposição ocupacional ao RGA isoflurano em profissionais atuantes em SC veterinárias.

3 MÉTODO

3.1 Ética e delineamento do estudo

O estudo do tipo observacional transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (nº 2.422.128; CAAE 79843317.8.0000.5411 - Anexo A e nº 4.107.984; CAAE 79843317.8.0000.5411 - Anexo B), seguido do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (RBR-3yb4b9 - Anexo C).

A pesquisa envolveu a participação de profissionais atuantes, há no mínimo um ano, no centro cirúrgico do Hospital Veterinário (HV) da FMVZ-UNESP, os quais foram expostos ocupacionalmente ao isoflurano, constituindo assim, o grupo exposto. Para o grupo controle, voluntários sem exposição ocupacional (prévia ou presente) aos RGA ou outros químicos (pesticidas, solventes, etc) foram recrutados, sendo pareados por sexo e idade com o grupo exposto. Os participantes de ambos os grupos responderam a um questionário detalhado (Apêndices A e B) com dados demográficos, histórico médico e estilo de vida. Também foram obtidas as assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos participantes aptos a participarem do estudo em ambos os grupos (Apêndices C e D). Não foram incluídos no estudo os portadores de doença maligna, doenças infecciosas ou inflamatórias, as gestantes, os que faziam uso pesado de álcool (acima de nove doses semanais para mulheres e acima de 14 doses semanais para homem, sem episódios de embriaguez ou acima de 30 gramas de álcool por dia; NIAAA, 2015; WHO, 2018), os que utilizavam “drogas ilícitas” e medicamentos e os que faziam uso de suplementação vitamínica, para evitar possíveis vieses.

3.2 Mensuração das concentrações residuais de isoflurano nas SC

O centro cirúrgico do HV tem SC sem sistema de exaustão de gases para realização de procedimento anestésico-cirúrgico para pequenos animais (48 a 70 m³) e grandes animais (340 a 360 m³). Para realização das mensurações residuais das concentrações ambientais de isoflurano em seis SC (sendo quatro para pequenos animais e duas para grandes animais, sendo estas últimas utilizadas com pouca frequência durante a pesquisa), utilizou-se o analisador portátil *InfraRan 2 Four Gas Anesthetic Specific Vapor Analyzer* (Wilks - A Spectro Scientific Co., Inc., Norwalk, EUA), o qual detecta, em tempo real, concentrações anestésicas por infravermelho com limite de detecção para o isoflurano de zero a 50 ppm. O equipamento foi calibrado pela empresa anteriormente

e foi zerado com filtro de carvão antes de cada início de mensuração, conforme recomendação do manual de instrução. As concentrações residuais de isoflurano foram aferidas no ar, próximo à área de respiração dos profissionais expostos nas SC. As mensurações foram realizadas ao longo do dia (uma cirurgia no período da manhã e outra no período da tarde, quando existente), sendo que os animais foram induzidos com anestesia venosa e a manutenção anestésica foi sob isoflurano, após intubação orotraqueal com uso de tubo com balonete, com FGF de 1 a 3 L/min (fluxo baixo para pequenos animais e fluxo intermediário para grandes animais), de acordo com os procedimentos de rotina realizados no centro cirúrgico.

Os equipamentos de anestesia disponíveis nas SC foram: *Fabius Plus* da *Dräger* (vaporizador mais moderno, sendo o mais utilizado) e vaporizadores menos modernos como: *Conquest 5000* da HB Hospitalar, *Conquest 3000 Slim* da HB Hospitalar e *Fuji 2604* da *Takaoka* para as SC de pequenos animais e *CA 96002 Model 2800C* da *Mallard* para as SC de grandes animais. Para os modelos *Conquest*, utilizou-se o sistema aberto (ou circuito avalvular) em pacientes com peso menor que sete quilogramas (kg) e se utilizou o sistema semifechado (ou circuito circular valvular) nos animais com peso acima de 7 kg. Já para os equipamentos da *Dräger*, da *Takaoka* e da *Mallard* se utilizou apenas o sistema semifechado. Todos os tipos de cirurgias foram incluídos independentemente da especialidade, da espécie do animal e do peso, sendo a maioria das mensurações realizada em animais de estimação (especialmente cães). Após tabulação dos dados, realizou-se a média da poluição residual de isoflurano no ambiente de trabalho.

3.3 Coleta de amostras biológicas

As coletas de amostras de sangue periférico e células da mucosa oral dos participantes foram coletadas com oito horas de jejum, sempre no período da manhã às terças-feiras. Todas as amostras foram previamente codificadas, imediatamente transportadas ao Laboratório GENOTOX (Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEX, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP) e processadas sob luz amarela para evitar a possibilidade de danos adicionais ao DNA. Todas as etapas das metodologias foram realizadas sob ar condicionado e as análises foram realizadas de maneira cega.

Após prévia higienização (escovação e bochecho com água morna), as células esfoliadas bucais (coletadas de ambos os lados da bochecha) foram coletadas com auxílio de escova citológica estéril, sendo as células transferidas para tubos estéreis contendo 15 mL de solução salina (cloreto de sódio - NaCl) gelada. Concomitantemente, amostras de

sangue venoso foram colhidas em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (teste do cometa) ou anticoagulante heparina sódica (citometria de fluxo), sendo os experimentos realizados em células frescas.

3.4 Avaliação de genotoxicidade, indução de danos e reparo pelo teste do cometa

Imediatamente após a coleta de sangue, realizou-se o isolamento de células mononucleares (total de 5×10^5 células, sendo ~ 90% linfócitos) por gradiente de *Ficoll Paque Plus*[®] (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Seguiu-se com a realização do teste do cometa para avaliação de danos basais, danos induzidos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e sistema de reparo do DNA segundo protocolos descritos por Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (1991) com pequenas alterações (Braz & Fávero Salvadori, 2007), além das recomendações descritas por Brunborg & Collins (2020).

Para avaliação de danos basais no DNA, 10 μ L de linfócitos foram misturados com 120 μ L de agarose baixo ponto de fusão a 0,5% (previamente preparada), pipetados sobre lâminas de primeira camada de agarose (ponto de fusão normal a 1,5%), as quais foram cobertas com lamínula e colocadas, por 5 minutos, a 4°C. Após solidificação, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram mergulhadas em solução gelada de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de tris, potencial hidrogeniônico - pH de 10; 1% de triton-X e 10% de dimetilsulfóxido) permanecendo por duas horas em geladeira.

Em seguida, realizou-se a indução de danos no DNA com 100 μ M de H_2O_2 , sendo que as amostras permaneceram 5 minutos em gelo. Após essa etapa, prosseguiu-se com a confecção das lâminas, conforme descrito anteriormente. Para verificação do reparo, ou seja, avaliação da eficácia de reparo dos danos induzidos no DNA em células mononucleares anteriormente tratadas com H_2O_2 , acrescentou-se *phosphate-buffered saline* (PBS) para lavagem das células e em seguida as células foram centrifugadas a 2.000 rotações por minuto (rpm) por 4 minutos e esta etapa foi novamente repetida. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram ressuspensas e incubadas em estufa de cultura a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, realizou-se a confecção das lâminas do mesmo modo anteriormente descrito.

Após período de lise, as lâminas (basal, H_2O_2 e reparo) foram transferidas para cubas horizontais preenchidas com solução de eletroforese gelada e recém preparada (1 mM de EDTA, 300 mM de hidróxido de sódio [NaOH] em pH > 13), por 20 minutos. Após eletroforese realizada a 0,8 volts/centímetro, 7 watts e 300 miliamperes, por 20

minutos, as lâminas foram neutralizadas (0,4 M de tris em pH 7,5) por 15 minutos, e em seguida fixadas em etanol absoluto e colocadas em tabuleiro para secagem à temperatura ambiente. Tanto lâminas com controle positivo (*pool* de células tratadas com H₂O₂ a 100 µM por 30 minutos) quanto com controle negativo (*pool* de células congeladas) foram utilizadas em todas as corridas eletroforéticas. As lâminas foram então armazenadas em laminários, em geladeira, até o momento da coloração (80 µL *SYBR Gold - Invitrogen*TM, Ohio, EUA) e análise (total de 300 nucleoides analisados por indivíduo, sendo 50 nucleoides por lâmina em duplicata/avaliação por indivíduo) em microscópio de fluorescência acoplado ao sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV - Perceptive Instruments*, Haverhill, Reino Unido) em aumento de 400 x. Após análise das lâminas realizou-se a tabulação dos dados e obteve-se a mediana de cada parâmetro para cada tratamento/indivíduo. O parâmetro utilizado para a avaliação de danos no DNA foi o *tail intensity* (porcentagem da extensão de danos na cauda).

3.5 Avaliação de viabilidade, apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo

Células polimorfonucleares e mononucleares foram obtidas utilizando-se dois gradientes de separação, o *Polymorphprep*TM (*Axis-Shield Poc*, Oslo, Noruega) - gradiente 1113 e o gradiente 1077 - *Ficoll Paque Plus*[®] (*GE Healthcare*, Uppsala, Suécia), respectivamente, seguindo protocolo de Ferrante & Thong (1980), com modificações.

Os gradientes foram adicionados lentamente em tubo cônico de 50 mL, sendo 4,5 mL do gradiente 1113 e 4 mL de gradiente 1077. Posteriormente foi acrescido, vagarosamente pela parede do tubo cônico, volume de 6 mL de sangue; o tubo foi centrifugado por 40 minutos a 3.500 rpm a 23°C. Após centrifugação, dois anéis foram observados sendo o primeiro composto por células mononucleares e o segundo anel composto por polimorfonucleares (Figura 8). Os anéis foram coletados separadamente e depositados em tubos cônicos contendo 10 mL de *PBS*, os quais foram homogeneizados e centrifugados por 15 minutos a 1.500 rpm (20°C). Após descarte do sobrenadante, 3 mL de NaCl 1% gelado foram acrescidos às amostras e os tubos foram homogeneizados por 30 segundos para lise das hemácias. Em seguida, 3 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)* foram acrescentados ao tubo, que foi homogeneizado. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm a 20°C, sendo esta etapa de lise das hemácias repetida por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi vertido e ressuspenso em 1 mL de *RPMI-1640* contendo 10% de soro

fetal bovino, permanecendo os polimorfonucleares em estufa (37°C) até o momento da marcação do ciclo celular.

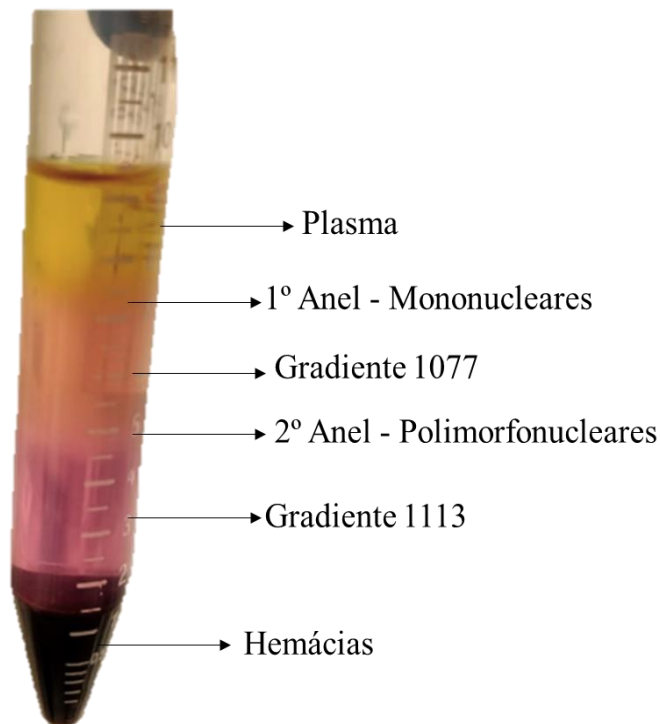


Figura 8. Anel de mononucleares e polimorfonucleares obtidos após centrifugação por gradientes de separação. Fonte: arquivo pessoal.

Imediatamente após o isolamento, seguindo recomendações do fabricante, as amostras de células mononucleares foram marcadas com o *cluster of differentiation 3-phycoerythrin - CD3-PE* (BD Pharmingen, New Jersey, EUA) por 15 minutos em ambiente escuro (linfócitos T). Posteriormente, as células foram lavadas com *PBS* sendo os tubos centrifugados por 5 minutos a 1.600 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado.

Para distinguir células viáveis, em apoptose precoce e morte celular tardia ou avançada utilizou-se o *Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen, New Jersey, EUA). Assim, as amostras foram ressuspensas em 250 μL de tampão de anexina. A marcação com 1 μL de *annexin-V-FITC* e 2,5 μL de *7-AAD-PerCP* foi feita em 125 μL (5×10^5 células/mL) de amostra. As amostras foram então incubadas por 15 minutos no escuro. Em seguida, acrescentou-se volume de 400 μL de tampão de anexina e as amostras foram colocadas no citômetro de fluxo *FACSCalibur-BD*[®] (San Jose, EUA), no qual foram adquiridos 30.000 eventos por amostra, delineando estratégia de *gate* para caracterizar a população linfocitária. As aquisições de células viáveis (*anexina⁻/7-AAD⁻*),

em apoptose precoce (anexina⁺/7-AAD⁻) e morte celular tardia/avançada (anexina⁺ ou anexina⁻/7-AAD⁺) foram feitas e as análises (Figura 9), realizadas pelo *software CellQuestPro™*, foram baseadas nos limiares de negatividade obtidos pelos controles autofluorescentes.

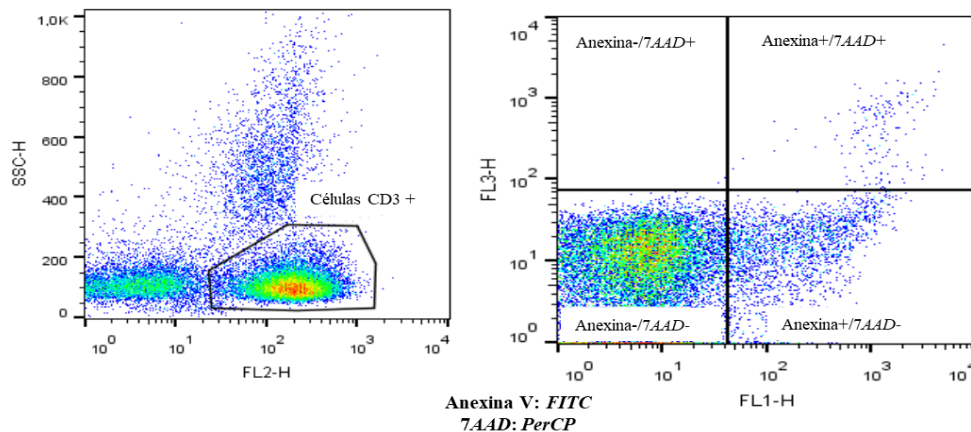


Figura 9. Identificação dos linfócitos CD3⁺ e avaliação de viabilidade e citotoxicidade. Fonte: arquivo pessoal.

Para o ciclo celular utilizou-se o *kit BD Cycletest™ Plus DNA* (San Jose, EUA) e foram seguidas as recomendações do fabricante. Após o isolamento das células mononucleares e polimorfonucleares, a concentração celular foi ajustada para 5x10⁵ células/mL com *PBS*. Adicionou-se às amostras volume de 200 µL de solução C gelada do *kit* (IP que se liga estequiometricamente ao DNA mais tetrahidrocloro de espermina ([C₁₀H₂₆N₄HCl] – poliamina envolvida no metabolismo celular e na estabilização do DNA). As amostras foram então homogeneizadas e incubadas (10 minutos em ambiente escuro a 4°C), sendo imediatamente adquiridos, no citômetro de fluxo, 20.000 eventos nas populações de interesse, baseando-se em parâmetros de tamanho *versus* granulosidade e procedeu-se à análise do ciclo celular (Figura 10).

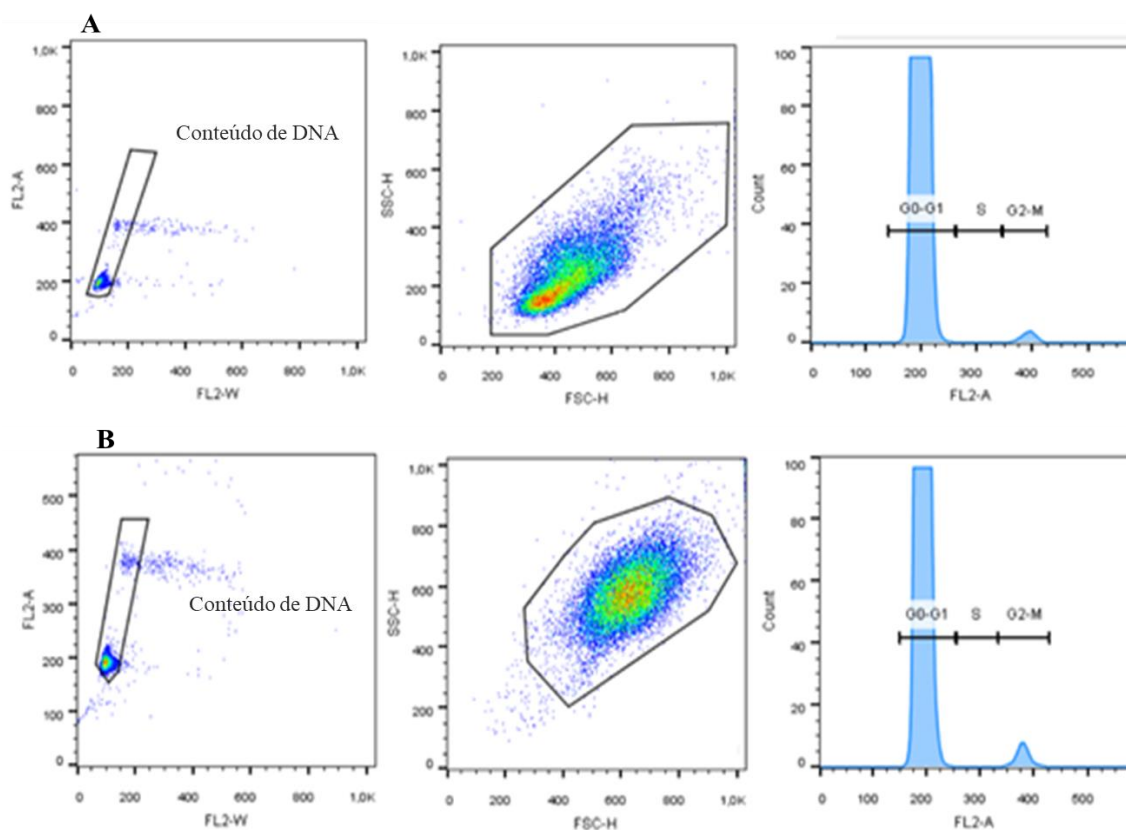


Figura 10. Análises de ciclo celular realizadas por citometria de fluxo contendo (A) células mononucleares e (B) células polimorfonucleares com *gate* nos conteúdos de DNA, população celular de interesse e fases do ciclo celular em ambas as populações; G0/G1 = primeiro intervalo; S = fase de síntese; G2/M = segundo intervalo, mitose. Fonte: arquivo pessoal.



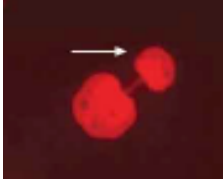


3.6 Avaliação de instabilidade genética, proliferação e morte celular pelo *BM*Cyt assay

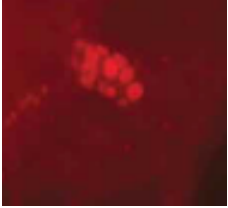
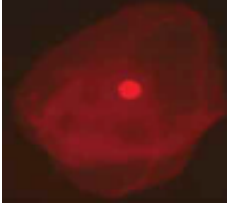

Foram seguidos os protocolos descritos por Souza *et al.* (2016) e Tolbert *et al.* (1992), com pequenas modificações, para a condução dos experimentos do *BM*Cyt assay. Os tubos contendo as células bucais foram centrifugados a 1.000 rpm por 5 minutos e as células foram fixadas com 5 mL de metanol/ácido acético, na proporção de 3:1. Esta etapa foi repetida mais duas vezes, e as amostras foram então gotejadas a uma distância de 15 centímetros em lâminas limpas em duplicatas/participante, secando em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M, previamente aquecida a 60°C, por 12 minutos, foram lavadas e em seguida foram coradas pelo método de *Feulgen/Fast-Green* (lâminas mergulhadas em

reativo de *Schiff* por 90 minutos; lavagem em água destilada por 10 minutos; secagem; e contra coloração com *Fast Green* 3% gelado - diluído em etanol, por 20 segundos).

As análises foram realizadas em microscópio óptico (*Olympus* modelo BX43, Tóquio, Japão), no aumento de 1.000 x com óleo de imersão, por um único avaliador, sendo os parâmetros confirmados por fluorescência com IP (cubo U-3N41005), quando necessário. Realizou-se a análise de 1.000 células por indivíduo para identificação de células basais, e binucleadas; cromatina condensada, cariorrexe, picnose e cariólise. Para MN e broto nuclear, 2.000 células diferenciadas foram analisadas por participante. As definições e características dos parâmetros analisados são apresentadas na Tabela 1 (Thomas *et al.*, 2009).

Tabela 1. Descrição dos parâmetros analisados do *BMCyt assay*.

Tipo celular/parâmetro	Característica
<i>Célula basal</i>	 <p>A célula é menor e mais oval quando comparada à célula diferenciada; possui um núcleo corado uniformemente e tem razão núcleo-citoplasma maior que as células bucais diferenciadas</p>
<i>Célula micronucleada</i>	 <p>Célula com um ou mais micronúcleos, os quais têm a mesma forma do núcleo principal, porém com 1/3 a 1/6 do tamanho do núcleo principal, sem ligação com este</p>
<i>Célula com broto nuclear</i>	 <p>A célula apresenta estreita constrição nítida como parte da eliminação do material nuclear principal originando o broto. O núcleo e o broto estão ligados um ao outro</p>
<i>Célula binucleada</i>	 <p>A célula possui dois núcleos principais de tamanhos e intensidade iguais</p>
<i>Cromatina condensada</i>	 <p>A célula mostra padrão nuclear estritamente estriado, com cromatina agregada e intensamente corada</p>

<i>Cariorrexe</i>		Célula com padrão nuclear densamente pontilhado, contendo vários núcleos no citoplasma celular
<i>Picnose</i>		A célula possui pequeno núcleo com alta densidade de material nuclear
<i>Cariólise</i>		A célula aparenta não ter núcleo

Fonte: adaptada de Thomas *et al.* (2009).

3.7 Análise estatística

Para verificação da distribuição dos dados, aplicou-se o teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados demográficos (idade e índice de massa corpórea-IMC) foram analisados pelo teste *t* de *Student* enquanto a distribuição do sexo, tabagistas, hábitos alimentares e prática de exercícios físicos foi analisada pelo teste do qui-quadrado. Os resultados do teste do cometa e dos marcadores analisados por citometria de fluxo foram comparados entre os grupos pelo teste *t* de *Student*, exceto a comparação entre os “tratamentos” (basal, H₂O₂ e reparo) do teste do cometa, na qual se aplicou a análise de variância. Para todos os parâmetros analisados pelo teste *BMCyt* aplicou-se o modelo linear generalizado com resposta binomial negativa, exceto para o parâmetro MN, para o qual utilizou-se o modelo linear generalizado usando *Poisson*. A maioria dos dados foi apresentada como média (X) e desvio-padrão (DP), seguida ou não de intervalo de confiança (IC) de 95%. Como as variáveis sexo, idade e hábito tabagista, bem como tempo de exposição (horas semanais e anos no grupo exposto) poderiam influenciar os resultados dos testes do cometa e do *BMCyt*, elas foram consideradas para os parâmetros analisados utilizando-se os testes estatísticos anteriormente descritos. O *software* utilizado foi o *IBM SPSS® Statistics* versão 21 *for Windows* (EUA, 2012) e adotou-se nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

A Tabela 2 mostra as características dos 76 participantes da pesquisa e os resultados apresentaram-se homogêneos ($p > 0,05$) quanto à idade, sexo, IMC, hábito tabagista, exercício físico e alimentação. O grupo exposto foi constituído por docentes, médicos e residentes das áreas de anestesiologia e cirurgia veterinária além de técnicos; 62% era do sexo feminino e 15% referiu tabagismo (três homens e três mulheres) em média de 15 anos, sendo que a maioria fumava menos de um maço por semana. A média de exposição ao RGA foi de oito anos ($8,1 \pm 8,9$), dos quais metade dos participantes foi exposto por período de um a quatro anos e a outra metade exposta por cinco anos ou mais (*cut off* de cinco anos de exposição). Os indivíduos estavam expostos, em média, a 20 horas semanais no centro cirúrgico. A concentração média residual de isoflurano foi de 11 ± 8 ppm. Em relação ao grupo controle, 65% era do sexo feminino e 11% era tabagista (dois homens e duas mulheres) em média de 17 anos, sendo que a maioria fumava menos de um maço por semana. A maioria (80%) dos participantes, em ambos os grupos, foi constituída de adultos jovens e o *cut off* de 31 anos foi utilizado quanto à idade dos participantes.

Tabela 2. Características da população estudada.

Características	Grupo Controle (n = 37)	Grupo Exposto (n = 39)
Idade (anos)	$31,6 \pm 10,3$	$32,5 \pm 10,4$
Sexo (masculino / feminino)	13 / 24	15 / 24
Índice de massa corpórea (kg/m^2)	$26,6 \pm 5,1$	$25,6 \pm 5,3$
Tabagistas	4	6
Praticantes regulares de exercício físico (aeróbico/anaeróbico)	14	21
Consumidores frequentes de frutas, legumes e verduras	31	35
Consumidores frequentes de carne vermelha, carne branca e peixe	29	28

Dados apresentados em $X \pm DP$ ou número absoluto. $p > 0,05$.

A Tabela 3 mostra os resultados do teste do cometa nos grupos avaliados. Observou-se leve aumento de danos basais no grupo exposto em relação ao controle, porém sem significância estatística ($p = 0,06$). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos danos induzidos por H_2O_2 e danos reparados. Quando as células foram expostas ao H_2O_2 houve aumento significativo de danos em relação aos danos basais, de forma semelhante nos dois grupos. Também houve eficiência do sistema reparo após o tratamento com H_2O_2 em ambos os grupos ($p < 0,05$), sem diferença entre eles. Assim, o nível de danos reparados foi semelhante ao nível de danos basais dos participantes, independentemente do grupo.

Tabela 3. Avaliação dos danos no DNA (*tail intensity*) detectados pelo teste do cometa.

Danos (%)	Grupo Controle	Grupo Exposto	Valor de <i>p</i>
Basais	6,5 ^a ± 4,3 [5,0 - 8,0]	9,2 ^a ± 6,9 [6,8 - 11,7]	0,06
Induzidos (H_2O_2)	19,2 ^b ± 11,0 [15,3 - 23,0]	21,3 ^b ± 13,3 [16,0 - 26,5]	0,51
Reparados	9,2 ^a ± 8,5 [6,0 - 14,1]	7,5 ^a ± 5,3 [5,4 - 9,7]	0,39
Valor de <i>p</i>	< 0,001	< 0,001	

Dados apresentados em $X \pm DP$ seguidos de IC 95%. Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente. H_2O_2 = peróxido de hidrogênio.

Quando a variável sexo foi analisada para o teste do cometa (Figura 11), observou-se que somente os homens expostos apresentaram mais danos basais no DNA que as mulheres expostas ($p = 0,04$). Não houve diferença significativa intra- ou intergrupos em relação ao sexo para os danos induzidos e reparados.

Quando a variável idade foi analisada para o teste do cometa, os resultados mostram que os indivíduos mais jovens (< 31 anos) expostos apresentaram maior nível de danos no DNA quando comparados aos indivíduos controles na mesma faixa etária (Tabela 4). Não houve diferença significativa intra- ou intergrupos em relação à idade para os danos induzidos e reparados ($p > 0,05$ - dados não apresentados). Também não houve diferença significativa no nível dos danos avaliados no DNA quanto ao hábito tabagista ($p > 0,05$ - dados não apresentados).

No que tange o grupo exposto quanto à faixa etária e anos de exposição anestésica, observou-se que os indivíduos mais jovens e expostos por até cinco anos apresentaram maior nível de danos basais no DNA em relação aos indivíduos de maior faixa etária (\geq

31 anos) expostos pelo mesmo período de tempo (Tabela 5). Adicionalmente, os indivíduos de maior faixa etária com mais anos de exposição apresentaram mais danos no material genético que os de mesma faixa etária com menor tempo de exposição. Em relação à exposição semanal anestésica, os indivíduos mais jovens (< 31 anos) expostos por período de tempo menor que cinco anos tiveram, em média, o triplo de carga horária que os indivíduos de maior faixa etária (≥ 31 anos) expostos pelo mesmo período de tempo (31 ± 18 horas *versus* 10 ± 4 horas; $p = 0,021$).

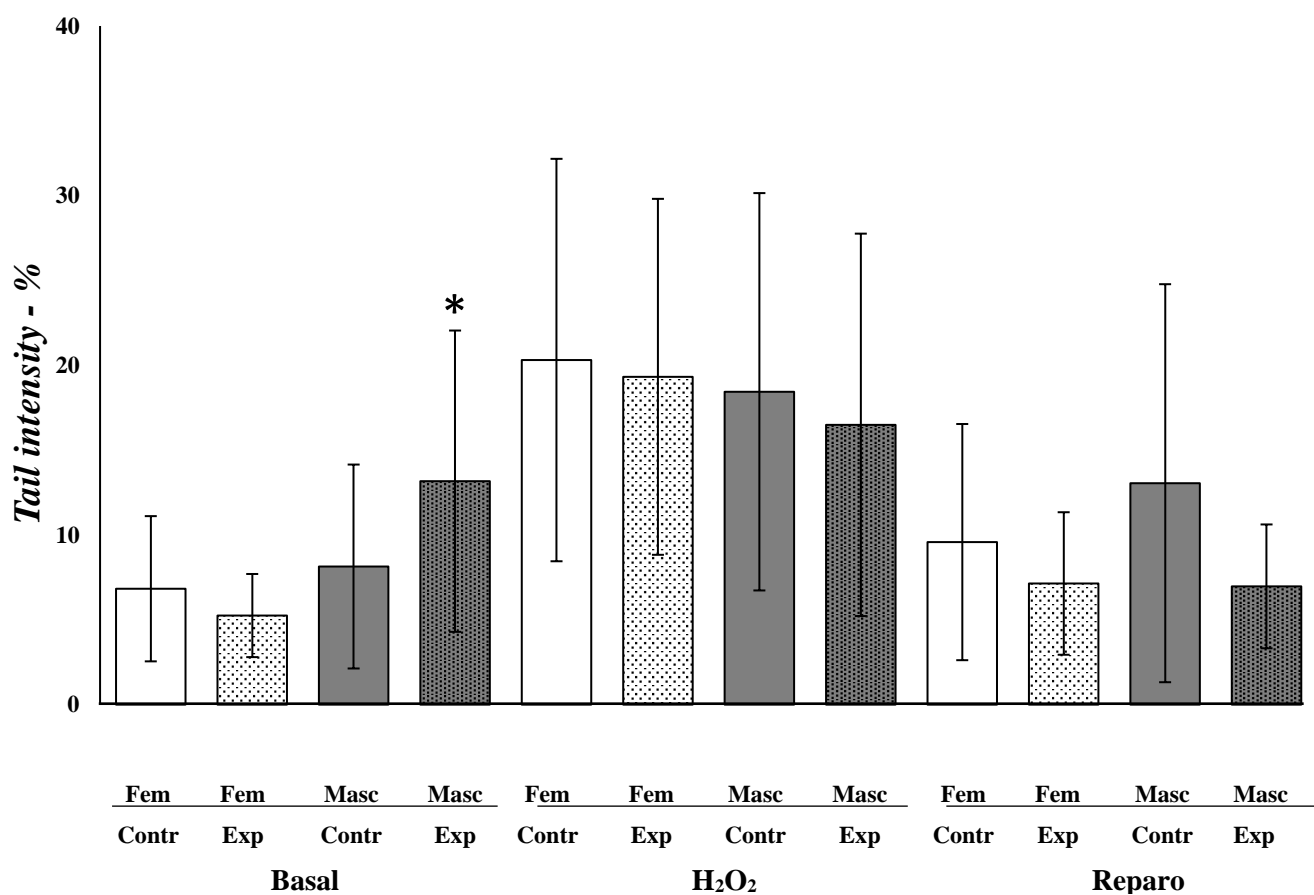


Figura 11. Níveis de danos basais no DNA, danos induzidos no DNA por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e reparo do DNA em células de sangue periférico nos sexos feminino (Fem) e masculino (Masc) dos indivíduos do grupo controle (Contr) e do grupo exposto (Exp). Os resultados são expressos como $X \pm DP$; * $p < 0,05$: danos basais entre sexo masculino exposto e sexo feminino exposto.

Tabela 4. Avaliação de danos basais no DNA (*tail intensity* - %) nos dois grupos avaliados conforme a faixa etária.

Grupo	Idade (anos)		Valor de <i>p</i>
	< 31	≥ 31	
Controle	6,0 ± 4,7 [3,8 - 7,8]	7,2 ± 3,8 [5,0 - 10,1]	0,42
Exposto	9,8 ± 7,3 [6,4 - 12,8]	8,4 ± 6,4 [4,7 - 11,0]	0,51
Valor de <i>p</i>	0,03	0,55	

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%.

Tabela 5. Avaliação de danos basais no DNA (*tail intensity* - %) no grupo exposto quanto às variáveis idade e exposição em anos.

Tempo de exposição (anos)	Idade (anos)		Valor de <i>p</i>
	< 31	≥ 31	
< 5	8,9 ± 5,4 [7,1 - 11,1]	4,1 ± 2,2 [2,8 - 3,4]	0,01
≥ 5	9,9 ± 4,5 [8,2 - 11,5]	9,7 ± 6,6 [7,7 - 12,5]	0,93
Valor de <i>p</i>	0,69	0,01	

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%.

A Tabela 6 mostra os resultados parciais obtidos de linfócitos viáveis, em apoptose precoce e em morte avançada de ambos os grupos avaliados (total de 33 indivíduos). Observou-se leve diminuição de linfócitos viáveis e leve aumento de apoptose precoce no grupo exposto em relação ao grupo controle ($p = 0,08$); não se observou diferença entre os grupos em relação à porcentagem de morte celular avançada ($p > 0,05$).

Tabela 6. Avaliação de viabilidade e citotoxicidade linfocitária por citometria de fluxo.

Linfócitos CD3 ⁺ (%)	Grupo		Valor de <i>p</i>
	Controle	Exposto	
Viáveis	89,7 ± 2,7 [87,9 - 91,5]	86,5 ± 5,7 [83,9 - 89,0]	0,08
Apoptose precoce	8,2 ± 2,5 [6,5 - 9,9]	10,9 ± 4,6 [8,9 - 13,0]	0,08
Morte avançada	2,1 ± 1,3 [1,4 - 3,1]	2,6 ± 2,8 [1,3 - 3,9]	0,74

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%.

A Tabela 7 mostra os resultados parciais obtidos das análises de ciclo celular nas populações de interesse (total de 33 indivíduos). Não houve diferença significativa entre os grupos nas diferentes fases analisadas para as células mononucleares. Apesar do grupo exposto ter apresentado menor frequência de células em G2/M quando comparado ao grupo controle em relação aos polimorfonucleares, não se obteve diferença significativa ($p = 0,08$) bem como para as outras fases ($p > 0,05$).

Tabela 7. Análise do ciclo celular nas populações de interesse em ambos os grupos estudados.

Fases do ciclo celular (%)	Grupo		Valor de <i>p</i>	Grupo		Valor de <i>p</i>
	Controle	Exposto		Controle	Exposto	
	Mononucleares			Polimorfonucleares		
G0/G1	99,6 ± 0,1 [98,8 - 100,0]	99,5 ± 0,4 [97,5 - 99,9]	0,33	99,7 ± 0,2 [99,5 - 99,8]	99,8 ± 0,2 [99,7 - 99,9]	0,14
S	0,11 ± 0,06 [0,06 - 0,15]	0,16 ± 0,19 [0,07 - 0,24]	0,38	0,07 ± 0,12 [0,00 - 0,16]	0,06 ± 0,13 [0,01 - 0,11]	0,74
G2/M	0,31 ± 0,10 [0,25 - 0,38]	0,35 ± 0,22 [0,25 - 0,45]	0,61	0,18 ± 0,17 [0,07 - 0,30]	0,10 ± 0,10 [0,05 - 0,14]	0,08

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%. G0/G1 = primeiro intervalo; S = fase de síntese; G2/M = segundo intervalo, mitose.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos pelo teste *BM*Cyt em ambos os grupos avaliados. Aumento estatisticamente significativo de MN, broto nuclear, cariorrexe, cariólise e células binucleadas foi observado no grupo exposto comparado ao grupo

controle. Por outro lado, a frequência de células basais foi significativamente menor no grupo exposto quando comparado ao grupo controle. Em relação aos demais marcadores (cromatina condensada, picnose e células diferenciadas) não houve diferença estatística entre os grupos.

As frequências de MN, broto nuclear, células basais e células binucleadas de acordo com grupo e sexo são mostradas na Tabela 9. As mulheres expostas tiveram maior frequência de MN, broto nuclear e de células binucleadas em comparação às mulheres controles ($p < 0,05$). As mulheres expostas também tiveram maior frequência de MN em comparação aos homens expostos ($p < 0,05$). As mulheres expostas tiveram menor frequência de células basais comparadas às mulheres não expostas, mas sem significância estatística ($p = 0,07$).

Tabela 8. Frequência (%) dos parâmetros em células esfoliadas bucais de ambos os grupos.

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Exposto	Valor de <i>p</i>
Micronúcleo	0,5 ± 0,4 [0,5 - 1,3]	0,8 ± 0,6 [0,9 - 2,1]	0,02
Broto nuclear	0,5 ± 0,6 [0,6 - 1,4]	1,4 ± 1,1 [1,9 - 3,6]	< 0,0001
Cromatina condensada	2,6 ± 2,8 [1,5 - 3,5]	3,5 ± 2,2 [2,8 - 4,2]	0,19
Cariorrexe	2,8 ± 3,5 [1,4 - 3,8]	5,8 ± 4,7 [4,3 - 7,3]	0,04
Picnose	5,2 ± 3,9 [3,8 - 6,6]	5,3 ± 4,1 [4,0 - 6,6]	0,89
Cariólise	4,7 ± 2,9 [3,3 - 5,3]	8,5 ± 7,5 [6,1 - 10,9]	0,002
Células binucleadas	7,3 ± 5,0 [5,9 - 9,3]	10,8 ± 6,5 [8,7 - 12,9]	0,02
Células basais	12,6 ± 9,0 [13,5 - 18,3]	6,2 ± 5,3 [4,5 - 7,9]	0,0005
Células diferenciadas	987,3 ± 9,7 [981,8 - 992,9]	993,5 ± 5,0 [991,2 - 995,7]	0,89

Dados apresentados em $X \pm DP$ seguidos de IC 95%.

Tabela 9. Frequência (%) de danos no DNA e de células basais em esfoliado da mucosa bucal dos dois grupos.

Parâmetros	Sexo	Grupo Controle	Grupo Exposto	Valor de p
Micronúcleo	F	0,4 ± 0,5 [0,3 - 1,2]	1,0 ± 1,1 [0,9 - 2,7]	0,002
	M	0,6 ± 0,6 [0,6 - 1,6]	0,6 ± 0,7 [0,6 - 1,3]	
Valor de p		0,25	0,04	
Broto nuclear	F	0,7 ± 1,0 [0,7 - 2,4]	1,6 ± 1,2 [2,1 - 4,0]	0,002
	M	0,6 ± 0,7 [0,5 - 1,2]	0,9 ± 1,0 [0,8 - 2,6]	
Valor de p		0,22	0,10	
Células basais	F	11,8 ± 8,7 [8,1 - 15,5]	6,0 ± 5,5 [3,7 - 8,3]	0,07
	M	14,7 ± 12,1 [7,0 - 22,4]	6,5 ± 5,1 [3,7 - 9,3]	
Valor de p		0,60	0,79	
Células binucleadas	F	7,0 ± 4,9 [4,9 - 9,1]	11,4 ± 6,0 [8,9 - 13,9]	0,007
	M	7,5 ± 5,1 [4,3 - 10,7]	9,5 ± 7,4 [5,4 - 13,6]	
Valor de p		0,80	0,40	

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%. F = sexo feminino; M = sexo masculino.

Quando os dados de morte celular em mucosa bucal foram separados de acordo com grupo e sexo (Tabela 10), os homens expostos apresentaram maior frequência de cariólise e cariorrexe em comparação aos homens do grupo controle ($p < 0,05$). Os homens expostos tiveram leve aumento de cariorrexe em relação às mulheres expostas ($p = 0,08$). Não houve diferenças significativas quanto aos grupos e sexos em relação à cromatina condensada e picnose ($p > 0,05$).

Tabela 10. Frequência (%) de mortes celulares na mucosa bucal de ambos os grupos estudados conforme o sexo.

Parâmetros	Sexo	Grupo		Valor de <i>p</i>
		Controle	Exposto	
Cromatina condensada	F	2,9 ± 3,0	3,3 ± 2,5	0,63
		[1,6 - 4,2]	[2,2 - 4,4]	
	M	2,0 ± 2,4	3,8 ± 1,7	
		[0,5 - 3,5]	[2,9 - 4,7]	
Valor de <i>p</i>		0,37	0,64	
Cariólise	F	5,0 ± 2,9	7,2 ± 6,4	0,11
		[3,8 - 6,2]	[4,5 - 9,9]	
	M	4,1 ± 3,4	11,2 ± 9,2	
		[1,9 - 6,3]	[6,1 - 16,3]	
Valor de <i>p</i>		0,42	0,22	
Picnose	F	5,6 ± 3,9	5,3 ± 4,4	0,80
		[4,0 - 7,2]	[3,4 - 7,2]	
	M	4,7 ± 4,0	5,4 ± 3,9	
		[2,2 - 7,2]	[3,2 - 7,6]	
Valor de <i>p</i>		0,51	0,94	
Cariorrexe	F	3,2 ± 3,9	4,8 ± 3,5	0,35
		[1,6 - 4,8]	[3,3 - 6,3]	
	M	2,2 ± 2,7	11,0 ± 8,5	
		[0,5 - 3,9]	[6,3 - 15,7]	
Valor de <i>p</i>		0,41	0,08	

Dados apresentados em $X \pm DP$ seguidos de IC 95%. F = sexo feminino; M = sexo masculino.

A Tabela 11 mostra os resultados dos marcadores avaliados em mucosa bucal de acordo com grupo e idade. O grupo exposto mostrou aumento significativo de MN e cariólise nos profissionais com idade < 31 anos comparado ao grupo controle com a mesma idade ($p < 0,05$) enquanto os profissionais expostos com < 31 anos tiveram menor frequência de células basais em relação ao grupo não exposto com a mesma idade ($p < 0,05$). Os profissionais expostos mais jovens (idade < 31 anos) tiveram maiores frequências de MN, cariólise e picnose em comparação aos profissionais com idade ≥ 31

anos ($p < 0,05$). Houve aumento nas frequências de broto nuclear e de células binucleadas nos profissionais expostos com idade ≥ 31 anos em comparação aos indivíduos do grupo controle da mesma faixa etária ($p < 0,05$). Apesar dos profissionais expostos com idade < 31 anos terem tido leve aumento na frequência de broto nuclear quando comparados aos controles da mesma faixa etária, a diferença não foi significativa ($p = 0,06$). Não houve diferença ($p > 0,05$) quanto à cariorrexe e cromatina condensada em relação aos grupos e faixas etárias. Não houve diferença estatística entre os grupos para todos os marcadores do teste *BMCyt* quanto ao hábito tabagista ($p > 0,05$ - dados não apresentados).

No que tange o grupo exposto quanto aos anos de exposição ocupacional anestésica, observa-se que os indivíduos com menos anos de exposição tiveram, em média, o dobro da frequência de MN que os indivíduos com mais anos de exposição (Tabela 12). Quando os dados de MN foram alocados conforme os anos de exposição e a idade, os indivíduos mais jovens e com menor tempo de exposição apresentaram maior frequência de instabilidade genética tanto em comparação com os indivíduos com ≥ 31 anos de idade com o mesmo tempo de exposição quanto os indivíduos da mesma faixa etária com maior tempo de exposição (Tabela 13). A Tabela 14 mostra que os indivíduos mais jovens e com menor exposição anestésica anual tiveram maior exposição semanal no centro cirúrgico quando comparados tanto com os indivíduos com maior idade e mesmo tempo de exposição em anos (média três vezes maior de horas semanais trabalhadas) quanto os indivíduos da mesma faixa etária com tempo maior de exposição em anos (média mais que o dobro de horas semanais trabalhadas).

Tabela 11. Frequência (%) de todos os biomarcadores analisados em células esfoliadas orais de ambos os grupos conforme a idade.

Idade (anos)	Grupo Controle	Grupo Exposto	Valor de p
Micronúcleo			
< 31	0,4 ± 0,5 [0,3 - 1,4]	1,0 ± 0,7 [0,9 - 2,9]	0,006
≥ 31	0,5 ± 0,6 [0,9 - 1,9]	0,6 ± 0,8 [0,1 - 1,9]	0,67
Valor de p	0,99	0,03	
Broto nuclear			
< 31	0,6 ± 0,6 [0,8 - 1,9]	1,1 ± 1,0 [1,4 - 3,4]	0,06
≥ 31	0,4 ± 0,7 [0,3 - 1,1]	1,7 ± 1,4 [1,9 - 3,9]	< 0,0001
Valor de p	0,11	0,22	
Cariólise			
< 31	5,0 ± 3,0 [3,6 - 6,3]	10,1 ± 8,6 [6,1 - 14,2]	0,004
≥ 31	4,4 ± 3,2 [2,6 - 13,0]	5,4 ± 2,7 [3,9 - 12,6]	0,36
Valor de p	0,62	0,04	
Picnose			
< 31	5,8 ± 3,7 [4,1 - 7,6]	7,1 ± 4,9 [4,9 - 9,4]	0,39
≥ 31	4,5 ± 3,9 [2,3 - 15,0]	3,5 ± 2,1 [2,4 - 9,2]	0,43
Valor de p	0,36	0,03	
Cariorrexe			
< 31	3,3 ± 3,8 [1,5 - 5,1]	6,6 ± 5,3 [4,1 - 9,0]	0,10
≥ 31	2,1 ± 3,0 [0,5 - 9,2]	4,0 ± 2,7 [2,5 - 11,3]	0,42
Valor de p	0,38	0,27	
Cromatina condensada			
< 31	2,3 ± 2,2 [1,3 - 3,4]	4,0 ± 1,3 [3,3 - 4,6]	0,27
≥ 31	3,1 ± 3,5 [1,1 - 10,4]	4,3 ± 3,2 [2,5 - 11,7]	0,44
Valor de p	0,46	0,20	
Células binucleadas			
< 31	8,1 ± 5,2 [5,6 - 10,5]	9,6 ± 4,9 [7,3 - 11,9]	0,38
≥ 31	6,4 ± 4,4 [4,0 - 18,3]	12,5 ± 8,0 [8,1 - 34,2]	0,006
Valor de p	0,38	0,15	
Células basais			
< 31	12,4 ± 8,9 [8,3 - 16,6]	5,2 ± 5,6 [2,6 - 7,9]	0,03
≥ 31	13,0 ± 10,4 [7,2 - 21,1]	7,9 ± 4,3 [5,5 - 19,5]	0,17
Valor de p	0,93	0,27	

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%.

Tabela 12. Frequência (%) de micronúcleos bucais no grupo exposto conforme anos de exposição.

Parâmetro	Tempo de exposição (anos)		Valor de p
	< 5	≥ 5	
Micronúcleo	1,0 ± 1,1 [1,0 - 2,0]	0,5 ± 0,8 [0,4 - 1,8]	0,02

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%.

Tabela 13. Frequência (%) de micronúcleos bucais no grupo exposto conforme anos de exposição e faixa etária.

Anos de exposição	Idade (anos)		Valor de p
	< 31	≥ 31	
< 5	1,1 ± 1,0 [1,9 - 3,6]	0,6 ± 0,6 [0,3 - 1,8]	0,008
≥ 5	0,5 ± 0,3 [0,7 - 1,4]	0,6 ± 0,9 [0,8 - 2,2]	0,68
Valor de p	0,006	0,70	

Dados apresentados em X ± DP seguidos de IC 95%.

Tabela 14. Carga horária semanal de trabalho segundo faixa etária e anos de exposição.

Anos de exposição	Idade (anos)		Valor de p
	< 31	≥ 31	
< 5	31 ± 18	10 ± 4	0,021
≥ 5	14 ± 4	18 ± 16	0,62
Valor de p	0,036	0,35	

Dados apresentados em X ± DP.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo incluem elevada exposição ao resíduo de isoflurano em profissionais atuantes em SC veterinárias, a qual está associada principalmente com alterações genéticas e celulares em mucosa bucal em ambos os sexos e de acordo com a intensidade da exposição, mas a qual está pouco associada com alterações sistêmicas no ciclo celular, no processo apoptótico e nos danos no DNA, exceto em indivíduos mais jovens com maior carga horária semanal e indivíduos de maior faixa etária com mais tempo (anos) de exposição.

A presente pesquisa evidenciou alta poluição anestésica por isoflurano em centro cirúrgico veterinário de hospital universitário brasileiro que não possui qualquer tipo de exaustão/ventilação de gases e nenhuma renovação de ar, o que certamente pode ser representativo de inúmeras SC veterinárias em nosso país e ao redor do mundo que dispõem das mesmas condições, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Observou-se que a exposição obtida excedeu, em média, 5,5 vezes a recomendada internacionalmente (*NIOSH*, 2007), evidenciando alta exposição aos profissionais. Ressalta-se, na presente pesquisa, que se utilizou FGF considerado baixo a intermediário, intubação orotraqueal com balonete, que impede o vazamento do FGF durante a ventilação pulmonar, e, na maioria das vezes, empregou-se sistema respiratório do tipo semifechado e moderno equipamento de anestesia. Certamente, se maior FGF tivesse sido utilizado bem como sistema respiratório aberto e intubação sem balonete a poluição anestésica seria muito maior. De fato, a mais importante causa de contaminação/poluição anestésica em centro cirúrgico se deve à ausência de sistema de exaustão nas SC; bem como de utilização de equipamentos menos modernos de anestesia, por apresentarem maior possibilidade de vazamentos; utilização de circuito respiratório aberto e com alto FGF (≥ 4 L/min); uso de tubo traqueal sem balonete e vazamento do AI durante o preenchimento do vaporizador, por contribuírem para maior liberação residual anestésica no ambiente (Lucio *et al.*, 2018).

Traçando paralelo com estudo realizado em centro cirúrgico humano de hospital universitário, também se demonstrou que as concentrações residuais de isoflurano excederam muito o limite internacional recomendado (*NIOSH*) em SC sem sistema de exaustão de gases; já em SC com sistema de exaustão com sete trocas de ar por hora (mesmo sem ser o ideal de no mínimo 15 trocas de ar/hora), houve significativa redução da poluição de isoflurano, ficando mais próxima a 2 ppm (Braz *et al.*, 2017). Assim,

evidenciou-se contaminação anestésica e consequente exposição ocupacional tanto em SC humana quanto veterinária quando estas não possuem sistema de exaustão de gases.

Foi relatado, nos EUA, concentrações de isoflurano abaixo de 2 ppm em SC com sistema de fluxo laminar que produzia 17 trocas de ar por hora sem recirculação, nas quais eram utilizados equipamentos de anestesia que também possuíam sistema de exaustão conectados ao sistema de exaustão central para realização de procedimentos cirúrgicos em modelos animais (primata, suíno e roedor) e humanos (Newcomer & Chopra, 2019). Assim, a instalação e o funcionamento adequado de sistema de exaustão das SC, a utilização de modernos equipamentos de anestesia com sistema de exaustão bem como o treinamento de pessoal no manuseio correto do equipamento de anestesia são medidas importantes para redução dos níveis de exposição tanto na anestesiologia veterinária quanto humana. Desta forma, é urgente e necessária a realização de melhoria das condições das SC veterinárias, nas quais diversos profissionais atuam, para redução da poluição anestésica e consequentemente mitigação da exposição dos profissionais. Segundo a *Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 2000)* é necessário minimizar a exposição ocupacional mantendo-a em concentrações as menores possíveis.

Devido à escassez de estudos sobre genotoxicidade em profissionais atuantes em SC veterinárias e expostos aos RGA bem como de dados conflitantes em profissionais expostos a mistura de RGA em centro cirúrgico humano, utilizou-se o teste do cometa para avaliação de danos basais bem como do sistema reparo em células mononucleares (predominantemente linfócitos) dos profissionais expostos.

Não se observou indução de danos primários no DNA de profissionais expostos aos resíduos de isoflurano em comparação com indivíduos não expostos. De forma interessante, fazendo paralelo com estudos realizados em modelo animal (rato) e em pacientes hígidos anestesiados com isoflurano, também não se observou aumento de danos no DNA em células do sangue periférico (Braz *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2015). Os estudos existentes na literatura que utilizaram o teste do cometa em profissionais expostos aos RGA em SC humanas são conflitantes, com resultados positivos (Chandrasekhar *et al.*, 2006; Rozgaj *et al.*, 2009; Wrońska-Nofer *et al.*, 2009) e negativos (Aun *et al.*, 2018; Szyfter *et al.*, 2016). Destaca-se que, diferentemente do nosso estudo, em todos esses trabalhos os profissionais foram expostos a mistura residual de anestésicos (mais e/ou menos modernos), mas nunca somente a um AI isolado.

De forma semelhante ao nosso estudo, Souza *et al.* (2016) mostraram ausência de diferença significativa entre nível de danos basais no DNA de linfócitos em médicos

anestesiologistas expostos a altas concentrações residuais dos halogenados mais modernos (incluindo o isoflurano) juntamente ao N₂O quando comparados a um grupo controle não exposto. Alguns autores já sugeriram que as células do sangue periférico podem não ser tão sensíveis para detecção de genotoxicidade advinda de exposição ocupacional aos halogenados mais modernos como o isoflurano (Rozgaj *et al.*, 2009; Szyfter *et al.*, 2016). Por outro lado, observou-se, na presente pesquisa, que os homens expostos apresentaram maior nível de danos basais no DNA que as mulheres expostas, mas não em relação aos homens não expostos.

Não há consenso sobre o impacto do sexo nos danos no DNA detectados pelo teste do cometa (Bajpayee *et al.*, 2002; Braz & Fávero Salvadori, 2007), porém um estudo sueco (Hofer *et al.*, 2006) mostrou que indivíduos do sexo masculino apresentaram maiores níveis de danos basais no DNA em comparação às participantes do sexo feminino quando se estudou uma população jovem (19 a 31 anos), hígida e não tabagista; os autores sugerem que essa diferença pode ser explicada pelos hábitos alimentares, IMC, metabolismo, hormônios e/ou eficiência no reparo de DNA.

Destaca-se que somente os indivíduos mais jovens expostos, quando comparados com seus respectivos controles, apresentaram maior nível de danos no DNA. Adicionalmente, em relação ao grupo exposto, os indivíduos mais jovens (< 31 anos) e expostos por até cinco anos apresentaram maior nível de danos basais no DNA em relação aos indivíduos de maior faixa etária (\geq 31 anos) expostos pelo mesmo tempo. À primeira vista este resultado pode parecer controverso pois poderia se esperar que quanto maior a idade dos indivíduos e maior o tempo de exposição em anos, maior poderia ser o nível de danos no DNA; entretanto, isto pode ser explicado pela elevada carga horária semanal (média superior a 30 horas) no centro cirúrgico dos profissionais mais jovens, os quais incluem os médicos veterinários residentes, que trabalham a maior parte do tempo nas SC, e conseqüentemente, têm maior exposição efetiva ao anestésico.

Também de forma interessante, observou-se que os indivíduos mais experientes com mais anos de exposição (especialmente docentes e técnicos) apresentaram mais danos no material genético que os de mesma faixa etária com menor tempo de exposição, mostrando que o aumento da idade, em conjunção com a maior duração da exposição aos RGA, em anos, também pode contribuir para o acréscimo dos danos no DNA. Assim, nossos achados sugerem que tanto o período de tempo de exposição semanal quanto o anual às elevadas concentrações de RGA no centro cirúrgico são relevantes para estudo de danos no material genético avaliado de forma sistêmica pelo teste do cometa. Destaca-

se que os estudos na área que alocaram os profissionais atuantes em SC humanas expostos aos RGA conforme a duração do tempo de exposição em anos (inferior ou superior a dez ou 15 anos), não mostraram diferença significativa no nível de danos basais entre os indivíduos utilizando-se o teste do cometa (Chandrasekhar *et al.*, 2006; El-Ebiary *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2016). Ressalta-se, portanto, que nenhum estudo na literatura, até o momento, considerou além da exposição anual, a exposição semanal efetiva aos RGA, o que parece ser relevante.

Em adição à avaliação de danos primários, também se induziu, de maneira inédita, danos no DNA utilizando o agente H_2O_2 , por ser altamente reativo e capaz de induzir oxidação de bases e quebras de fita simples e duplas no DNA (Andersson *et al.*, 2007) dos profissionais expostos ao resíduo de isoflurano bem como se analisou a eficiência do sistema reparo em remover esses danos frente à exposição ocupacional. De fato, pôde ser constatado que o tratamento com H_2O_2 foi efetivo em aumentar os danos no DNA independentemente do grupo estudado. Traçando um paralelo com estudo realizado em pacientes cirúrgicos durante e após manutenção anestésica com isoflurano, também se observou que o H_2O_2 foi efetivo em induzir danos genéticos (Braz *et al.*, 2011).

A fim de evitar acúmulo de lesões genéticas, o que poderia acarretar em efeitos deletérios ao organismo, as células naturalmente possuem uma gama de vias de reparo de DNA, as quais são muito eficientes (Collins *et al.*, 2001). Frente aos resultados encontrados, pela diminuição dos danos induzidos, sugere-se que a capacidade de reparo não é afetada pela exposição ocupacional ao isoflurano. Adicionalmente, ressalta-se que além da maioria dos participantes serem adultos jovens, houve consumo frequente de frutas, legumes e verduras além da prática regular de exercícios físicos, o que pôde ter contribuído com a ausência de danos observada entre os grupos. Sabe-se que uma alimentação saudável, incluindo grande consumo de antioxidantes naturais como ácido ascórbico e flavonoides protegem linfócitos humanos quanto aos danos induzidos por H_2O_2 (Noroozi *et al.*, 1998). Segundo Marcon *et al.* (2003) não é esperado encontrar diferenças significativas na capacidade de reparo de DNA em pessoas saudáveis. Piperakis *et al.* (2009) mostraram que há aumento de danos basais e diminuição da capacidade de reparo do DNA em população idosa quando comparada a adultos (40-50 anos) e crianças (5-10 anos). De fato, todos os participantes do presente estudo eram hígidos e a maioria constituída por adultos jovens, não tendo sido incluídos os idosos, o que reforça a capacidade de reparo nas células expostas ao H_2O_2 .

Deve-se destacar que os danos no DNA, detectados pelo teste do cometa, são passíveis de reparo e, mesmo que ocorram danos quando o DNA é replicado, isso não necessariamente causará mutação; assim, o dano no DNA deve ser visto como marcador de exposição a agentes químicos (Azqueta *et al.*, 2020), como os RGA.

Além de dano no material genético, a exposição anestésica pode levar a alterações imunológicas advindas de processo apoptótico (Loop *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 2001). A apoptose é a forma mais comum de morte celular programada em processo que pode ser desencadeado por vários fatores. Os dados parciais do presente estudo não mostraram alteração na frequência de apoptose precoce e morte avançada (citotoxicidade) em linfócitos T circulantes de profissionais expostos aos resíduos de isoflurano quando comparados aos indivíduos não expostos, de forma semelhante aos resultados obtidos do teste do cometa. Possivelmente pela ausência de indução de danos no DNA, não houve estímulo para as células entrarem em apoptose.

Entretanto, na literatura ao nosso alcance, há somente dois estudos que avaliaram a taxa de apoptose em neutrófilos cultivados de profissionais expostos ocupacionalmente a mistura de RGA (Goto *et al.*, 2000; Tyther *et al.*, 2002) enquanto que o trabalho de Aun *et al.* (2018) avaliou tanto os danos no DNA (teste do cometa) quanto a citotoxicidade (apoptose e perda de potencial de membrana mitocondrial) em células mononucleares frescas antes, aos seis meses e após um ano de exposição aos RGA isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O em médicos durante o período da residência médica em anestesiologia e cirurgia; os autores não observaram genotoxicidade nem citotoxicidade, de forma similar aos nossos resultados. Em paralelo, em pacientes cirúrgicos anestesiados com isoflurano também não se observou indução de apoptose precoce ou morte celular avançada em células T CD4⁺ ou CD8⁺ (Braz *et al.*, 2011); entretanto, os pacientes cirúrgicos são expostos a altas concentrações anestésicas, porém de forma aguda, enquanto que os profissionais são expostos a concentrações menores (residuais) mas de forma crônica.

Em consonância com os dados do teste do cometa e de apoptose avaliados em linfócitos, não foram observadas alterações significativas dos dados parciais obtidos do ciclo celular analisado em células mononucleares e polimorfonucleares circulantes de profissionais atuantes em SC veterinárias expostos aos resíduos de isoflurano quando comparados aos indivíduos controles. Assim, sugere-se que a exposição ocupacional ao RGA não parece influenciar as fases do ciclo celular, mas certamente a continuação do presente estudo com finalização das análises de apoptose e ciclo celular com maior

tamanho amostral será importante para confirmação ou não dos resultados obtidos até o presente momento. Com tamanho amostral de dez cirurgiões veterinários expostos a RGA, Hoerauf *et al.* (1999) também não observaram alteração da cinética do ciclo celular nem do índice mitótico quando avaliados em linfócitos periféricos.

Por outro lado, Luo *et al.* (2015), ao avaliarem células de câncer de ovário expostas ao isoflurano, demonstraram que este anestésico influencia o comportamento das células por regular marcadores associados à proliferação e ao ciclo celular como as ciclinas D e E, que promovem a transição das células da fase G1 para a fase S. Outras exposições ocupacionais a agentes químicos já foram associadas a alterações no ciclo celular. A exposição ao tricloroetileno, um solvente industrial que já foi utilizado como AI há mais de 50 anos no Brasil, mas que ainda continua sendo utilizado como anestésico na África, o qual gera metabólitos como o ácido tricloroacético, assim como o isoflurano, aumentou a expressão de *TP53*, *TP21* e *BAX* bem como reduziu a expressão de *BCL-2*, genes relacionados ao ciclo celular (Varshney *et al.*, 2015); associação entre exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e parada no ciclo celular de linfócitos também já foi reportada (Fu *et al.*, 2019).

Ressalta-se que o isoflurano é pouco metabolizado no fígado via citocromo P450 ($\leq 0,2\%$), gerando, portanto, poucos metabólitos reativos além de rapidamente ser eliminado do organismo pela pouca solubilidade sanguínea e tecidual, o que pode ter contribuído com nossos achados quando avaliados sistemicamente (em leucócitos do sangue periférico e não em células diretamente expostas).

Diferentemente, este estudo pioneiro detectou diversas alterações na mucosa bucal de profissionais expostos ocupacionalmente ao isoflurano em SC veterinárias. Destaca-se que as células da mucosa oral são a primeira barreira de contato com os AI. De fato, as células esfoliadas bucais (*BMCyt assay*) têm sido utilizadas, com sucesso, para detecção e monitoramento de eventos precoces de genotoxicidade incluindo o impacto da exposição a agentes genotóxicos e carcinógenos inalados e/ou ingeridos (Bolognesi *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2009). Considerando-se que a maioria dos cânceres humanos tem origem em células epiteliais, pode-se argumentar que as células esfoliadas orais representam um local alvo preferido para os agentes inalatórios (Holland *et al.*, 2008).

Portanto, o presente estudo mostrou associação entre alta exposição ocupacional ao resíduo de isoflurano e marcadores de danos genéticos, incluindo MN, broto nuclear e células binucleadas (as quais também podem ser consideradas marcadores de proliferação), marcadores de morte celular, incluindo cariorrexe e cariólise, e alteração

de índice proliferativo (células basais e células binucleadas). De forma interessante, Souza *et al.* (2016) também detectaram instabilidade genética (MN), além de citotoxicidade (incluindo cariorrexe) e alteração de proliferação celular (células basais), detectadas pelo teste *BMCyt* em anesthesiologistas brasileiros atuantes em centro cirúrgico sem adequado sistema de exaustão de gases e expostos a altas concentrações de diversos RGA.

Um trabalho indiano também relatou aumento de MN bucal quando avaliado em diversos profissionais (cirurgiões, anesthesiologistas, enfermeiros e técnicos) expostos aos RGA halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O em centro cirúrgico humano (Chandrasekhar *et al.*, 2006). Ressalta-se que estudos que relatam uso do teste do *BMCyt* em profissionais com exposição ocupacional aos RGA são escassos. O único estudo que traz referência a danos citogenéticos em profissionais expostos ao isoflurano e ao N₂O que atuavam em SC veterinárias reportou aumento de TCI, mas não de MN em linfócitos (Hoerauf *et al.*, 1999).

Células micronucleadas refletem dano citogenético e instabilidade genética, e elevadas frequências de MN podem indicar aumento do risco de câncer (Bonassi *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008). Assim como o MN, o broto nuclear é considerado marcador de instabilidade genética, pois parece ser resultante de amplificação gênica; já as células binucleadas são indicativas de falhas na citocinese devido a defeitos na formação dos anéis de microfilamentos ou de interrupções no ciclo celular devido à desregulação de cromossomos ou disfunção dos telômeros; alta frequência dessas células sugere associação com risco para doenças neurodegenerativas e câncer (Bolognesi *et al.*, 2013; Fenech, 2001; Thomas *et al.*, 2007). Além do grupo exposto ter apresentado maior frequência desses três marcadores de danos genéticos, as mulheres expostas também tiveram maior frequência desses marcadores que as mulheres controles e maior frequência de MN que os homens expostos.

Enquanto Chandrasekhar *et al.* (2006) mostraram maior frequência de MN bucal em homens expostos aos RGA, Kargar Shouroki *et al.* (2019) e Pasquini *et al.* (2001) observaram maior frequência de MN linfocitário em mulheres expostas aos RGA. Até o momento, não havia sido demonstrada influência do sexo no teste *BMCyt* em indivíduos com exposição ocupacional (Bonassi *et al.*, 2011). No entanto, nossos dados sugerem que o sexo pode influenciar nos biomarcadores de *BMCyt* em relação à exposição ocupacional aos anestésicos.

Considerando que já se demonstrou correlação positiva entre frequência de MN em células bucais e em linfócitos periféricos (Ceppi *et al.*, 2010), Bonassi *et al.* (1995) relataram em revisão da literatura que as frequências de MN em linfócitos em mulheres foram de 20 a 30% maiores em comparação aos homens, corroborando com nossos resultados. Assim, as mulheres parecem ser mais susceptíveis a esses efeitos de instabilidade genética que os homens expostos aos RGA. Possíveis hipóteses para tentar explicar esses achados incluem eventos aneuplóides envolvendo o cromossomo X (Costa *et al.*, 2006) e a oscilação hormonal nas mulheres; um estudo mostrou aumento de danos no DNA em mulheres na fase folicular tardia do ciclo, na qual ocorre aumento de estradiol (Kapiszewska *et al.*, 2005).

Por outro lado, os homens expostos apresentaram maior frequência de marcadores tardios de morte celular (cariorrexe e cariólise) que seus respectivos controles. Estudo realizado em anestesiológicas também mostrou aumento da frequência de cariorrexe em homens expostos comparados aos homens não expostos (Souza *et al.*, 2016). Estudo realizado em médicos residentes em anesthesiologia também reportou aumento na frequência de marcadores de instabilidade genética (MN) e citotoxicidade (cariorrexe, picnose e cariólise) quando comparados com médicos residentes não expostos aos RGA (Braz *et al.*, 2018).

Adicionalmente, diminuição de células basais foram observadas nos profissionais expostos comparados aos controles em nossa pesquisa, independentemente do sexo; portanto, alterações em marcadores de proliferação celular (células basais e binucleadas) foram detectadas. Outros dois estudos do nosso grupo de pesquisa também relataram redução de células basais na mucosa bucal de indivíduos expostos ocupacionalmente aos RGA (Braz *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2016), corroborando com os nossos achados. As células basais são fundamentais para produção de células que se diferenciam para manutenção da integridade da mucosa bucal. Estudos já relataram menor frequência de células basais em pacientes com doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, em comparação a indivíduos saudáveis (Thomas *et al.*, 2007; Thomas & Fenech, 2015).

Apesar do pouco conhecimento atual e de haver mais dúvidas que certezas, há indícios que os AI possam contribuir para o desencadeamento, em pacientes susceptíveis, para a neuropatogênese do Alzheimer (Jiang & Jiang, 2015). Adicionalmente, sugere-se que a combinação de células basais e cariorrexe, identificadas na mucosa bucal, possa ser útil, futuramente, no diagnóstico para identificação de indivíduos com maior risco de desenvolvimento de Alzheimer (Thomas *et al.*, 2007). Considerando que se encontrou

indícios de processo apoptótico e diminuição de células basais nos indivíduos expostos, sugere-se que esteja ocorrendo prejuízo no potencial regenerativo do tecido epitelial da mucosa oral pela exposição ao RGA.

De maneira semelhante aos resultados do teste do cometa em relação aos indivíduos expostos mais jovens apresentarem maior nível de danos basais no DNA que os controles na mesma faixa etária e também apresentarem mais danos que os indivíduos expostos com maior idade considerando o mesmo tempo de exposição em anos, a análise de marcador citogenético (MN) confirmou esses achados na mucosa bucal, mas também mostrou que os indivíduos com idade < 31 anos com menor tempo de exposição tiveram maior frequência de MN que os indivíduos na mesma faixa etária expostos por mais anos. Esses dados são respaldados pela maior carga horária semanal no centro cirúrgico, o que demonstra que a exposição efetiva ao RGA parece ser o fator determinante para instabilidade genética. De fato, esses indivíduos expostos por menos de cinco anos e com idade inferior a 31 anos trabalharam o triplo de horas em relação aos indivíduos com idade ≥ 31 anos expostos pelo mesmo tempo e mais que o dobro de horas que os indivíduos da mesma faixa etária expostos por ≥ 5 anos.

Adicionalmente, os achados do parâmetro cariólise mostraram-se semelhante ao MN em relação à idade e grupo, e o parâmetro picnose foi mais frequente nos indivíduos expostos mais jovens que os de idade ≥ 31 anos, reforçando que quanto maior a exposição efetiva, maior é a quantidade de danos e processo de morte celular. De fato, médicos residentes com alta carga horária semanal em SC humanas (média de 60 horas), portanto com maior exposição aos RGA, apresentaram maior frequência de células cariolíticas que médicos residentes com menor (média de 20 horas semanais) exposição (Braz *et al.*, 2018). Os indivíduos expostos com menor faixa etária também foram os mais susceptíveis às alterações de células basais. Portanto, a alta exposição de isoflurano no ambiente de trabalho, em profissionais que tenham grande carga horária, mostrou efeito deletério mesmo em indivíduos jovens e hígidos. Já para os parâmetros broto nuclear e células binucleadas, os profissionais expostos com maior faixa etária tiveram maior frequência que os respectivos controles, sugerindo que para esses parâmetros o avanço da idade pode ter influência quando há exposição ao RGA.

Realmente, a literatura tem mostrado que profissionais expostos a altas concentrações de RGA em SC em condições semelhantes ao presente estudo, ou seja, sem sistema de exaustão de gases, apresentam instabilidade genética (avaliada em linfócitos). Exemplificando, Wiesner *et al.* (2001) constataram que médicos e enfermeiros

anestesiologistas que atuavam em centro cirúrgico sem sistema de exaustão e portanto estavam altamente expostos a concentrações residuais anestésicas (4 ppm de isoflurano e halotano e 170 ppm de N₂O) apresentaram instabilidade genética enquanto que os profissionais atuantes em SC humanas com sistema de exaustão de gases e expostos a baixas concentrações de RGA, dentro dos valores limites recomendados (< 0,5 ppm de isoflurano, sevoflurano e desflurano e 12 ppm de N₂O), não tiveram indução de MN. Adicionalmente, em células esfoliadas bucais, a frequência de MN em profissionais expostos a mistura de RGA foi maior em indivíduos com idade ≥ 35 anos de idade e expostos a mais de dez anos que em indivíduos mais jovens e expostos por menor período de tempo (Chandrasekhar *et al.*, 2006). Contudo, outros estudos não observaram influência da idade, duração do tempo de exposição em anos (Çakmak *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2016) e do hábito tabagista (Çakmak *et al.*, 2019) em indivíduos expostos a diferentes RGA.

Anestesiologistas expostos ao sevoflurano e ao N₂O que trabalhavam oito horas diárias em SC sem sistema ativo de exaustão, utilizando modernos equipamentos de anestesia com alto FGF, apresentaram maior frequência de TCI que o grupo não exposto (Eroglu *et al.*, 2006). Estes mesmos autores reavaliaram os grupos após dois meses, pois os profissionais expostos ficaram afastados do centro cirúrgico, e observou-se que a frequência de TCI diminuiu para níveis semelhantes ao grupo controle. Dessa forma, isso mostra a importância dos profissionais expostos a RGA tirarem férias e ficarem um tempo sem exposição para que o organismo possa se restabelecer e evitar o acúmulo de danos.

Uma revisão sistemática com metanálise mostrou aumento na frequência de MN em linfócitos em indivíduos com exposição ocupacional aos RGA em comparação aos profissionais não expostos (Vodicka *et al.*, 2016). Esses autores reportaram moderada qualidade dos estudos originais e destacaram que poucos reportaram o nível de exposição anestésica. Recentemente, Çakmak *et al.* (2019) avaliaram as frequências de MN tanto em linfócitos quanto em células da mucosa bucal de diversos profissionais atuantes em centro cirúrgico humano expostos a mistura de RGA; verificou-se aumento nas frequências de MN nos dois tipos celulares (duas vezes superior em linfócitos e três vezes superior em células bucais) em comparação ao grupo controle.

Assim, considerando esses achados e o fato do teste *BM*Cyt ser mais rápido a ser realizado, ter coleta menos invasiva e não requerer cultura de células como o teste de MN em linfócitos, além de possibilitar analisar inúmeros marcadores incluindo danos no

material genético, proliferação e morte celular, além do fato das células esfoliadas bucais serem alvo de substâncias inaladas por entrarem em contato direto com elas, como é o caso dos AI, o teste *BMCyt* tem se mostrado promissor para monitorar, de forma pouco invasiva, os efeitos tóxicos da exposição ocupacional aos RGA em todos os profissionais que são expostos por se tratar de ferramenta sensível e relevante para identificação de marcadores de exposição.

Uma possível limitação do presente estudo refere-se ao fato do grupo exposto ao RGA também ter apresentado exposição esporádica à radiação ionizante. Entretanto, medidas de proteção como utilização de jalecos de chumbo de corpo inteiro e de tireoide foram sistematicamente adotadas, o que certamente minimizou o impacto dessa exposição em nossos resultados. Adicionalmente, o estudo foi realizado com a participação de docentes, médicos veterinários, residentes e técnicos em centro cirúrgico veterinário universitário, os quais apresentaram variabilidade quanto à duração efetiva da exposição anestésica semanal e anual. Como critério de inclusão, estabeleceu-se o tempo mínimo de um ano para exposição ao RGA, contudo talvez seja mais relevante considerar, para estudos futuros, a duração da exposição semanal juntamente com a exposição anual.

Levando em consideração nossos achados de poluição anestésica em SC veterinárias e do impacto biológico dessa exposição nos profissionais expostos, urge a necessidade de se investir em melhorias na estrutura dos centros cirúrgicos com implantação de sistema de exaustão de gases bem como de monitorar a poluição das SC e dos profissionais que nelas atuam. Como a Sociedade Brasileira de Anestesiologia e o Colégio Brasileiro de Anestesiologia Veterinária, dentre outras entidades semelhantes em países em desenvolvimento, têm papel relevante para melhorar os padrões de qualidade na área, sugere-se que também atuem na conscientização dos profissionais ocupacionalmente expostos, e especialmente dos gestores para melhoria do ambiente de trabalho para minimizar a exposição aos AI, com implantação de regulamentações e medidas políticas com a finalidade de criação de leis/normas específicas como encontradas, há muitas décadas, em países desenvolvidos.

Percebe-se que esforços são necessários para redução efetiva da contaminação anestésica no ar ambiente de centro cirúrgico. A redução da poluição anestésica e prevenção dos potenciais riscos insalubres à saúde dos trabalhadores atuantes em centro cirúrgico é questão de saúde pública e também envolve a responsabilidade dos gestores em promover um ambiente seguro aos seus profissionais. Assim, com a redução da poluição anestésica nas SC, haverá benefícios tanto para os profissionais, os quais terão

menor exposição ocupacional, com conseqüente diminuição dos efeitos biológicos deletérios, bem como para a saúde planetária pela mitigação da emissão de gases de efeito estufa.

6 CONCLUSÃO

O estudo mostrou alta exposição aos resíduos de isoflurano em SC veterinárias sem sistema de exaustão, a qual está associada à instabilidade genética, alterações proliferativas e citotoxicidade em células da mucosa bucal dos profissionais expostos sendo que algumas alterações tiveram influência do sexo e da duração da exposição; e somente profissionais mais jovens apresentaram aumento de danos no DNA de células mononucleares quando comparados aos indivíduos controles na mesma faixa etária. Por outro lado, a exposição ao RGA não está associada com alterações no sistema de reparo de DNA, nas fases do ciclo celular nem no processo apoptótico quando células do sangue periférico foram avaliadas. Assim, profissionais atuantes em centro cirúrgico veterinário e expostos a RGA apresentam importantes efeitos deletérios; urge a necessidade de se minimizar a poluição anestésica no ambiente de trabalho para redução de exposição ocupacional.

7 REFERÊNCIAS*

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Peter Walter P. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.

American College of Veterinary Anesthesiologists (ACVA). Commentary and recommendations on control of waste anesthetic gases in the workplace. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209(1):75-7.

Anazetti MC, Melo PS. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesqui.* 2007;1(1):37-58.

Andersson M, Stenqvist P, Hellman B. Interindividual differences in initial DNA repair capacity when evaluating H₂O₂-induced DNA damage in extended-term cultures of human lymphocytes using the comet assay. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23(6):401-11.

Aun AG, Golim MA, Nogueira FR, Souza KM, Arruda NM, Braz JRC, et al. Monitoring early cell damage in physicians who are occupationally exposed to inhalational anesthetics. *Mutat Res.* 2018;812:5-9.

Azqueta A, Ladeira C, Giovannelli L, Boutet-Robinet E, Bonassi S, Neri M, et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: an hCOMET perspective. *Mutat Res.* 2020;783:108288.

Bajpayee M, Dhawan A, Parmar D, Pandey AK, Mathur N, Seth PK. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutat Res.* 2002;520(1-2):83-91.

* 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

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington: NLM; 2008. 337 p.

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.

Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 2013;753(2):100-13.

Bolognesi C, Roggieri P, Ropolo M, Thomas T, Hor M, Fenech M, et al. Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*. 2015;30(4):545-55.

Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, et al. Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995;4(6):671-9.

Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen*. 2005;45(2-3):258-70.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007;28(3):625-31.

Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res*. 2011;728(3):88-97.

Braz MG, Fávero Salvadori DM. Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay. *Toxicol in Vitro*. 2007;21(5):972-6.

Braz MG, Mazoti MÁ, 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.

Braz LG, Braz JRC, Cavalcante GAS, Souza KM, Lucio LMC, Braz MG. Comparação de resíduos de gases anestésicos em salas de operação com ou sem sistema de exaustão em hospital universitário brasileiro. *Rev Bras Anesthesiol*. 2017;67(5):516-20.

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.

Braz MG, Carvalho LIM, Chen CO, Aun AG, Marques LSK, Lara JR, 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.

Brozović G, Oršolić N, Rozgaj R, Kasuba V, Knezevic F, Knezevic AH, et al. DNA damage and repair after exposure to sevoflurane in vivo, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. *J Appl Genet*. 2010;51(1):79-86.

Brozović G, Oršolić N, Rozgaj R, Knežević F, Knežević AH, Maričić M, et al. Sevoflurane and isoflurane genotoxicity in kidney cells of mice. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2017;68(3):228-35.

Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*. 2008;44(3):235-40.

Brunborg G, Collins A. Guidance for publishing comet assay results. *Mutat Res*. 2020;854-855:503146.

Çakmak G, Eraydın D, Berkkan A, Yağar S, Burgaz S. Genetic damage of operating and recovery room personnel occupationally exposed to waste anaesthetic gases. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(1):3-10.

Carter J, Story DA. Veterinary and human anaesthesia: an overview of some parallels and contrasts. *Anaesth Intensive Care*. 2013;41(6):710-8.

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

Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res*. 2010;705(1):11-9.

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.

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.

Chinelato AR, Froes NDTC. Genotoxic effects on professionals exposed to inhalational anesthetics. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52(1):79-85.

Collins AR, Dusinská M, Horská A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol*. 2001;48:611-4.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008;23(3):143-51.

Costa C, Teixeira JP, Silva S, Roma-Torres J, Coelho P, Gaspar J, et al. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*. 2006;21(5):343-50.

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.

Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*. 2001;38(2):179-93.

Düsman E, Gonçalves LA, Reusing AF, Martin PG, Mariucci RG, Vicentini VEP. Cytotoxic potential of waters of the streams Mandacaru, Maringá. Miosótis and Nazareth in the urban area of Maringá PR Brazil. *Acta Scient Biol Sci*. 2012;34(3):311-8.

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.

Epp T, Waldner C. Occupational health hazards in veterinary medicine: physical, psychological, and chemical hazards. *Can Vet J*. 2012;53(2):151-7.

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.

Faldyna M, Sinkora J, Knotigova P, Rehakova Z, Moravkova A, Toman M, et al. Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003;95(3-4):165-76.

Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res*. 2001;475(1-2):57-67.

Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*. 2002;181-182:411-6.

Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods*. 1980;36(2):109-17.

Fu H, Liu K, Alvarez PJJ, Yin D, Qu X, Zhu D. Quantifying hydrophobicity of natural organic matter using partition coefficients in aqueous two-phase systems. *Chemosphere*. 2019;218:922-9.

Gardner RJ, Hampton J, Causton JS. Inhalation anaesthetics exposure and control during veterinary surgery. *Ann Occup Hyg*. 1991;35(4):377-88.

Goto Y, Gallagher J, Fanning N, Wang J, McCusker S, Redmond P, et al. Does chronic occupational exposure to volatile anesthetic agents influence the rate of neutrophil apoptosis? *Can J Anaesth*. 2000;47(4):350-3.

Grubb TL, Benson GJ, Foreman JH, Constable PD, Thurmon JC, Olson WO, et al. Hemodynamic effects of ionized calcium in horses anesthetized with halothane or isoflurane. *Am J Vet Res*. 1999;60(11):1430-5.

Henry CM, Hollville E, Martin SJ. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*. 2013;61(2):90-7.

Hoerauf K, Funk W, Harth M, Hobbhahn J. Occupational exposure to sevoflurane, halothane and nitrous oxide during pediatric anaesthesia. Waste gas exposure during paediatric anaesthesia. *Anaesthesia*. 1997;52(3):215-9.

Hoerauf K, Lierz M, Wiesner G, Schroegendorfer K, Lierz P, Spacek A, et al. Genetic damage in operating room personnel exposed to isoflurane and nitrous oxide. *Occup Environ Med*. 1999;56(7):433-7.

Hofer T, Karlsson HL, Möller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. *Free Radic Res.* 2006;40(7):707-14.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659(1-2):93-108.

Huang BY, Huang HB, Zhang ZJ, Liu ZG, Luo J, Liu M, et al. Cell cycle activation contributes to isoflurane-induced neurotoxicity in the developing brain and the protective effect of CR8. *CNS Neurosci Ther.* 2019;25(5):612-20.

International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for industry: S2B Genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. Rockville: ICH; 1997.

Ishizawa Y. Special article: general anesthetic gases and the global environment. *Anesth Analg.* 2011;112(1):213-7.

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.

Jamnicki-Abegg M, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Bosnjak ZJ, Warltier DC, et al. Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression. *Anesthesiology.* 2005;103(5):1006-14.

Jeyaretnam J, Jones H, Phillips M. Disease and injury among veterinarians. *Aust Vet J.* 2000;78(9):625-9.

Jiang J, Jiang H. Effect of the inhaled anesthetics isoflurane, sevoflurane and desflurane on the neuropathogenesis of Alzheimer's disease (review). *Mol Med Rep.* 2015;12(1):3-12.

Johnston GM, Eastment JK, Taylor PM, Wood JL. Is isoflurane safer than halothane in equine anaesthesia? Results from a prospective multicentre randomised controlled trial. *Equine Vet J.* 2004;36(1):64-71.

Johnstone KR, Lau C, Whitelaw JL. Evaluation of waste isoflurane gas exposure during rodent surgery in an Australian university. *J Occup Environ Hyg.* 2017;14(3):955-64.

Jones RS, West E. Environmental sustainability in veterinary anaesthesia. *Vet Anaesth Analg.* 2019;46(4):409-20.

Jun R, Gui-he Z, Xing-xing S, Huia Z, Xu L-X. Isoflurane enhances malignancy of head and neck squamous cell carcinoma cell lines: a preliminary study in vitro. *Oral Oncol.* 2011;47(5):329-33.

Kapiszewska M, Kalembe M, Grzesiak A, Kocemba K. The level of endogenous DNA damage in lymphocytes isolated from blood is associated with the fluctuation of 17beta-estradiol concentration in the follicular phase of healthy young women. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):535-9.

Kargar Shouroki F, Neghab M, Mozdarani H, Alipour H, Yousefinejad S, Fardid R. et al. Genotoxicity of inhalational anesthetics and its relationship with the polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and GSTP1 genes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019;26(4):3530-41.

Kaymak C, Kadioglu E, Coskun E, Basar H, Basar M. Determination of DNA damage after exposure to inhalation anesthetics in human peripheral lymphocytes and sperm cells in vitro by comet assay. *Hum Exp Toxicol.* 2012;31(12):1207-13.

Kim H, Oh E, Im H, Mun J, Minho Y, Khim J-Y, et al. Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. *Toxicology.* 2006;220(2-3):169-78.

Korczynski RE. Anesthetic gas exposure in veterinary clinics. *Appl Occup Environ Hyg.* 1999;14:384-90.

Kundomal YR, Baden JM. Mutagenicity of inhaled anesthetics in *Drosophila melanogaster*. *Anesthesiology.* 1985;62(3):305-9.

Liu J, Yang L, Guo X, Jin G, Wang Q, Lv D, et al. Sevoflurane suppresses proliferation by upregulating microRNA-203 in breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2018;18(1):455-60.

Loop T, Dovi-Akue D, Frick M, Roesslein M, Egger L, Humar M, et al. Volatile anesthetics induce caspase-dependent, mitochondria-mediated apoptosis in human T lymphocytes in vitro. *Anesthesiology.* 2005;102(6):1147-57.

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.

Lucio LMC, Braz MG, do Nascimento Junior P, Braz JRC, Braz LG. Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. *Rev Bras Anestesiol.* 2018;68(1):33-41.

Luo X, Zhao H, Hennah L, Ning J, Liu J, Tu H, et al. Impact of isoflurane on malignant capability of ovarian cancer in vitro. *Br J Anaesth.* 2015;114(5):831-9.

Macedo AC, Mota VT, Tavares JM, Machado OL, Malcata FX, Cristo MP, et al. Work environment and occupational risk assessment for small animal Portuguese veterinary activities. *J Occup Environ Hyg.* 2018;15(3):D19-D28.

MacNeill AJ, Lillywhite R, Brown CJ. The impact of surgery on global climate: a carbon footprinting study of operating theatres in three health systems. *Lancet Planet Health.* 2017;1:381-8.

Marcon F, Andreoli C, Rossi S, Verdina A, Galati R, Crebelli R. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutat Res.* 2003;541(1-2):1-8.

Massone F. Ethics and morals in veterinary anesthesiology. *Rev Educ Cont Med Vet Zootec.* 2002;5:124-33.

Matsuoka H, Kurosawa S, Horinouchi T, Kato M, Hashimoto Y. Inhalation anesthetics induce apoptosis in normal peripheral lymphocytes in vitro. *Anesthesiology.* 2001;95(6):1467-72.

Merillat, VA. *The principles of veterinary surgery.* Chicago: Alexander Eger; 1915.

Molina Aragonés JM, Ayora Ayora A, Barbara Ribalta A, Gascó Parici A, Medina Lavela JA, Sol Vidiella J, et al. Occupational exposure to volatile anaesthetics: a systematic review. *Occup Med (Lond).* 2016;66(3):202-7.

Nagella AB, Ravishankar M, Hemanth Kumar VR. Anaesthesia practice and reproductive outcomes: Facts unveiled. *Indian J Anaesth.* 2015;59(11):706-14.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). *Waste anesthetic gases: occupational hazards in hospitals.* Cincinnati: U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, DHEW (NIOSH); 2007. (DHHS (NIOSH) Publication; n. 2007-151).

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). *Drinking levels defined* [Internet]. Bethesda: NIAAA; 2015 [citado 21 Jul 2010]. Disponível em: <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-onsumption/moderatebinge-drinking>

Neghab M, Amiri F, Soleimani E, Yousefinejad S, Hassanzadeh J. Toxic responses of the liver and kidneys following occupational exposure to anesthetic gases. *EXCLI J.* 2020;19:418-29.

Newcomer D, Chopra I. Evaluation of waste anesthetic gas surveillance program and isoflurane exposures during animal and human surgery. *J Occup Environ Hyg.* 2019;16(7):544-56.

Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett.* 2004;149(1-3):309-34.

Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(6):1210-8.

Occupational Safety and Health Administration (US). Anesthetic gases: guidelines for workplace exposures [Internet]. Washington: OSHA; 2000 [citado 21 Jul 2020]. Disponível em: <https://www.osha.gov/dts/osta/anestheticgases/index.htm>

Occupational Safety and Health Administration (US). Isoflurane [Internet]. Washington: OSHA; 2006 [citado 21 Jul 2020]. Disponível em: https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_247970.html

Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Fatigoni C, Marcarelli M, Monarca S, Donato F, et al. Sister chromatid exchanges and micronuclei in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to enflurane and nitrous oxide. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001;20(2):119-26.

Piperakis SM, Kontogianni K, Karanastasi G, Iakovidou-Kritsi Z, Piperakis MM. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(1):65-71.

Polis I, Gasthuys F, Van Ham L, Laevens H. Recovery times and evaluation of clinical hemodynamic parameters of sevoflurane, isoflurane and halothane anaesthesia in mongrel dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2001;48(7):401-11.

Raisis AL, Young LE, Blissitt KJ, Brearley JC, Meire HB, Taylor PM, et al. A comparison of the haemodynamic effects of isoflurane and halothane anaesthesia in horses. *Equine Vet J.* 2000;32(4):318-26.

Ribeiro DA, Grilli DG, Salvadori DM. Genomic instability in blood cells is able to predict the oral cancer risk: an experimental study in rats. *J Mol Histol.* 2008;39(5):481-6.

Robbiano L, Mereto E, Migliazzi Morando A, Pastore P, Brambilla G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat Res.* 1998;413(1):1-6.

Rocha TL, Dias-Junior CA, Possomato-Vieira JS, Gonçalves-Rizzi VH, Nogueira FR, de Souza KM, et al. Sevoflurane induces DNA damage whereas isoflurane leads to higher antioxidative status in anesthetized rats. *Biomed Res Int.* 2015;2015:264971.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia.* 5a ed. São Paulo: Manole; 1999.

Rozgaj R, Kasuba V, Brozović 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.

Ryan SM, Nielsen CJ. Global warming potential of inhaled anesthetics: application to clinical use. *Anesth Analg.* 2010;111(1):92-8.

Safari S, Motavaf M, Seyed Siamdoust SA, Alavian SM. Hepatotoxicity of halogenated inhalational anesthetics. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;16(9):e20153.

Salvadori DM, Ribeiro LR, Fenech M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: Ribeiro LC, Salvadori DM, Marques EK, editores. *Mutagênese ambiental.* Canoas: Editora Ulbra; 2003. p. 201-23.

Sasaki TM, Finelli F, Bugarin E, Fowlkes D, Trollinger J, Barhyte DY, et al. Is laparoscopic donor nephrectomy the new criterion standard? *Arch Surg.* 2000;135(8):943-7.

Schenning KJ, Noguchi KK, Martin LD, Manzella FM, Cabrera OH, Dissen GA, et al. Isoflurane exposure leads to apoptosis of neurons and oligodendrocytes in 20- and 40-day old rhesus macaques. *Neurotoxicol Teratol.* 2017;60:63-8.

Schneemilch CE, Hachenberg T, Ansorge S, Ittenson A, Bank U. Effects of different anaesthetic agents on immune cell function in vitro. *Eur J Anaesthesiol.* 2005;22(8):616-23.

Sherman JD, Berkow L. scaling up inhaled anesthetic practice improvement: the role of environmental sustainability metrics. *Anesth Analg.* 2019;128(6):1060-2.

Shirangi A, Fritschi L, Holman CD. Maternal occupational exposures and risk of spontaneous abortion in veterinary practice. *Occup Environ Med.* 2008;65(11):719-25.

Shirangi A, Fritschi L, Holman CD, Bower C. Birth defects in offspring of female veterinarians. *J Occup Environ Med.* 2009a;51(5):525-33.

Shirangi A, Fritschi L, Holman CD. Associations of unscavenged anesthetic gases and long working hours with preterm delivery in female veterinarians. *Obstet Gynecol.* 2009b;113(5):1008-17.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-91.

Smithcors JF. The early use of anaesthesia in veterinary practice. *Br Vet J.* 1957;113:284-91.

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;791-792:42-8.

Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol.* 2005;291:85-95.

Spinosa HS, Górnica SL, Bernardi MM. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária.* 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

Steffey EP, Mama KR, Brosnan RJ. Inhalation anesthetics. In: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA, editors. *Veterinary anesthesia and analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2015. p. 297.

Stevenson DE. The evolution of veterinary anaesthesia. *Br Vet J*. 1963;119:477-83.

Sulbaek Andersen MP, Sander SP, Nielsen OJ, Wagner DS, Sanford TJ Jr, Wallington TJ. Inhalation anaesthetics and climate change. *Br J Anaesth*. 2010;105(6):760-6.

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.

Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*. 2007;22(6):371-9.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4(6):825-37.

Thomas P, Fenech M. Buccal Cytome biomarkers and their association with plasma folate, vitamin B12 and homocysteine in Alzheimer's Disease. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2015;8(2):57-69.

Thurmon JC, Short CE. History and overview of veterinary anesthesia. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, editors. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional; 2007. p. 3-6.

Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoresis technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol*. 1991;283:157-64.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271(1):69-77.

Tranquilli W, Grimm K. Introduction: use, definitions, history, concepts, classification, and considerations for anesthesia and analgesia. In: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA, editors *Veterinary anesthesia and analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2015. p. 1-7.

Tyther R, Halligan M, Wang J, Redmond HP, Shorten G. Effects of chronic occupational exposure to anaesthetic gases on the rate of neutrophil apoptosis among anaesthetists. *Eur J Anaesthesiol*. 2002;19(8):604-8.

Vance JE, Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res*. 2005;44(4):207-34.

Varshney M, Chandra A, Jain R, Ahmad R, Bihari V, Chandran CK, et al. Occupational health hazards of trloroethylene among workers in relation to altered mRNA expression of cell cycle regulating genes (p53, p21, bax and bcl-2) and PPARA. *Toxicol Rep*. 2015;2:748-57.

Vodicka P, Bastlová T, Vodicková L, Peterková K, Lambert B, Hemminki K. Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: levels of O6-guanine DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes. *Carcinogenesis*. 1995;16(7):1473-81.

Vodicka P, Musak L, Fiorito G, Vymetalkova V, Vodickova L, Naccarati A. DNA and chromosomal damage in medical workers exposed to anaesthetic gases assessed by the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay. A critical review. *Mutat Res*. 2016;770(Pt A):26-34.

Vollmer MK, Rhee TS, Rigby M, Hofstetter D, Hill M, Schoenenberger F, et al. Modern inhalation anesthetics: Potent greenhouse gases in the global atmosphere. *Geophys Res Lett*. 2015;42(5):1606-11.

Vouriot A, Gauchard GC, Chau N, Nadif R, Mur JM, Perrin PP. Chronic exposure to anesthetic gases affects balance control in operating room personnel. *Neurotoxicology*. 2005;26(2):193-98.

Wei H, Liang G, Yang H, Wang Q, Hawkins B, Madesh M, et al. The common inhalational anaesthetic isoflurane induces apoptosis via activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Anesthesiology*. 2008;108(2):251-60.

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.

World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018: executive summary [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [citado 21 Jul 2020]. Disponible em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312318>

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.

Xu XL, Pan C, Hu JX, Liu XT, Li YF, Wang H, et al. Effects of isoflurane inhalation on the male reproductive system in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;34(3):688-93.

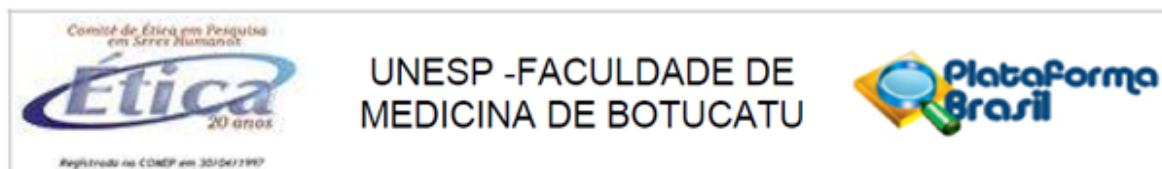
Yasny JS, White J. Environmental implications of anesthetic gases. *Anesth Prog*. 2012;59(4):154-8.

Zhang C, Wang B, Wang X, Sheng X, Cui Y. Sevoflurane inhibits the progression of ovarian cancer through down-regulating stanniocalcin 1 (STC1). *Cancer Cell Int*. 2019;19:339.

Zimmermann M, Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol*. 2011;740:57-63.

ANEXO A

Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos aos resíduos de gases anestésicos que atuam em hospital veterinário

Pesquisador: DRIELLE BAPTISTA DOS SANTOS FIGUEIREDO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 79843317.8.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.422.128

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

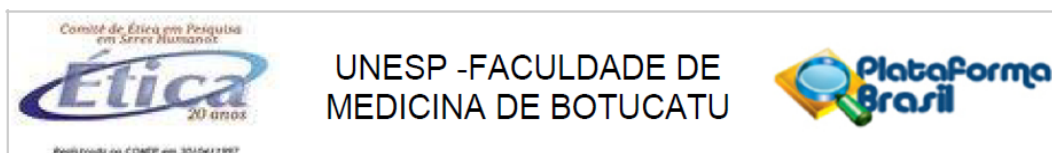
Não

BOTUCATU, 07 de Dezembro de 2017

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

ANEXO B

Aprovação de Mudança de Título pelo Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos aos resíduos de gases anestésicos que atuam em hospital veterinário

Pesquisador: DRIELLE BAPTISTA DOS SANTOS FIGUEIREDO

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 79843317.8.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Mudança de título do projeto com objetivo acadêmico

Justificativa: Mudança de título com objetivo acadêmico.

Data do Envio: 25/05/2020

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.107.984

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 24 de Junho de 2020

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))

ANEXO C

Projeto Aprovado pelo Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos

The screenshot displays the website interface for the Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos. At the top left, it features the logo of the Ministério da Saúde. The main header includes the site's name and a search bar with fields for 'USUÁRIO' and 'SENHA', an 'ENTRAR' button, and links for 'Esqueceu a senha?' and 'Registrar-se'. Below the header, there are navigation links for 'NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO' and a search bar with a 'Buscar ensaios' button and a link to 'BUSCA AVANÇADA'. The main content area shows a breadcrumb trail 'HOME / ENSAIOS REGISTRADOS /' followed by the registration details for RBR-3yb4b9.

Saúde
Ministério da Saúde

REGISTRO BRASILEIRO DE
Ensaio Clínicos

USUÁRIO SENHA **ENTRAR** Esqueceu a senha?
Registrar-se

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

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

Buscar ensaios

[BUSCA AVANÇADA](#)

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

RBR-3yb4b9
Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos ao resíduo de anestésico isoflurano que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário
Data de registro: 18 de Dez. de 2017 às 13:53
Last Update: 24 de Junho de 2020 às 14:00

APÊNDICE A**Questionário Grupo Controle****Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos ao resíduo de anestésico isoflurano que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário**

Código do indivíduo no estudo: _____

Data ___/___/___

I – Identificação

01-Nome: _____

02-Sexo: () masculino () feminino

03-Gênero: _____

04-Raça: () branca () amarela () parda () negra () outra:

05-Data nascimento ___/___/___

06-Idade: _____(Anos)

07-Peso: _____(Kg)

08-Altura: _____(Cm)

09-Origem (cidade e estado): _____

II – Informações gerais e coleta da amostra biológica

10- **Está** de jejum de 8 h?

() sim () não

10.1 - Em caso negativo, relatar que alimento ingeriu e quanto tempo:_____

11- **Dormiu** bem esta noite?

() sim () não () passou a noite trabalhando exposto aos anestésicos inalatórios

12-**Tem** alguma doença maligna (tumor e/ou câncer)?

() sim () não

12.1 - Se sim, qual?:_____

12.2 - Quando foi diagnosticado?:_____

12.3 - Fez tratamento? () sim () não

12.4 - Radioterapia? () sim () não

12.5 - Quimioterapia? () sim () não

12.6 – Finalizou o tratamento? () sim () não

12.7 – Quando finalizou o tratamento? () sim () não

12.8 – Fez cirurgia? ()sim ()não

13- **Já teve** alguma doença maligna (tumor e/ou câncer)?

() sim () não

13.1 - Se sim, qual?:_____

13.2 - Quando foi diagnosticado?:_____

13.3 - Fez tratamento? () sim () não

13.4 - Radioterapia? () sim () não

13.5 - Quimioterapia? () sim () não

13.6 – Finalizou o tratamento? () sim () não

13.7 – Quando finalizou o tratamento? () sim () não

13.8 – Fez cirurgia? ()sim ()não

14- Considera sua alimentação saudável?

() sim () não

15- Qual a frequência de realização das refeições diárias? (Assinalar na tabela abaixo)

Refeição	Frequência		
	Diariamente	Não Faz	Irregularmente
Café da manhã			
Lanche da manhã			
Almoço			
Lanche da tarde			
Jantar			
Ceia			

16- Qual o consumo alimentar? (Assinalar na tabela abaixo)

Alimento	Todos os dias	2 a 3 vezes por semana	4 vezes por mês	Rara / Nunca
Frutas				
Folhosos				
Legumes				
Leite e Derivados				
Ovos				
Carne Bovina				
Carne de Porco				
Galinha				
Peixe				
Embutidos				
Feijão				
Arroz				
Macarrão				

Pão				
Bolacha				
Doces				
Balas e chicletes				
Frituras				
Salgados assados				
Sanduíches				
Refrigerante				
Suco natural				
Suco artificial				
Café				

17- Qual o consumo de água diário:

() 1 a 3 copos () 4 a 6 copos () 7 ou mais copos

*considera-se por copo a medida aproximada de 250 ml

18- **Faz** exercícios físicos regularmente? () sim () não

18.1- Se sim, qual tipo (musculação, caminhada, pilates etc)? _____

18.2- Se sim, quantas vezes por semana? _____

19- **Fuma?**

() Sim () Não

19.1- Há quanto tempo? _____

19.2 - Quantos cigarros/dia:

() menos de meio maço () de meio a um maço

() 1 a 2 maços () mais de 2 maços

19.3 - Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, sem filtro, etc)?:

*1 maço = 20 cigarros/dia

20- Já fumou alguma vez?

() Sim () Não

20.1-Quantos cigarros/dia fumava:

() menos de meio maço () de meio a um maço

() 1 a 2 maços () mais de 2 maços

() apenas experimentou

*1 maço = 20 cigarros/dia

20.2-Durante quanto tempo fumou?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

20.3-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, sem filtro, etc)?: _____

20.4- E a quanto tempo parou?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

21- **Fuma** ou já fumou alguma substância utilizando o cachimbo tipo Narguile?

() sim () não Qual substância? _____

22.1- Com que frequência/quantas vezes fuma?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

22.2- Se parou com
que frequência fumava? _____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

22- Consome bebida alcoólica?

() sim () não

22.1- Se sim, quantas vezes por semana:

() somente aos finais de semana () somente em eventos sociais

() 1 a 3 dias () 4 ou mais dias

22.2 - Se sim, quantas doses por semana:

() até 2 doses () de 3 a 4 doses () de 5 a 6 doses

() de 7 a 9 doses () acima de 10 doses

*considera-se 1 dose: meia garrafa ou 1 lata de cerveja, 1 cálice de vinho ou 1 dose de bebidas destiladas (aguardente, whisky, etc)

22.3- Qual tipo de bebida mais consome (cachaça, cerveja, whisky, vinho, etc)? _____

23- Já fez uso crônico de álcool, ou seja, já foi alcoolista?

() sim () não

23.1- Se sim, quando foi a última vez que consumiu álcool?
 _____(meses)_____(anos)_____(dias)

23.2 – Por quanto tempo? _____(meses)_____(anos)_____(dias)

24- **Consome** drogas ilícitas?

() sim () não

24.1 - Se sim, qual tipo e por qual via? _____

24.2 - Há quanto tempo? _____(meses)_____(anos)_____(dias)

25- Já consumiu algum tipo de droga ilícita?

() sim () não

25.1- Se sim, qual tipo e por qual via? _____

25.2- Por quanto tempo? _____(meses)_____(anos)_____(dias)

25.3- Há quanto tempo parou?
 _____(meses)_____(anos)_____(dias)

26- **Faz uso** de anabolizante?

() sim () não

26.1- Se sim qual e há quanto tempo?
 _____(meses)_____(anos)_____(dias)

27- Já fez alguma vez uso de anabolizante?

() sim () não

27.1- Se sim qual e quando foi a última vez que usou? _____

27.2- Por quanto tempo usou?
 _____(meses)_____(anos)_____(dias)

28- **Faz uso** de suplementação para atletas?

() sim () não

28.1- Se sim qual?_____

28.2- Há quanto tempo?_____ (meses)_____ (anos)_____ (dias)

29- **Já fez** uso de vitamina/antioxidante (complexo vitamínico)?

() sim () não

29.1- Se sim, qual (is)?_____ (marca e/ou composto)

29.2- Frequência/dia:_____

29.3 - Há quanto tempo parou?_____ (meses)_____ (anos)_____ (dias)

30- **Atualmente faz uso** de vitamina/antioxidante (complexo vitamínico)?

() sim () não

30.1- Se sim, qual (is)?_____ (marca e/ou composto)

30.2 - Nome comercial:_____

30.2.1- Frequência/dia:_____

30.2.2 - Há quanto tempo? _____ (meses)_____ (anos)_____ (dias)

III - História Médica

31- **Foi submetido** a raio X, tomografia ou radioscopia (exame de imagem realizada durante procedimento cirúrgico inclusive dentário) recentemente (no último mês)?

() sim () não

31.1- Quando?_____

31.2- Sabe quantas chapas ou tomografias foram feitas?_____

32- **Tem** alguma doença (asma, hipertensão, diabetes, hepatite, lúpus, artrite, etc)?

sim não

32.1- Qual? _____

33- **Já teve** alguma doença grave?

sim não

34.1- Se sim, qual? _____

34.2- Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

34- **Faz** ou **fez** uso contínuo de algum tipo de medicamento, se sim, quais:

antibiótico anti-inflamatório analgésico

anti-hipertensivo corticóide anti-convulsivante

insulina hipoglicemiante relaxantes musculares

hormônios anti-histamínicos tranquilizantes

fitoterápicos homeopáticos inibidores de apetite

antiácidos antidepressivo ansiolítico

Outro especifique: _____

34.1- Frequência? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

34.2 – Há quanto tempo foi? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

34.3- Há quanto tempo parou? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

35- **Tomou** alguma medicação no último mês (tratamento esporádico)?

sim não

35.1 - Se sim, qual (is)?

antibiótico anti-inflamatório analgésico

anti-hipertensivo corticóide anti-convulsivante

insulina hipoglicemiante relaxantes musculares

hormônios anti-histamínicos tranquilizantes

fitoterápicos homeopáticos inibidores de apetite

() antiácidos () antidepressivo () ansiolítico

() outros – quais: _____

35.2 - Frequência/dia: _____

35.3 - Há quanto tempo
parou? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

36- Teve alguma infecção ou inflamação no último mês?

() sim () não

36.1- Se sim, qual (is)? _____

36.2- Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

37- **Está** resfriado ou gripado?

() sim () não

38- Já fez alguma cirurgia?

() sim () não

38.1- Se sim, quais e quantas vezes? _____

38.2- Há quanto tempo foi a
última? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

38.3 – Tomou anestesia? () sim () não

38.3.1 – Se sim qual? _____

39- Já foi submetido à anestesia geral?

() sim () não

39.1 - Se sim para anestesia geral, sabe se recebeu anestesia inalatória?() sim
() não

39.2- Se sim, qual anestésico? _____

39.3 - Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

IV – Atividade Profissional

40 – Qual sua área de atuação profissional?

41 – No seu trabalho sofre algum tipo de exposição ocupacional ex: radiação, pesticidas, solventes, etc?

() Sim () Não

41.1 Se sim, qual? _____

41.2 Se sim, a quanto tempo está exposto? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

42 – Já teve alguma ocupação profissional onde teve exposição ocupacional ex: radiação, pesticidas, solventes, etc?

() Sim () Não

42.1 Se sim, qual? _____

42.2 Se sim, a quanto tempo está exposto? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

43- Após um dia de trabalho sente algum dos sintomas/sinais abaixo?

() sim () não

Quais?:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| () náusea | () fadiga |
| () cansaço extremo | () tontura |
| () cefaleia/enxaqueca | () agitação |
| () dificuldade de concentração | () baixo rendimento |
| () dificuldade para dormir/insônia | () sintomas depressivos |
| () infecções mais frequentes | () irritação das vias aéreas |
| () enjôo | () vômito |
| () sistema imunológico debilitado | () desânimo |
| () estafa/ <i>burnout</i> | () irritação |

- () sonolência () memória fraca
 () outros: _____

43.1 - Se sim, qual a frequência semanal?

- () 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () 4 vezes () 5 vezes () ≥ 6

vezes

44- Já trabalhou em hospital?

- () Sim () Não

44.1 Se sim, quando foi? _____

44.2 Se sim em qual setor? _____

45- Gostaria de acrescentar alguma informação que considere importante?

Se homem - Parte reprodutiva:

46-Tem filhos BIOLÓGICO?

- () sim () não

46.1 - Se sim, sua parceira demorou para engravidar? () sim () não

46.2 - Se sim, precisou de algum tratamento para engravidar? () sim () não

46.3 - Se sim, algum dos dois apresenta ou apresentou algum tipo de problema?

- () sim () não

46.3.1 - Se sim, quem e qual(is) os problemas:

46.4 - Se sim, sua parceira teve algum problema com a gestação? () sim ()

não

46.4.1- Se sim, qual (is): _____

46.5- No momento estão tentando engravidar () sim () não

46.5.1- Se sim, a quanto tempo estão tentando? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

46.6 - Fez ou faz algum tipo de tratamento para engravidar? () sim () não

46.6.1- Se sim, qual (is): _____

46.6.2-Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias).

47- Sabe se sua parceira já teve algum aborto espontâneo? () sim () não

47.1- Se sim, quantos? _____

47.2- Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

48- Sua parceira tem alguma exposição ocupacional? () sim () não

48.1- Se sim, qual: _____

49- Sabe se você ou sua parceira tem algum problema de infertilidade?

() sim () não

Se mulher - Parte reprodutiva:

50- Tem ciclo menstrual regular?

() sim () não

50.1 - Se não, sabe a causa? _____

51- Faz uso de anticoncepcional?

() sim () não

51.1- Se sim, que tipo:

oral injetável adesivo transdérmico

implante subcutâneo outros: _____

Nome comercial: _____

52.2 - Se sim, há quanto tempo? _____

53- Faz algum tipo de reposição hormonal?

sim não

53.1- Se sim, que tipo:

oral injetável adesivo transdérmico

implante subcutâneo outros: _____

53.2 - Se sim, há quanto tempo? _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

54- Tem filhos BIOLÓGICOS?

sim não

54.1- Se sim, demorou para engravidar? sim não

54.2 - Se sim, precisou de algum tratamento para engravidar? sim
 não

54.3 - Se sim, algum apresenta algum tipo de problema? sim não

54.3.1- Se sim, qual (is): _____

54.4 - Se sim, você teve algum problema com a gestação? sim não

54.4.1- Se sim, qual (is): _____

54.5 - Se não, já tentou engravidar? sim não

54.6 - Se sim, há quanto tempo está tentando engravidar? _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

54.7 - Fez ou faz algum tipo de tratamento para engravidar? sim não

54.7.1- Se sim, qual (is): _____

54.7.2- Há quanto tempo? _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

55- Sabe se já teve algum aborto espontâneo durante período que trabalhou/trabalha em centro cirúrgico ou em momento anterior?

() sim () não

obs: _____

55.1 - Se sim, quantos? _____

55.2 - Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

56- Se tiver parceiro(a), sabe se tem alguma exposição ocupacional?

() sim () não

56.1 - Se sim, qual: _____

57- Sabe se você ou seu parceiro tem algum problema de infertilidade?

() sim () não

APÊNDICE B**Questionário Grupo Exposto****Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos ao resíduo de anestésico isoflurano que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário**

Código do indivíduo no estudo: _____

Data ____/____/____

I – Identificação

01-Nome: _____

02-Sexo: () masculino () feminino

03-Gênero: _____

04-Raça: () branca () amarela () parda () negra () outra:

05-Data nascimento ____/____/____

06-Idade: _____(Anos)

07-Peso: _____(Kg)

08-Altura: _____(Cm)

09-Origem (cidade e estado): _____

II – Informações gerais e coleta da amostra biológica

10- **Está** de jejum de 8 h?

() sim () não

10.1 - Em caso negativo, relatar que alimento ingeriu e quanto tempo:_____

11- **Dormiu** bem esta noite?

() sim () não () passou a noite trabalhando exposto aos anestésicos inalatórios

12-**Tem** alguma doença maligna (tumor e/ou câncer)?

() sim () não

12.1 - Se sim, qual?:_____

12.2 - Quando foi diagnosticado?:_____

12.3 - Fez tratamento? () sim () não

12.4 - Radioterapia? () sim () não

12.5 - Quimioterapia? () sim () não

12.6 – Finalizou o tratamento? () sim () não

12.7 – Quando finalizou o tratamento? () sim () não

12.8 – Fez cirurgia? ()sim ()não

13- **Já teve** alguma doença maligna (tumor e/ou câncer)?

() sim () não

13.1 - Se sim, qual?:_____

13.2 - Quando foi diagnosticado?:_____

13.3 - Fez tratamento? () sim () não

13.4 - Radioterapia? () sim () não

13.5 - Quimioterapia? () sim () não

13.6 – Finalizou o tratamento? () sim () não

13.7 – Quando finalizou o tratamento? () sim () não

13.8 – Fez cirurgia? ()sim ()não

14- Considera sua alimentação saudável?

() sim () não

15- Qual a frequência de realização das refeições diárias? (Assinalar na tabela abaixo)

Refeição	Frequência		
	Diariamente	Não Faz	Irregularmente
Café da manhã			
Lanche da manhã			
Almoço			
Lanche da tarde			
Jantar			
Ceia			

16- Qual o consumo alimentar? (Assinalar na tabela abaixo)

Alimento	Todos os dias	2 a 3 vezes por semana	4 vezes por mês	Rara / Nunca
Frutas				
Folhosos				
Legumes				
Leite e Derivados				
Ovos				
Carne Bovina				
Carne de Porco				
Galinha				
Peixe				
Embutidos				
Feijão				
Arroz				
Macarrão				

Pão				
Bolacha				
Doces				
Balas e chicletes				
Frituras				
Salgados assados				
Sanduíches				
Refrigerante				
Suco natural				
Suco artificial				
Café				

17- Qual o consumo de água diário:

() 1 a 3 copos () 4 a 6 copos () 7 ou mais copos

*considera-se por copo a medida aproximada de 250 ml

18- **Faz** exercícios físicos regularmente? () sim () não

18.1- Se sim, qual tipo (musculação, caminhada, pilates etc)? _____

18.2- Se sim, quantas vezes por semana? _____

19- **Fuma?**

() Sim () Não

19.1- Há quanto tempo? _____

19.2 - Quantos cigarros/dia:

() menos de meio maço () de meio a um maço

() 1 a 2 maços () mais de 2 maços

19.3 - Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, sem filtro, etc)?:

*1 maço = 20 cigarros/dia

20- Já fumou alguma vez?

Sim Não

20.1-Quantos cigarros/dia fumava:

menos de meio maço de meio a um maço

1 a 2 maços mais de 2 maços

apenas experimentou

*1 maço = 20 cigarros/dia

20.2-Durante quanto tempo fumou?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

20.3-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, sem filtro, etc)?: _____

20.4- E a quanto tempo parou?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

21- **Fuma** ou já fumou alguma substância utilizando o cachimbo tipo Narguile?

sim não Qual substância? _____

22.1- Com que frequência/quantas vezes fuma?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

22.2- Se parou com
que frequência fumava? _____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

22- Consome bebida alcoólica?

sim não

22.1- Se sim, quantas vezes por semana:

somente aos finais de semana somente em eventos sociais

1 a 3 dias 4 ou mais dias

22.2 - Se sim, quantas doses por semana:

até 2 doses de 3 a 4 doses de 5 a 6 doses

de 7 a 9 doses acima de 10 doses

*considera-se 1 dose: meia garrafa ou 1 lata de cerveja, 1 cálice de vinho ou 1 dose de bebidas destiladas (aguardente, whisky, etc)

22.3- Qual tipo de bebida mais consome (cachaça, cerveja, whisky, vinho, etc)? _____

23- Já fez uso crônico de álcool, ou seja, já foi alcoolista?

() sim () não

23.1- Se sim, quando foi a última vez que consumiu álcool?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

23.2 – Por quanto tempo? _____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

24- **Consome** drogas ilícitas?

() sim () não

24.1 - Se sim, qual tipo e por qual via? _____

24.2 - Há quanto tempo? _____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

25- Já consumiu algum tipo de droga ilícita?

() sim () não

25.1- Se sim, qual tipo e por qual via? _____

25.2- Por quanto tempo? _____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

25.3- Há quanto tempo parou?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

26- **Faz uso** de anabolizante?

() sim () não

26.1- Se sim qual e há quanto tempo?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

27- Já fez alguma vez uso de anabolizante?

() sim () não

27.1- Se sim qual e quando foi a última vez que usou? _____

27.2- Por quanto tempo usou?
_____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

28- **Faz uso** de suplementação para atletas?

() sim () não

28.1- Se sim qual?_____

28.2- Há quanto tempo?_____ (meses)_____ (anos)_____ (dias)

29- **Já fez** uso de vitamina/antioxidante (complexo vitamínico)?

() sim () não

29.1- Se sim, qual (is)?_____ (marca e/ou composto)

29.2- Frequência/dia:_____

29.3 - Há quanto tempo parou?_____ (meses)_____ (anos)_____ (dias)

30- **Atualmente faz uso** de vitamina/antioxidante (complexo vitamínico)?

() sim () não

30.1- Se sim, qual (is)?_____ (marca e/ou composto)

30.2 - Nome comercial:_____

30.2.1- Frequência/dia:_____

30.2.2 - Há quanto tempo? _____ (meses)_____ (anos)_____ (dias)

III - História Médica

31- **Foi submetido** a raio X, tomografia ou radioscopia (exame de imagem realizada durante procedimento cirúrgico inclusive dentário) recentemente (no último mês)?

() sim () não

31.1- Quando?_____

31.2- Sabe quantas chapas ou tomografias foram feitas?_____

32- **Tem** alguma doença (asma, hipertensão, diabetes, hepatite, lúpus, artrite, etc)?

() sim () não

32.1- Qual? _____

33- **Já teve** alguma doença grave?

() sim () não

34.1- Se sim, qual? _____

34.2- Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

34- **Faz** ou **fez** uso contínuo de algum tipo de medicamento, se sim, quais:

() antibiótico () anti-inflamatório () analgésico

() anti-hipertensivo () corticóide () anti-convulsivante

() insulina () hipoglicemiante () relaxantes musculares

() hormônios () anti-histamínicos () tranquilizantes

() fitoterápicos () homeopáticos () inibidores de apetite

() antiácidos () antidepressivo () ansiolítico

() Outro especifique: _____

34.1- Frequência? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

34.2 – Há quanto tempo foi? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

34.3- Há quanto tempo parou? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

35- **Tomou** alguma medicação no último mês (tratamento esporádico)?

() sim () não

35.1 - Se sim, qual (is)?

() antibiótico () anti-inflamatório () analgésico

() anti-hipertensivo () corticóide () anti-convulsivante

() insulina () hipoglicemiante () relaxantes musculares

() hormônios () anti-histamínicos () tranquilizantes

() fitoterápicos () homeopáticos () inibidores de apetite

IV – Atividade Profissional

40- Assinale qual ou quais funções desempenha na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu ou no centro cirúrgico do Hospital Veterinário?

- () Docente - Departamento: _____
- () Residente - Departamento: _____
- () Técnico
- () Cirurgião
- () Anestesiologista
- () Outro especifique: _____

41- Em relação à atuação, há quanto tempo está atuando?

- () Docente () ____ dias () ____ meses () ____ anos
- () Residente () ____ dias () ____ meses () ____ anos
- () Circulante () ____ dias () ____ meses () ____ anos
- () Técnico () ____ dias () ____ meses () ____ anos
- () Cirurgião () ____ dias () ____ meses () ____ anos
- () Anestesiologista () ____ dias () ____ meses () ____ anos
- () Outro _____ () ____ dias () ____ meses () ____ anos

42 – Em quais locais a sua atuação é mais frequente?

- () Sala operatória de grandes animais
- () Sala operatória de pequenos animais
- () Sala operatória de reprodução

42.1 – Qual a frequência: () 1x semana () 2x semana () 3x semana () 4x semana () Todos dias da semana

42.2 – Qual o total de horas semanais? _____

- () Experimental
- () Outro _____

43 – **Faz** pesquisa das quais se utiliza anestésico inalatório?

() sim () não

43.1 – Se sim quais?

43.2 – Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

44- No exercício da sua função tem contato com substâncias tóxicas?

() sim () não

44.1- Se sim, qual? _____

44.2 - Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

45 - Quando iniciou a carreira, qual tipo de anestesia era mais utilizado?

() inalatória () venosa

45.1-Quais anestésicos inalatórios eram utilizados?

45.2- Qual sistema era utilizado com frequência? _____

46- **Trabalha** em outros lugares?

() sim () não

46.1- Se sim, qual é? _____

46.2 - Você faz plantões no local acima, em centro cirúrgico (final de semana ou de noite)?

() sim () não

46.3 - Se sim, você é exposto aos anestésicos inalatórios?

() sim () não

46.4 – Se sim quais?

46.5 - Qual a frequência de exposição: ? _____(dias na semana) _____(horas p/ dia))

47 – Já atuou em centro cirúrgico humano?

() Sim () Não

47.1 Se sim, quais os anestésicos era exposto? _____

47.2 Por quanto ficou exposto?

? _____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

47.3 Há quanto tempo deixou de ser exposto?

? _____ (meses) _____ (anos) _____ (dias)

48- **Há quanto** tempo está exposto aos anestésicos inalatórios?

_____ horas p/dia _____ dias _____ meses _____ anos

49- **Tem exposição** à radiação (raio-X, tomografia, radioscopia)?

() sim () não

49.1 - Se sim, qual a frequência/semana? _____ dias

49.2 - Quando se expõe usa proteção?

() não () sim:

() jaleco de chumbo

() tireoide

() tireoide e jaleco de chumbo

obs: _____

50- Atualmente realiza ou participa mais de anestesia inalatória ou venosa?

51- Qual a frequência (vezes e %) de cada anestesia (manutenção) por semana?

Venosa: _____

Inalatória: _____

Obs: _____

52- Quando realiza ou participa de anestesia inalatória quais anestésicos são mais utilizados?

() isoflurano () sevoflurano () não sabe () outro: _____

53- Qual o fluxo (l/min) de gás fresco predominantemente utilizado durante a anestesia?

- () Baixo _____
 () Médio _____
 () Não sabe

54- Após um dia de trabalho sendo exposto aos anestésicos inalatórios sente algum dos sintomas/sinais abaixo?

- () sim () não

Quais?:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| () náusea | () fadiga |
| () cansaço extremo | () tontura |
| () cefaleia/enxaqueca | () agitação |
| () dificuldade de concentração | () baixo rendimento |
| () dificuldade para dormir/insônia | () sintomas depressivos |
| () infecções mais frequentes | () irritação das vias aéreas |
| () enjôo | () vômito |
| () sistema imunológico debilitado | () desânimo |
| () estafa/burnout | () irritação |
| () sonolência | () memória fraca |
| () outros: _____ | |

54.1 - Se sim, qual a frequência semanal?

- () 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () 4 vezes () 5 vezes () ≥ 6

vezes

54.2 - Quando começou a trabalhar no centro cirúrgico algum sintoma era mais frequente?

- () sim () não Se sim, qual (is): _____

54.4 - Sente que os sintomas diminuíram com o passar do tempo?

- () sim () não

54.5 - Se sim, quando diminuíram? _____

55- Tira férias anualmente?

sim não

55.1 Se sim, por quanto tempo:

≤ 15 dias 30 dias outro: _____

56- Durante o período de férias, continua tendo exposição aos anestésicos inalatórios?

sim não

Frequência: _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

57- Tirou férias ou se afastou do centro cirúrgico recentemente?

sim não período: _____

57.1 - Se sim, teve exposição aos anestésicos inalatórios?

_____ dias _____ semanas _____ meses

57.2 - Se sim, há quanto tempo não está mais exposto aos resíduos de gases anestésicos?

dias meses obs: _____

58 – Se afastou recentemente de suas atividades no centro cirúrgico e ficou sem exposição aos anestésicos inalatórios?

sim não período: _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

59 - Teve exposição aos anestésicos inalatórios no dia de ontem ou nesta madrugada?

sim não

59.1- Se sim, por quanto tempo? _____ horas

59.2- Se sim, qual(is) anestésico(s)?

isoflurano sevoflurano Outro

60- Ao longo da atuação profissional?

60.1- Sofreu acidente? () sim () não obs:

60.2- Teve algum acidente com perfuro-cortante? () sim () não obs:

61- Gostaria de acrescentar alguma informação que considere importante?

Se homem - Parte reprodutiva:

62-Tem filhos biológicos?

() sim () não

62.1 - Se sim, sua parceira demorou em engravidar? () sim () não

62.2 - Se sim, precisou de algum tratamento para engravidar? () sim () não

62.3 - Se sim, algum dos dois apresenta ou apresentou algum tipo de problema?(
) sim () não

62.3.1 - Se sim, quem e qual (is): _____

62.4 - Se sim, sua parceira teve algum problema com a gestação? () sim ()
não

62.4.1- Se sim, qual(is) o problema: _____

62.5- No momento estão tentando engravidar () sim () não

62.5.1- Se sim, há quanto tempo estão
tentando? _____(meses) _____(anos) _____(dias) 62.6 - Fez ou faz

algum tipo de tratamento para engravidar? () sim () não

62.6.1- Se sim, qual (is): _____

62.6.2- Há quanto tempo?
 _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

63- Sabe se sua parceira já teve algum aborto espontâneo? () sim () não

63.1- Se sim, quantos? _____

63.2- Há quanto temp ? _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

64- Sua parceira tem alguma exposição ocupacional? () sim () não

64.1- Se sim, qual: _____

65- Sabe se você ou sua parceira tem algum problema de infertilidade?

() sim () não

Se mulher - Parte reprodutiva:

66-Tem ciclo menstrual regular?

() sim () não

66.1 - Se não, sabe a causa? _____

67- Faz uso de anticoncepcional?

() sim () não

67.1- Se sim, que tipo:

() oral () injetável () adesivo transdérmico () implante subcutâneo

() outro: _____

Nome comercial: _____

67.2 - Há quanto tempo usa? _____(meses)_____ (anos)_____ (dias)

68- Faz algum tipo de reposição hormonal?

sim não

68.1- Se sim, que tipo:

oral injetável adesivo transdérmico implante subcutâneo

outros: _____

68.2 - Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

69- Tem filhos biológicos?

sim não

69.1- Se sim, demorou em engravidar? sim não

69.2 - Se sim, precisou de algum tratamento para engravidar? sim
 não

69.3 - Se sim, algum apresenta algum tipo de problema? sim não

69.3.1- Se sim, qual (is): _____

69.4 - Se sim, você teve algum problema com a gestação? sim não

69.4.1- Se sim, qual (is): _____

69.5 - Se não, já tentou engravidar? sim não

69.6 - Se sim, há quanto tempo está tentando engravidar? _____(meses) _____(anos) _____(dias) 69.7 - Fez ou faz algum tipo de tratamento para engravidar? sim não

69.7.1- Se sim, qual (is): _____

69.7.2- Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

70- Sabe se já teve algum aborto espontâneo durante período que trabalhou/trabalha em centro cirúrgico ou em momento anterior?

sim não

obs: _____

70.1 - Se sim, quantos: _____

70.2 - Há quanto tempo? _____(meses) _____(anos) _____(dias)

71- Se tiver parceiro, sabe se tem alguma exposição ocupacional?

sim não

71.1 - Se sim, qual: _____

72- Sabe se você ou seu (sua) parceiro (a) tem algum problema de infertilidade?

sim não

APÊNDICE C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/2012)

Grupo Controle

O(a) sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos ao resíduo de anestésico isoflurano que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário”, que pretende avaliar se os anestésicos inalatórios podem promover possíveis efeitos tóxicos no organismo de profissionais expostos (profissionais do centro cirúrgico do hospital veterinário), seja em nível molecular (integridade do DNA - componente que determina características individuais presente nas células do sangue), celular ou sistêmico. Para checar esses efeitos, serão realizados testes que avaliam os danos no DNA e em células, além de urina, sangue e células da mucosa bucal.

O sr(a) foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa devido a necessidade de um grupo controle para comparação de resultados do estudo com indivíduos expostos aos resíduos de gases anestésicos (grupo exposto), pois o estudo será realizado com voluntários de ambos os sexos sendo profissionais adultos expostos aos resíduos de gases anestésicos em centro cirúrgico veterinário e voluntários adultos (indivíduos que não trabalhem na área hospitalar e não tenham exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos), pareados por idade, sexo e estilo de vida com o grupo exposto. Serão excluídos indivíduos com doenças malignas, infecciosas ou inflamatórias, os que fazem uso de suplementos vitamínicos/antioxidantes, medicamentos ou drogas ilícitas, consumo pesado de álcool ou que tenha atuado em alguma área com exposição ocupacional.

Será realizado um questionário contendo dados pessoais (nome, data de nascimento, sexo, peso, altura, etc), estilo de vida (alimentação, prática de exercícios físicos, exposição a substâncias tóxicas, uso de bebida alcoólica, tabaco e drogas ilícitas, etc) e história médica (uso de medicamentos e suplementos vitamínicos, doenças, etc); todas as informações são de caráter confidencial e sua identidade será preservada. O questionário durará cerca de 30 minutos e será aplicado pela própria pesquisadora com agendamento prévio por meio de contato telefônico. Durante a aplicação do questionário não será utilizado qualquer tipo de recurso para armazenamento de imagem ou voz. As informações relatadas pelo(a) sr(a) serão transcritas e armazenadas para o fornecimento de dados complementares durante a análise dos resultados da pesquisa.

Desta forma, solicitamos seu consentimento para que, logo após a entrevista, pela manhã, em jejum de 8 horas, seja coletada uma amostra de 40 ml de sangue periférico, duas amostras de células esfoliadas de ambos os lados da cavidade oral (bochecha) e uma amostra isolada de urina sendo esta preferencialmente a primeira da manhã. A coleta será realizada por profissional experiente e o procedimento causa apenas o desconforto da picada para coleta de sangue venoso com risco mínimo, já que será utilizado material estéril e descartável. A participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução Nº 466/12.

Parte das amostras biológicas colhidas do(a) Senhor(a) será utilizada e o restante será armazenado na Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEX, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para serem utilizadas em um novo(s) projeto(s) de pesquisa. Dessa forma, solicito seu consentimento para reutilização desse material em futuro projeto(s) de pesquisa, no qual serão realizados testes adicionais para melhor entendimento dos possíveis efeitos tóxicos dos resíduos dos gases anestésicos no organismo humano.

A realização desta pesquisa permitirá um melhor entendimento dos efeitos dessa exposição ocupacional aos anestésicos na saúde e conhecer as concentrações anestésicas residuais para possível melhoria das condições de trabalho nas salas operatórias veterinárias no sentido de minimizar os possíveis efeitos tóxicos causados pelos resíduos de gases anestésicos.

Caso o(a) sr(a) não queira participar da pesquisa, é seu direito e não haverá nenhum prejuízo. O(a) sr(a) poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo. Se houver interesse, o(a) sr(a) poderá consultar o andamento da pesquisa solicitando informações por meio do telefone ou e-mail da pesquisadora do projeto e, se necessário, por meio do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

O(a) sr(a) receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pela pesquisadora por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8h às 11h30 e das 14h às 17h, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem, no entanto, que minha identidade seja revelada.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Pesquisadora: Drielle B. dos S. Figueiredo

Fone: (14) 99616 7608

End.: Rua Gregório Pedro Garcia, 1022 - Jd Itamaraty, Botucatu-SP

CEP: 18608-012

Assinatura: _____

E-mail: drielle.bap@hotmail.com

Orientadora: Mariana Gobbo Braz, Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu-SP. Fone: (14) 3880-1650.

E-mail: mgbraz@fmb.unesp.br

APÊNDICE D

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/2012)

Grupo Exposto

O(a) sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais expostos ao resíduo de anestésico isoflurano que atuam em centro cirúrgico de hospital veterinário”, que pretende avaliar se os resíduos dos gases anestésicos podem promover possíveis efeitos tóxicos no organismo de profissionais expostos (profissionais do centro cirúrgico do hospital veterinário), seja em nível molecular (integridade do DNA - componente que determina características individuais presente nas células do sangue), celular ou sistêmico. Para checar esses efeitos, serão realizados testes que avaliam os danos no DNA e em células, além de urina, sangue e células da mucosa bucal.

O(a) sr(a) foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa devido a sua atuação em salas operatórias veterinária, pois o estudo será realizado com voluntários de ambos os sexos sendo profissionais adultos expostos aos resíduos de gases anestésicos (médicos veterinários - docentes e residentes das áreas de anestesiologia e cirurgia e técnicos que atuam nas salas operatórias), e voluntários adultos não expostos aos resíduos de gases anestésicos (indivíduos saudáveis, que não trabalhem na área hospitalar e não tenham exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos), pareados por idade, sexo e estilo de vida com o grupo exposto. Serão excluídos indivíduos com doenças malignas, infecciosas ou inflamatórias, os que fazem uso de suplementos vitamínicos/antioxidantes, medicamentos ou drogas ilícitas, consumo pesado de álcool ou que tenha atuado em alguma área com exposição ocupacional.

Será realizado um questionário contendo dados pessoais (nome, data de nascimento, sexo, peso, altura, etc), estilo de vida (alimentação, prática de exercícios físicos, exposição a substâncias tóxicas, uso de bebida alcoólica, tabaco e drogas ilícitas, etc) e história médica (uso de medicamentos e suplementos vitamínicos, doenças, etc); todas as informações são de caráter confidencial e sua identidade será preservada. O questionário durará cerca de 30 minutos e será aplicado pela própria pesquisadora com agendamento prévio por meio de contato telefônico. Durante a aplicação do questionário não será utilizado qualquer tipo de recurso para armazenamento de imagem ou voz. As informações relatadas pelo(a) sr(a) serão transcritas e armazenadas para o fornecimento de dados complementares durante a análise dos resultados da pesquisa.

Desta forma, solicitamos seu consentimento para que, logo após a entrevista, pela manhã, em jejum de 8 horas, seja coletada uma amostra de 40 ml de sangue periférico, duas amostras de células esfoliadas de ambos os lados da cavidade oral (bochecha) e uma amostra isolada de urina sendo esta preferencialmente a primeira da manhã. A coleta será realizada por profissional experiente e o procedimento causa apenas o desconforto da picada para coleta de sangue venoso com risco mínimo, já que será utilizado material estéril e descartável. A participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução Nº 466/12.

Parte das amostras biológicas colhidas do(a) Senhor(a) será utilizada e o restante será armazenado na Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEX, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para serem utilizadas em um novo(s) projeto(s) de pesquisa. Dessa forma, solicito seu consentimento para reutilização desse material em futuro projeto(s) de pesquisa, no qual serão realizados testes adicionais para melhor entendimento dos possíveis efeitos tóxicos dos resíduos dos gases anestésicos no organismo humano.

A realização desta pesquisa permitirá um melhor entendimento dos efeitos dessa exposição ocupacional aos anestésicos na saúde e conhecer as concentrações anestésicas residuais para possível melhoria das condições de trabalho nas salas operatórias veterinárias no sentido de minimizar os possíveis efeitos tóxicos causados pelos resíduos de gases anestésicos.

Caso o(a) sr(a) não queira participar da pesquisa, é seu direito e não haverá nenhum prejuízo. O(a) sr(a) poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo. Se houver interesse, o(a) sr(a) poderá consultar o andamento da pesquisa solicitando informações por meio do telefone ou e-mail da pesquisadora do projeto e, se necessário, por meio do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

O(a) sr(a) receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pela pesquisadora por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8h às 11h30 e das 14h às 17h, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem, no entanto, que minha identidade seja revelada.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Pesquisadora: Drielle B. dos S. Figueiredo

End.: Rua Gregório Pedro Garcia, 1022 - Jd Itamaraty, Botucatu-SP

CEP: 18608-012

Fone: (14) 99616 7608

Assinatura: _____

E-mail: drielle.bap@hotmail.com

Orientadora: Mariana Gobbo Braz, Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu-SP. Fone: (14) 3880-1650.

E-mail: mgbraz@fmb.unesp.br