

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2021.



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 *Ttc*. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/563

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”. 1^a 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: esquentada e esfria, apertada 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>BM_{Cyt} 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- <i>AAD</i>	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 <i>CD3⁺</i> 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; Rasis *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).

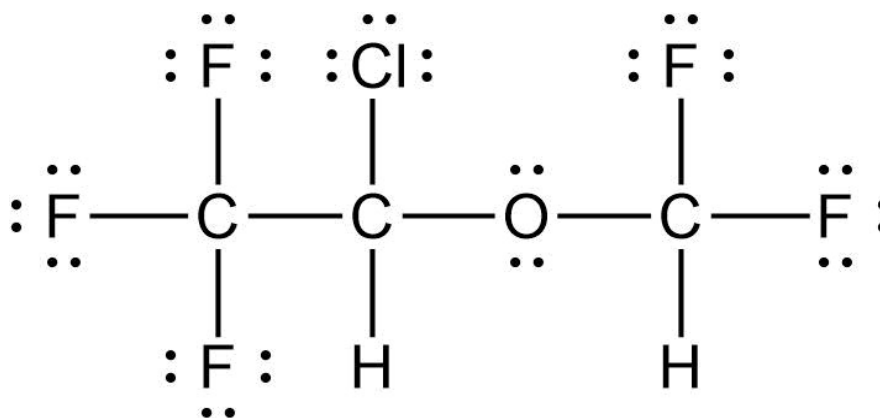


Figura 1. Estrutura química do isoflurano.

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 anestesiólogos 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 anestesiólogos e esposas de anestesiólogos 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 (Düsmen *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).

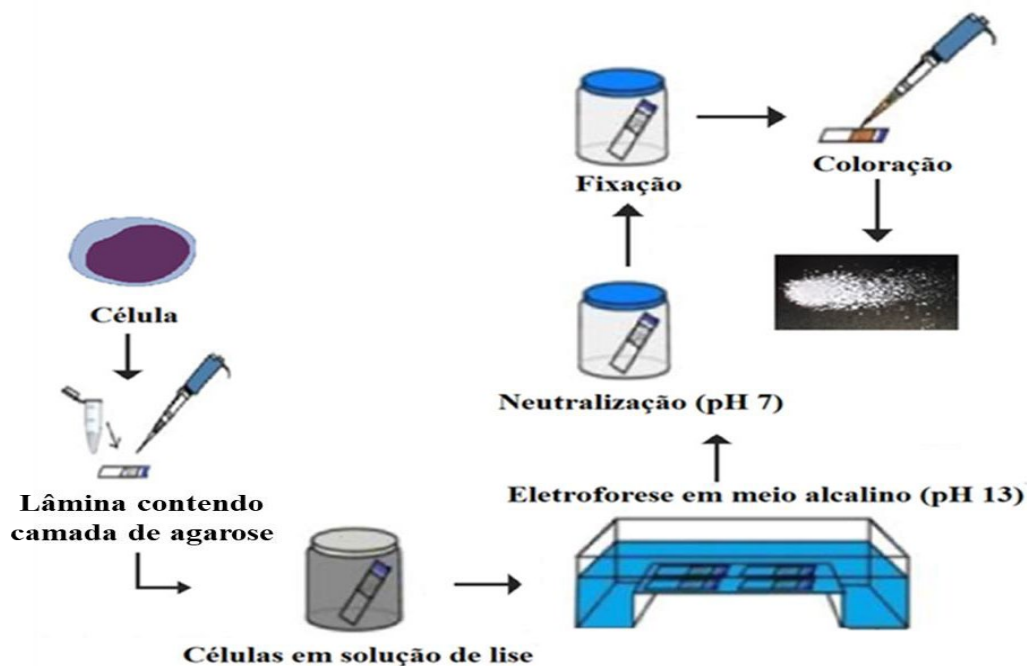


Figura 2. Representação das etapas do teste do cometa alcalino.

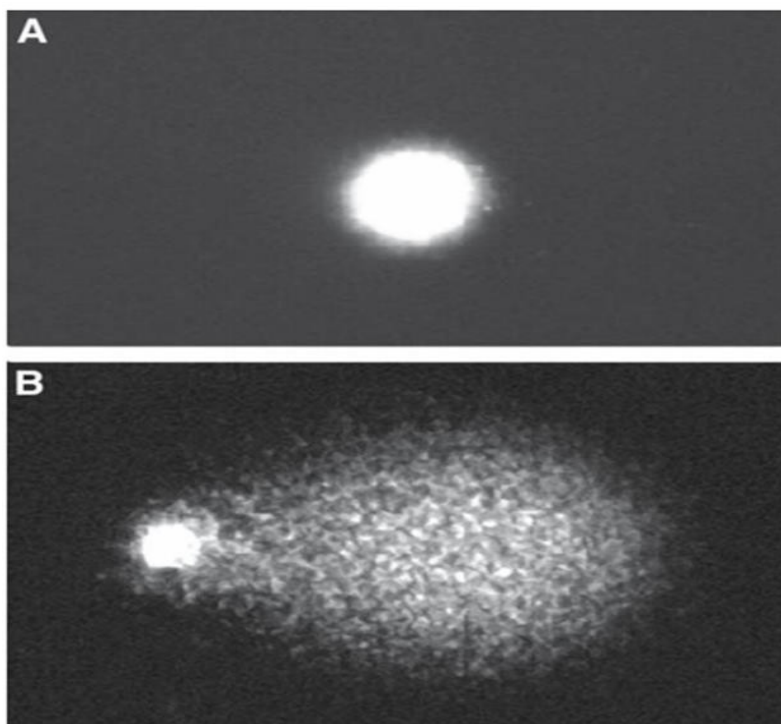


Figura 3. Imagens representativas de nucleoides (A) sem danos e (B) com danos avaliados pelo teste do cometa. Fonte: Speit & Hartmann (2005).

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 (Jaloszynski *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 (Jaloszynski *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).

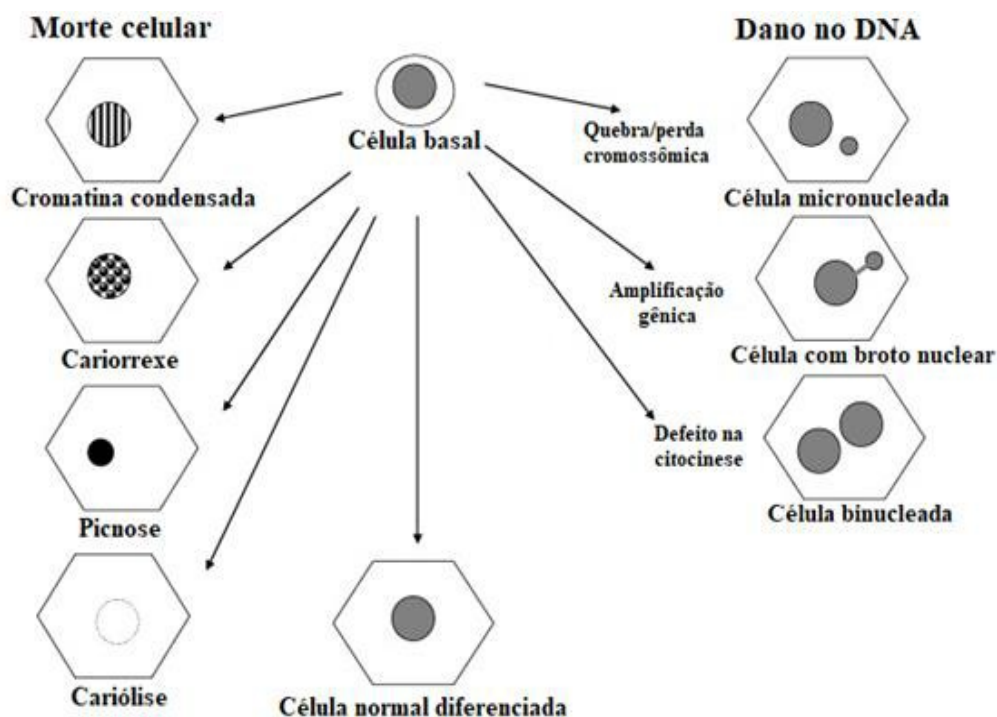


Figura 4. Esquema representativo da cavidade oral com os dois tipos celulares e diferentes parâmetros que podem ser analisados, com os possíveis mecanismos para sua origem, detectados pelo teste *BMCyt*. Fonte: adaptada de Holland *et al.* (2008).

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 fosfolípidios 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).

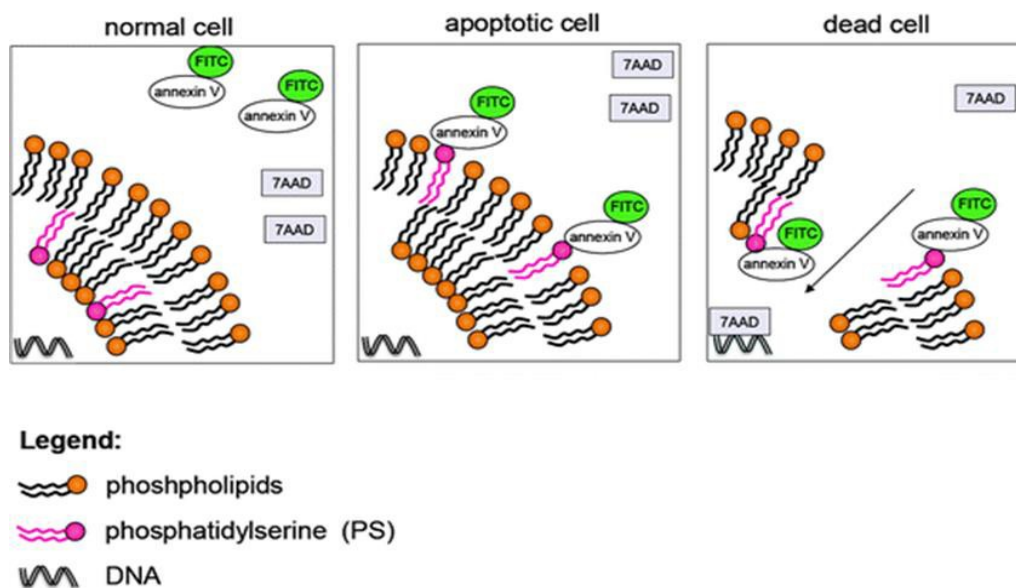


Figura 5. Representação de células viáveis, em apoptose precoce e em morte celular avançada por ligação à anexina V e 7-AAD. Fonte: Zimmermann & Meyer (2011).

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 (IP₃) na membrana do retículo endoplasmático, produzindo liberação demasiada de Ca²⁺ (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.

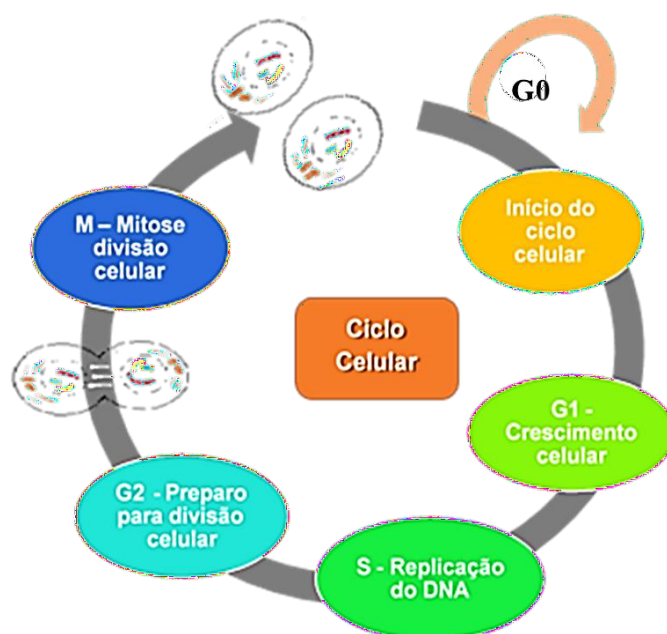


Figura 6. Fases do ciclo celular.

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).

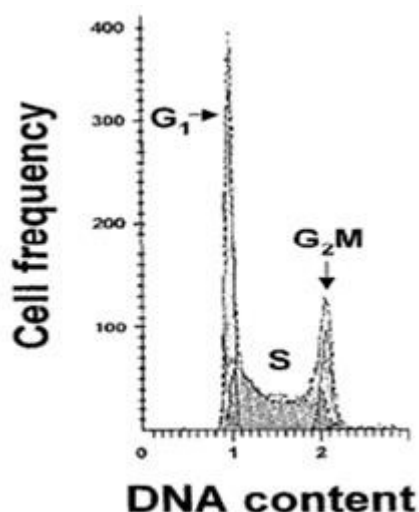


Figura 7. Histograma que ilustra as diferentes fases do ciclo celular com o conteúdo de DNA. As populações G₀/1, S e G₂/M são representadas por picos. As porcentagens de células nas fases G₁, S e G₂/M são estimadas integrando as áreas sob os picos. Fonte: Darzynkiewicz *et al.* (2001).

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, anesthesiologia 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 anesthesiologia 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 anestesiólogistas 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.

5 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.

6 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, Gioffrè 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.

Jaloszyński 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.

Jamnicky-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, Kalemba 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.