

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2024.



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

Mariane Aparecida Pereira Silva

**Papel de polimorfismos, instabilidade genética,
resposta oxidativa e expressão gênica na exposição
ocupacional aos anestésicos**

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
2022**

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

Mariane Aparecida Pereira Silva

Papel de polimorfismos, instabilidade genética, resposta oxidativa e expressão gênica na exposição ocupacional aos anestésicos

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 Dra^a Mariana Gobbo Braz

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA
INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU
- UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Mariane Aparecida Pereira.

Papel de polimorfismos, instabilidade genética,
resposta oxidativa e expressão gênica na exposição
ocupacional aos anestésicos / Mariane Aparecida Pereira
Silva. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Mariana Gobbo Braz

Capes: 40102130

1. Estresse oxidativo. 2. Exposição ocupacional. 3.
Expressão gênica. 4. Testes de mutagenicidade. 5.
Polimorfismo genético.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Exposição ocupacional;
Expressão gênica; Mutagenicidade; Polimorfismos genéticos.

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus por toda as pessoas e oportunidades que colocou em minha vida. Por guiar meus passos e me orientar em todas as situações.

"A liberdade que Deus vos deu é de fato a maior e melhor prova do Seu amor."

Masanobu Taniguchi, Canto em Louvor ao Bodisatva que reflete os sons do mundo.

Aos meus antepassados, pelas lindas jornadas de vida que possibilitaram chegar até a minha geração.

"Se queres partir, ir embora.

Me olha da onde estiver

Que eu vou te mostrar que eu tô pronta

Me colha madura do pé"

Maria Gadú, Dona Cila

Aos meus pais, Eliane Aparecida Pereira da Silva e Marcos Antônio da Silva, meus anjos em vida que se doaram integralmente a minha formação, me auxiliando em todos os momentos.

"Vais encontrar o mundo, disse-me meu pai, à porta do Ateneu. Coragem para a luta".

Raul Pompeia, O Ateneu

Aos meus avós, Júlia de Moura, *in memoriam*, Antônia Paz Pereira, Waldemar Geraldo Pereira e minha tia Elaine Cristina Pereira, meus primeiros professores que, com infinito amor, me ensinaram sobre a beleza da vida.

"O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende com a vida e com os humildes." Cora Coralina

Aos Mestres Masaharu Taniguchi e Teruko Taniguchi *in memoriam*, pelos maravilhosos ensinamentos deixados em vida.

"Não há satisfação maior do que aquela que sentimos quando proporcionamos alegria aos outros". Masaharu Taniguchi

Agradecimento Especial

À Doutora Mariana Gobbo Braz,

Dedico especialmente todo este trabalho à excelente profissional e professora, por me ensinar e auxiliar em todos os momentos desta jornada. Agradeço por todas as oportunidades e, principalmente, pela paciência durante as etapas do meu aprendizado.

“Se consegui ver mais longe é porque estava aos ombros de gigantes”.

Isaac Newton

Agradecimento Especial

À Eloisa Elena Paschoalinotte e Lídia Raquel de Carvalho,

Agradeço a contribuição essencial nas análises de dados do projeto e auxílio estatístico.

“Life is a study in contrasts between randomness and determinism”

Arjun Raj and Alexander van Oudenaarden

Agradecimento Especial

A todos os participantes desta pesquisa,

Agradeço por aceitarem fazer parte deste trabalho, doando materiais biológicos para pesquisa, sendo de extrema importância para a realização dos experimentos. Além disso, agradeço a Lorena Mendes de Carvalho Lucio, Kátina Meneghetti de Souza e Drielle Baptista dos Santos Figueiredo pelo auxílio nas coletas das amostras.

" Os benefícios da ciência não são para os cientistas e sim para humanidade "

Louis Pasteur

Agradecimentos

Agradeço a Deus por toda a proteção e orientação durante essa jornada, pelos maravilhosos presentes que me destes nessa vida.

Tenho certeza de que esse trabalho não seria realizado sem a contribuição de uma rede de pessoas, que de alguma forma, possibilitaram que o projeto crescesse e viesse a acontecer. Portanto, agradeço a todas as pessoas, coisas e fatos que me fizeram chegar até aqui.

Ao meus pais, por serem minha fortaleza e fonte de inspiração e por exatamente tudo o que fizeram por mim. Em todos os momentos, eu os tive ao meu lado, rezando e torcendo para que meus sonhos se realizassem. E muitas vezes, abdicaram de sonhos pessoais para que pudessem me proporcionar o melhor, acreditando que eu seria capaz. Meu eterno amor e gratidão.

Aos meus avós e tia, que com todo o amor e carinho, apoiam todos os meus sonhos e fazem destes, os deles também. Mesmo nos momentos mais difíceis, pude recorrê-los como minha fortaleza e ouvir palavras de coragem e fé.

Aos meus familiares, pelo amor e incentivo na conquista dos meus sonhos.

A minha prima, Juliana Poiato, que com carinho, paciência e dedicação, me auxiliou nos estudos de língua inglesa para alcançar a nota necessária do TOEIC e me inscrever no mestrado.

À minha orientadora, professora Mariana Gobbo Braz, pela disponibilidade e paciência em ensinar tanta coisa durante esses anos. Agradeço a oportunidade, confiança e apoio para a realização deste projeto.

Ao professor associado Leandro Gobbo Braz por me acolher e acompanhar as aulas que lecionei aos residentes, além de ter mensurado a poluição anestésica. Agradeço a oportunidade e todo o aprendizado.

A todos os docentes que lecionaram as disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia FMB-UNESP por todo o empenho na formação de profissionais de excelência.

Aos membros participantes da banca de qualificação e defesa: Adriana Camargo Ferrasi, Daisy Maria Fávero Salvadori, João Paulo de Castro Marcondes, Juliana da Silva, Paula Rohr, Valéria Cristina Sandrim, juntamente com minha orientadora: Mariana Gobbo Braz. Agradeço por aceitarem o convite e por toda contribuição dada a esse trabalho.

A todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da FMB-UNESP pelo acolhimento e assistência que me deram para que o projeto pudesse ser realizado. Agradeço também a todas as agentes de limpeza que sempre deixaram as salas limpinhas e organizadas.

À secretária Tatiane de Fátima Pineiz Biondo, pela paciência e orientação quanto às normas do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia FMB-UNESP. À Neli

Aparecida Pavan, por todo auxílio na prestação de contas do laboratório. À secretária Joana Jacirene Costa Teixeira pela ajuda no contato com os anesthesiologistas.

Às minhas parceiras de laboratório Aline Aun, Drielle Baptista dos Santos Figueiredo, Juliana Rodrigues Lara e Kátina Meneghetti de Souza, por me acolherem e me ensinarem tanta coisa. Obrigada pelos conselhos, momentos de descontração e todo apoio necessário. Especialmente à Juliana, por me introduzir à biologia molecular, agradeço a orientação, disponibilidade e paciência que sempre teve comigo nos experimentos.

Aos meus amigos, pelo apoio e todos os momentos de alegria e carinho que tiveram comigo durante essa etapa da minha vida. À Karolina da Silva Tonon, amiga de longa data e companheira de viagem as idas para Botucatu, sua organização sempre me auxiliava tanto nos estudos quanto nas datas de entrega de trabalhos de faculdade. Tenho grande admiração pela amiga e cientista que é e por sempre partilhar seus conhecimentos comigo. Agradeço a convivência e a cumplicidade desses anos. Ao Lucas Alves da Costa Silva, meu amigo de faculdade, pelo apoio nas questões de informática que tive e cumplicidade desses anos.

À Rosangela Aparecida Lobo, bibliotecária responsável pela confecção da ficha catalográfica.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão de auxílio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de mestrado concedida (132029/2020-0).

Epígrafe

“A felicidade não é algo que se persegue ou que acontece casualmente; ela deve ser descoberta no aqui-agora. É no aqui-agora que está a nossa vida.”

Masaharu Taniguchi

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos Especiais	v
Agradecimentos	viii
Epígrafe	x
Resumo	xii
Abstract	xiv
Manuscrito 1	
Abstract.....	16
1. Introduction.....	17
2. Methods.....	19
2.1 Subjects.....	19
2.2 Monitoring of WAG in the workplace	19
2.3 Biological sampling	20
2.4 Buccal micronucleus and nuclear buds (genetic instability markers)	20
2.5 Assessment of lipid peroxidation and antioxidant capacity (oxidative stress status)..	20
2.6 Genotyping analysis.....	21
2.7 Statistical analyses.....	22
3. Results.....	23
4. Discussion	32
5. Strengths and limitations.....	36
6. Conclusion.....	37
References	37
Manuscrito 2	
Abstract.....	42
1. Introduction.....	43
2. Material and Methods.....	44
2.1 Study population.....	44
2.2 Collection of biological samples.....	45
2.3 Gene expression assessment.....	46
2.4 Genotyping analyses.....	47
2.5 DNA damage markers in buccal cells.....	47
2.6 Oxidative stress marker.....	48
2.7 Antioxidant capacity status.....	49
2.8 Statistical analyses.....	49
3. Results	50
4. Discussion	61
References.....	67
Anexo - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	72

Resumo

Silva MAP. **Papel de polimorfismos, instabilidade genética, resposta oxidativa e expressão gênica na exposição ocupacional aos anestésicos [Dissertação]**. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2021.72 f.

Profissionais que atuam em salas cirúrgicas (SC) podem estar diariamente expostos aos resíduos de gases anestésicos (RGA) devido ao uso de anestésicos inalatórios. De forma inédita, este estudo observacional monitorou a poluição anestésica dos RGA sevoflurano, isoflurano e óxido nitroso, avaliou biomarcadores de instabilidade genética em células bucais, incluindo micronúcleo (MN) e broto nuclear (BN), bem como os de estresse oxidativo por meio de lipoperoxidação (malondialdeído-MDA) e capacidade antioxidante plasmática (FRAP), a susceptibilidade genética por polimorfismos em genes de metabolismo de fase I e II (*CYP2E1*, *GSTP1*, *GSTM1* e *GSTT1*), danos genéticos/reparo (*OGG1*, *XRCC1* e *ATM*) e resposta antioxidante (*SOD2*), assim como a expressão dos genes *OGG1* e *SOD2*. Altas concentrações residuais de RGA foram observadas em SC, as quais não possuíam sistema de exaustão adequado. O grupo exposto, constituído por 100 profissionais, apresentou maior instabilidade genética (aumento de MN e BN), mas não estresse oxidativo, quando comparados aos 93 indivíduos não expostos aos RGA (grupo controle). Frequência elevada de MN e BN foi detectada em indivíduos expostos com idade superior a 30 anos em relação à mesma faixa etária no grupo controle; mulheres expostas apresentaram maior instabilidade genética que mulheres não expostas; e profissionais que tinham carga horária semanal (> 30 h/semana) maior em SC apresentaram aumento na formação de MN em relação aos indivíduos com menor carga horária semanal aos RGA. Quanto ao estresse oxidativo, aumento de MDA foi observado em indivíduos acima de 30 anos em ambos os grupos; os homens expostos apresentaram maior capacidade antioxidante que as mulheres expostas; e tanto aumento de MDA como diminuição de FRAP foram detectados em profissionais com maior tempo (> 9 anos) de exposição aos RGA. Não houve diferença significativa entre os grupos para expressão de ambos os genes avaliados. Nesse contexto, de acordo com a ocupação de trabalho, anesthesiologistas apresentaram maior tempo médio de exposição (semanal/anual) aos RGA comparados aos cirurgiões/técnicos, resultando em quadro de estresse oxidativo, incluindo menor expressão de *SOD2*. Quanto aos polimorfismos avaliados, todos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e houve pouca influência nos marcadores analisados, exceto para os indivíduos com genótipo *GSTP1* (rs1695) AG/GG que apresentaram maior

valor de FRAP tanto no grupo exposto quanto no grupo controle comparados com o homocigoto selvagem; esse polimorfismo e *GSTT1* nulo foram associados a maior capacidade antioxidante em homens expostos. Observou-se aumento de expressão de *OGGI* em indivíduos genotipados como *OGGI* -/Cys (rs1052133) comparados àqueles genotipados com Ser/Ser somente no grupo controle, e diminuição da expressão desse gene em anestesiológicos -/Cys comparados aos cirurgiões/técnicos com o mesmo genótipo. Indivíduos *ATM* TT (rs600931) apresentaram maior FRAP comparados ao *ATM* CT, somente no grupo controle. Entre os expostos, os anestesiológicos *ATM* CC apresentaram maior frequência de MN enquanto os genotipados CC/CT, maior frequência de BN. Cirurgiões e técnicos *OGGI* -/Cys apresentaram aumento de MN em comparação aos indivíduos homocigotos; quanto ao FRAP, maiores valores foram observados para os *XRCCI* -/Gln (rs25487) e *ATM* TT. Concluindo, achados de instabilidade genética, estresse oxidativo e modulação da expressão gênica foram observados neste estudo, especialmente em relação às variáveis idade, sexo e tempo de exposição/tipo de ocupação; somente alguns polimorfismos parecem ter influenciado nos marcadores analisados. Ressalte-se a necessidade de minimizar a exposição ocupacional aos RGA para reduzir possíveis impactos à saúde dos profissionais.

Palavras-chave: exposição ocupacional; mutagenicidade; estresse oxidativo; expressão gênica; polimorfismos genéticos.

Abstract

Silva MAP. **Role of polymorphisms, genetic instability, oxidative response and gene expression facing occupational exposure to anesthetics [Master]**. Botucatu: Medical School, São Paulo State University - UNESP; 2021. 72 p.

Professionals who work in operating rooms (ORs) may be daily exposed to waste anesthetic gases (WAG) due to use of inhalational anesthetics. For the first time, this observational study monitored the anesthetic pollution of the WAG sevoflurane, isoflurane and nitrous oxide, evaluated buccal genetic instability (micronucleus-MN and nuclear bud-NBUD) and oxidative stress biomarkers through lipoperoxidation (malondialdehyde-MDA) and plasma antioxidant capacity (FRAP), genetic susceptibility by polymorphisms in genes of phase I and II metabolism (*CYP2E1*, *GSTP1*, *GSTM1* and *GSTT1*), genetic damage/repair (*OGG1*, *XRCC1* and *ATM*) and antioxidant response (*SOD2*) as well as *OGG1* and *SOD2* expressions. High pollution of WAG was observed in ORs, which did not have adequate scavenging systems. The exposed group, consisting of 100 professionals, showed greater genetic instability (increased MN and NBUD frequencies) but not oxidative stress, when compared to 93 volunteers (control group). Increased MN and NBUD frequencies were detected in exposed individuals aged over 30 years in relation to the same age in the control group; exposed females showed increased genetic instability than unexposed females; and professionals with greater weekly WAG exposure (> 30 h/week) exhibited increased formation of MN in relation to individuals with a shorter weekly WAG exposure. Increased MDA levels were observed in individuals over 30 years of age in both groups; exposed males had greater antioxidant capacity than exposed females; and oxidative stress was detected in professionals with greater years of exposure (> 9 years) to WAG. There was no significant difference between the groups for the expression of both genes evaluated. In this context, according to job occupation, anesthesiologists had greater duration of WAG exposure than surgeons/technicians, resulting in oxidative stress, including decreased *SOD2* expression. Regarding assessed polymorphisms, all of them were in Hardy-Weinberg equilibrium, and there was little influence on the analyzed markers, except for individuals from exposed and control groups carrying *GSTP1* (rs1695) AG/GG genotype, who exhibited higher FRAP values than the wild-type homozygote; this polymorphism and null *GSTT1* were associated with greater antioxidant capacity in exposed males. Increased *OGG1*

expression was observed among *OGGI* -/Cys (rs1052133) individuals compared to Ser/Ser only in the control group and decreased expression in -/Cys anesthesiologists compared to surgeons/technicians of the same genotype. *ATM* TT (rs600931) subjects showed higher FRAP values compared to *ATM* CT only in the control group. Anesthesiologists genotyped as *ATM* CC had higher MN frequency while those genotyped as CC/CT exhibited increased NBUD. Surgeons and technicians *OGGI* -/Cys showed increased MN compared to homozygous individuals; for FRAP, higher values were observed for *XRCCI* -/Gln (rs25487) and *ATM* TT. In conclusion, findings of genetic instability, oxidative stress and modulation of gene expression were observed in this study, especially in relation to the variables age, sex and time of exposure/type of occupation; only a few polymorphisms seem to have influenced the analyzed markers. The findings highlight the need to minimize WAG exposure to reduce the impacts observed on the healthcare workers.

Keywords: occupational exposure; mutagenicity; oxidative stress; gene expression; genetic polymorphisms.