

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MARIANE APARECIDA PEREIRA SILVA

**AVALIAÇÃO SISTÊMICA E TRANSCRIPTÔMICA DE DANOS
OXIDATIVOS E REPARO DE DNA EM ANESTESIOLOGISTAS**

BOTUCATU

2019

MARIANE APARECIDA PEREIRA SILVA

**AVALIAÇÃO SISTÊMICA E TRANSCRIPTÔMICA DE DANOS
OXIDATIVOS E REPARO DE DNA EM ANESTESIOLOGISTAS**

Monografia apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Botucatu como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Profa Dra Mariana Gobbo Braz

Supervisora: Profa Dra Valéria Cristina Sandrim

BOTUCATU

2019

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

Silva, Mariane Aparecida Pereira.

Avaliação sistêmica e transcriptômica de danos oxidativos e reparo de DNA em anesthesiologistas / Mariane Aparecida Pereira Silva. - Botucatu, 2019

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Mariana Gobbo Braz
Capes: 20205007

1. Anestésicos - Efeito fisiológico. 2. Expressão gênica. 3. Estresse oxidativo. 4. Anesthesiologistas.

MARIANE APARECIDA PEREIRA SILVA

**AVALIAÇÃO SISTÊMICA E TRANSCRIPTÔMICA DE DANOS OXIDATIVOS
E REPARO DE DNA EM ANESTESIOLOGISTAS**

Monografia apresentada à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” de Botucatu como
requisito para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____

_____/____/____

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino e meu guia, aos meus pais: Marcos e Eliane, aos meus avós maternos: Waldemar e Antônia, minha avó paterna: Júlia (“in memoriam”) e minha tia Elaine, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo, pois sem eles, este trabalho e muito dos meus sonhos não se realizariam.

Ao Curso de Ciências Biomédicas da Unesp de Botucatu e às pessoas com quem convivi nesse espaço ao longo desses anos. A experiência e todo o conhecimento adquirido foram essenciais para a minha formação acadêmica.

Agradecimentos

À Dra Mariana Gobbo Braz pela sua orientação e ensinamentos que possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra Valéria Cristina Sandrim pelo aceite de orientação vinculada ao Curso de Ciências Biomédicas para o acompanhamento do estágio.

Às colegas do Laboratório GENOTOX (UNIPEX, FMB-UNESP): Kátina M. de Souza, Aline G. Aun, Drielle B.S. Figueiredo e Juliana R. Lara por toda ajuda e orientação nos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos apoios financeiros concedidos em forma de Bolsa de Iniciação Científica e Auxílio à Pesquisa, respectivamente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 RESÍDUOS DE GASES ANESTÉSICOS (RGA)	3
1.3 EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS RGA.....	4
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS RGA	6
1.5 SISTEMAS DE REPARO DE DNA E ANESTÉSICOS INALATÓRIOS.....	7
 2. OBJETIVO	 10
 3. METODOLOGIA	 11
3.1 APROVAÇÃO ÉTICA E DELINEAMENTO	11
3.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	11
3.3 ISOLAMENTO CELULAR	12
3.4 TESTE DO COMETA	12
3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	13
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
 4. RESULTADOS	 15
 5. DISCUSSÃO	 17
 6. CONCLUSÃO	 20
 7. REFERÊNCIAS.....	 21

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar danos oxidativos no material genético e expressão de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA de profissionais expostos ocupacionalmente aos anestésicos inalatórios. Participaram do estudo 60 médicos atuantes em um hospital universitário terciário, sendo 30 anestesiológicos expostos ocupacionalmente aos resíduos de gases anestésicos mais modernos: isoflurano, sevoflurano e desflurano, além do gás óxido nitroso (grupo exposto) e 30 médicos sem exposição aos anestésicos (grupo controle), os quais foram pareados por idade, sexo e estilo de vida. Os danos oxidativos no DNA foram detectados pelo teste do cometa enquanto que a expressão de dois genes de reparo de danos oxidativos no DNA (*hOGG1* e *XRCC1*) foi avaliada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*qPCR*). Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação às características dos participantes, quanto aos danos oxidativos no DNA nem em relação à expressão de ambos os genes avaliados ($p > 0,05$). Desse modo, diante das condições deste estudo, nossos achados sugerem que a exposição crônica aos resíduos de gases anestésicos mais comumente utilizados não esteja associada aos danos oxidativos no genoma nem à modulação de expressão de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA de anestesiológicos atuantes em centro cirúrgico de hospital universitário. Porém, ressalta-se a importância do constante biomonitoramento humano para a identificação e quantificação de possíveis riscos que os resíduos de gases anestésicos possam exercer sobre a saúde dos profissionais. Possivelmente, outros mecanismos e vias podem estar associados aos possíveis efeitos tóxicos envolvidos na exposição ocupacional aos anestésicos inalatórios.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Dentre todas as descobertas da área médica, sem dúvida, a descoberta de substâncias que minimizassem a dor no procedimento cirúrgico foi um dos grandes marcos da história. Na Antiguidade, os incas utilizavam folhas de coca em feridas para proporcionar alívio de dor, e a chicha, bebida alcoólica fermentada a base de milho, para produzir certo torpor durante as operações cirúrgicas (FAIRLEY, 2007; MAIA; FERNANDES, 2002); já os chineses utilizavam-se da acupuntura (KITZ; VANDAM, 1993; MAIA; FERNANDES, 2002). Em meados do século XII, as cirurgias eram realizadas em pacientes conscientes ultrapassando o limiar da dor com utilização de métodos brutais e até mesmo de tortura, conforme relatado pelo médico e bispo católico italiano Theodoric (ROBINSON; TOLEDO, 2012).

O nascimento da anestesia deveu-se à utilização de dietil éter em uma cirurgia para retirada de um tumor de pescoço realizada no *Massachusetts General Hospital*, em Boston, nos Estados Unidos em 1846. Relata-se que o Doutor William Morton (Figura 1) inseriu um inalador com um fluido incolor no paciente observando inicialmente certo rubor, bem como respiração irregular e rápida. Depois de algum tempo, o paciente “caiu em sono profundo” sendo possível a realização da cirurgia sem a sensação de dor provocada por tal procedimento. Posteriormente, o termo “anestesia” foi criado por Oliver Wendell Holmes com o intuito de descrever a mudança fisiológica induzida após utilização do éter (ROBINSON; TOLEDO, 2012).

Apesar do grande avanço nos procedimentos cirúrgicos em decorrência da utilização do dietil éter, este anestésico não era ideal devido às suas características, incluindo inflamabilidade, odor desagradável e persistente, além do grande potencial de indução de náuseas e vômitos. Outros anestésicos inalatórios também foram utilizados, como o ciclopropano e o clorofórmio, porém esses agentes propiciavam muitos efeitos colaterais ao paciente (WHALEN; BACON; SMITH, 2005). A utilização de óxido nitroso (N_2O), à época, era realizada em mistura quase hipóxica devido à sua baixa potência anestésica (ROBINSON; TOLEDO, 2012). Assim, a prática da anestesiologia assistiu, desde então, a profunda evolução nesse campo à medida em que outros anestésicos, mais seguros, foram se consagrando.

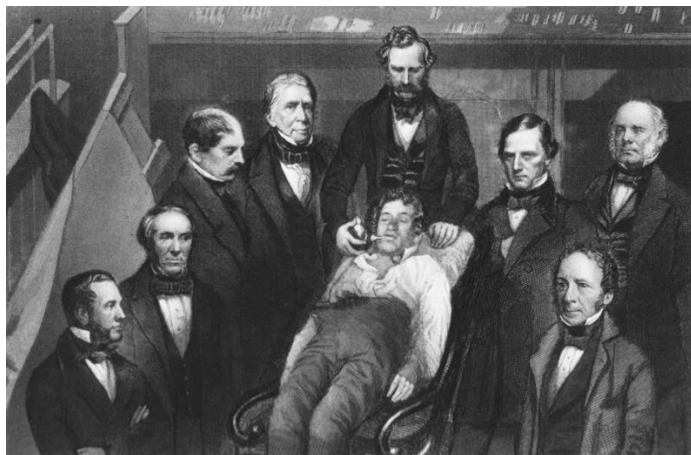


Figura 1 – Primeira demonstração pública, realizada por William Morton, da anestesia com dietil éter.

Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:WTG_Morton_1859.jpg. Acesso em: 4 out. 2019.

No final da década de 1930, a indústria já sintetizava hidrocarbonetos halogenados cuja fórmula permitia menor inflamabilidade. A aplicação dessa técnica, no desenvolvimento de anestésicos, foi realizada em 1954 com a síntese do halotano. A princípio, este anestésico inalatório apresentava menor inflamabilidade, odor agradável e maior potência anestésica em comparação aos anestésicos utilizados anteriormente (ROBINSON; TOLEDO, 2012). Porém, poucos anos depois, observou-se que este agente era bastante lipossolúvel, e que, devido à sua alta taxa de metabolização hepática, seus subprodutos/metabólitos eram capazes de acetilar as proteínas no fígado, o que estaria relacionado com hepatotoxicidade (RESTREPO *et al.*, 2009).

Posteriormente, os anestésicos halogenados isoflurano, enflurano e desflurano foram desenvolvidos e apresentavam menor nível de toxicidade e menor risco de inflamabilidade, além de garantirem rápida indução e recuperação anestésicas. No final da década de 1960, o halogenado sevoflurano foi sintetizado e apresentava características semelhantes aos halogenados anteriores, além de proporcionar menor

irritação das vias aéreas, sendo bastante utilizado em cirurgias pediátricas (VANIS-VATRENJAK *et al.*, 2015).

Atualmente, os anestésicos halogenados mais modernos (isoflurano, sevoflurano e desflurano), além do gás N₂O, que é utilizado em conjunto com outro anestésico devido à sua baixa potência e por possuir propriedade analgésica, são amplamente utilizados na prática anestésica. Tanto a potência e segurança desses fármacos, bem como os modernos equipamentos de anestesia demonstram a evolução da anestesiologia (BROWN; PURDON; VAN DORT, 2011; SCHUTTLER; SCHWILDEN, 2008; SLOAN, 2000). Entretanto, o modo como esses agentes proporcionam o estado de imobilidade, inibição da resposta aos estímulos nociceptivos e amnésia ainda não é totalmente conhecido, sendo a ação farmacológica descrita apenas pelos efeitos clínicos (SARAIVA, 2002). Assim, os possíveis efeitos deletérios ocasionados após a exposição aos anestésicos inalatórios são desconhecidos tanto para o paciente, quem recebe altas concentrações desses fármacos quando submetido a cirurgia, quanto para as equipes cirúrgicas, as quais são expostas aos resíduos de gases anestésicos (RGA), porém de forma crônica.

1.2 RESÍDUOS DE GASES ANESTÉSICOS (RGA)

Conforme definido pelo *National Institute for Occupational Safety and Health* dos EUA (NIOSH, 2007), os RGA são considerados pequenas partículas de gases que são liberadas do circuito respiratório anestésico do paciente para o ambiente cirúrgico durante ato cirúrgico ou recuperação anestésica. A causa da presença dos RGA no ambiente cirúrgico, que contribui para a poluição anestésica no ambiente de trabalho, pode-se dar, essencialmente, por três fatores: técnicas anestésicas, equipamento de anestesia e, principalmente, pela ausência ou deficiência no sistema de exaustão/ventilação de gases nas salas de operação - SO e salas de recuperação pós-anestésica - SRPA (OLIVEIRA, 2009).

Em relação às técnicas anestésicas, os principais fatores incluem: escoamento de líquido anestésico no preenchimento do vaporizador (o desflurano, por exemplo, pode ser rapidamente transformado de líquido para vapor em temperatura ambiente, devido a seu ponto de ebulição); indução e/ou manutenção da anestesia geral com anestésicos inalatórios, principalmente na indução anestésica em pacientes

pediátricos utilizando-se máscara facial; e falha no desligamento das válvulas de controle do fluxo e do vaporizador. Soma-se a isto, o mal acoplamento da máscara facial no paciente em decorrência de tamanho inadequado, material impróprio ou dificuldades referentes à via aérea do paciente, e a utilização de alto fluxo de gases frescos (LUCIO *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2009; SARAIVA, 2003). Quanto ao aparelho de anestesia, inúmeros componentes podem ser motivo de escape de anestésicos para o ar ambiente. Eventuais vazamentos podem ser provenientes de válvulas e conexões do circuito respiratório, defeitos em peças e balões reservatórios (LUCIO *et al.*, 2018). A infraestrutura do ambiente cirúrgico também pode contribuir para poluição anestésica pela utilização ou não de sistemas de ventilação e exaustão de gases. Sabe-se, porém, que a maioria dos hospitais de países em desenvolvimento e não desenvolvidos não possui sistema de exaustão ou quando os possuem, é de forma parcial (o ar com gás anestésico é parcialmente eliminado para o exterior, porém há recirculação do ar poluído). Os sistemas de exaustão mais eficientes apresentam, no mínimo, 15 trocas de ar por hora com fluxo laminar e sem recirculação de ar, assegurando menores concentrações de resíduos anestésicos no ambiente cirúrgico (BRAZ *et al.*, 2017; BYHAHN *et al.*, 2001; HOBBAHN *et al.*, 1998; WIESNER *et al.*, 2001).

No Brasil, infelizmente, não há recomendações de limites de exposição ocupacional aos RGA, sendo um assunto negligenciado e ausente de regulamentação trabalhista, diferentemente do que ocorre em países desenvolvidos (LUCIO *et al.*, 2018). Assim, a realização de estudos da exposição ocupacional aos RGA no ambiente de trabalho é de extrema importância, além da conscientização dos profissionais expostos, bem como a adoção de práticas e regulamentações de um limite de segurança no ambiente cirúrgico.

1.3 EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS RGA

Existem inúmeros riscos ocupacionais relacionados à prática da anestesiologia, especialmente à toxicidade dos anestésicos inalatórios, que têm atraído especial atenção em virtude da sua ampla utilização clínica, possibilidade de lesões no genoma e de indução de estresse oxidativo (COSTA PAES *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2016; WIESNER *et al.*, 2008; WRÓŃSKA-NOFER *et al.*, 2012). Relatos de alterações

hematopoiéticas, hepáticas e renais já foram descritas em relação à exposição ocupacional aos anestésicos inalatórios mais antigos (CACIARI *et al.*, 2013; CASALE *et al.*, 2014). Também já foram observadas alterações neurocomportamentais em profissionais expostos ocupacionalmente ao N₂O e aos anestésicos inalatórios halotano e enflurano - os quais já estão em desuso em vários países (LUCCHINI *et al.*, 1996). Adicionalmente, apesar de controversa, a exposição crônica aos anestésicos inalatórios também é considerada um fator de risco ao processo reprodutivo, especialmente quando profissionais são altamente expostos ao N₂O em salas cirúrgicas sem sistema de exaustão (SHIRANGI; FRITSCHI; HOLMAN, 2009).

Assim, a exposição ocupacional crônica ao N₂O e aos anestésicos halogenados mais antigos, em profissionais que atuam em centros cirúrgicos, consultórios odontológicos e laboratórios de pesquisa, pode resultar em efeitos deletérios à saúde. O N₂O, embora seja rapidamente eliminado do organismo, devido à baixa solubilidade sanguínea e tecidual, pode inativar a cobalamina (vitamina B12) (KRAJEWSKI *et al.*, 2007). A metionina sintetase é uma enzima que desempenha papel crucial na geração de S-adenosilmetionina no ciclo do folato. Como esse gás anestésico inibe a cobalamina de agir como coenzima para a metionina sintetase, ocorre a inibição do ciclo causando prejuízo na síntese de ácidos nucleicos e diversas proteínas (SANDERS; WEIMANN; MAZE, 2008). Este parece ser um dos principais mecanismos de toxicidade do N₂O visto a importância da cobalamina para o organismo. Porém, a duração e a concentração de exposição para que os efeitos deletérios sejam observados ainda são incertos (BECKER; ROSENBERG, 2008).

Em relação aos anestésicos inalatórios halogenados, os mecanismos pelos quais eles podem causar danos no material genético (ácido desoxirribonucleico - DNA) ainda não são totalmente conhecidos, mas algumas hipóteses incluem a alquilação na posição N7 das bases púricas e/ou pelo estresse oxidativo (JALOSZYŃSKI *et al.*, 1999). Entretanto, não se sabe ao certo se os halogenados mais utilizados atualmente (isoflurano, sevoflurano e desflurano) também podem induzir esses efeitos.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS RGA

Acredita-se que a exposição ocupacional aos RGA possa alterar o balanço entre a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante, levando ao quadro conhecido como estresse oxidativo (WRONSKA-NOFER *et al.*, 2012). As ERO são geradas como subprodutos da atividade metabólica, sendo produzidas durante a respiração celular. Se não controladas adequadamente, a concentração dessas espécies reativas pode ultrapassar a capacidade antioxidante, sendo capazes de interagir com diversas macromoléculas, tais como ácidos nucleicos (DNA), lipídios e aminoácidos/proteínas (WHITAKER *et al.*, 2017). O estresse oxidativo tem sido associado a diversos processos patológicos, não necessariamente como um papel etiológico, mas sim, na participação de mecanismos fisiopatológicos que induzem progressão e complicação de doenças (GUTTERIDGE, 1993; MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009; ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

A literatura é escassa quanto aos trabalhos que associam a exposição ocupacional aos RGA e a avaliação do estresse oxidativo. Türkan *et al.* (2005) observaram diminuição significativa do sistema antioxidante em profissionais expostos aos anestésicos inalatórios em relação ao grupo controle. Izdes *et al.* (2010) também encontraram diminuição da capacidade antioxidante, bem como da enzima antioxidante glutatona, em enfermeiras anesthesiologistas expostas aos RGA. Contrariamente ao observado, Malekirad *et al.* (2005) observaram aumento da peroxidação lipídica plasmática, porém não verificaram alteração da capacidade antioxidante em profissionais expostos ao halotano e N₂O.

Diversos biomarcadores podem ser utilizados para determinar o *status* do estresse oxidativo, tais como marcadores de peroxidação lipídica, oxidação proteica além de quebras de fita e oxidação das bases do DNA, consistindo em ferramentas úteis. Dentre as metodologias utilizadas, o teste do cometa é um método sensível e de baixo custo, que detecta quebras de fita simples e dupla do DNA, sítios álcali-lábeis e lesões oxidativas. É um teste de *screening*, considerado método de escolha para identificação de lesões no DNA, principalmente em estudos epidemiológicos de populações submetidas a exposições ocupacionais (COLLINS *et al.*, 2008). Modificações no teste do cometa, com a utilização de enzimas de reparo de danos oxidativos, como a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG), que reconhece bases

púricas do DNA oxidadas, aumentam a sensibilidade e especificidade do método, particularmente na detecção de danos oxidativos no material genético (COLLINS *et al.*, 1997). Entretanto, há escassez de dados relacionados aos danos oxidativos no DNA de profissionais expostos ocupacionalmente aos anestésicos (WROŃSKA-NOFER *et al.*, 2012).

1.5 SISTEMAS DE REPARO DE DNA E ANESTÉSICOS INALATÓRIOS

Estima-se que danos na estrutura do DNA ocorram a uma taxa de 10^4 lesões/célula/dia, sendo principalmente desencadeados pelo estresse oxidativo (LINDAHL; NYBERG, 1972; WHITAKER *et al.*, 2017). As lesões no material genético podem alterar o emparelhamento de bases nitrogenadas e, se não corrigidas, levar à parada da polimerase, quebras na fita de DNA ou serem fixadas em mutações responsáveis por inúmeras doenças humanas (CANNAN *et al.*, 2017).

Assim, sistemas sofisticados de reparo foram conservados desde bactérias até seres humanos com o objetivo de conter os potenciais efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (WALLACE, 2014). Dentre eles, o sistema de reparo por excisão de bases (*base excision repair* - *BER*) é responsável por reparar vários tipos de danos no material genético, incluindo as lesões oxidativas, as quais incluem proteínas codificadas pelos genes *human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1)* e *X-Ray Repair Cross Complementing 1 (XRCC1)*. As proteínas envolvidas no mecanismo de reparo são reguladas em diversos níveis moleculares, compreendendo desde a expressão do gene até tradução, bem como a regulação por pequenos RNA não codificantes. A maioria das enzimas participantes do sistema reparo tipo *BER* também participa de uma variedade de funções celulares (WALLACE, 2014).

As DNA glicosilases são responsáveis pelo reconhecimento das lesões presentes no material genético, compreendendo o total de 11 glicosilases, das quais seis são responsáveis pelo reconhecimento e reparo de danos oxidativos. A glicosilase OGG1 é caracterizada pelo formato de hélice e pela remoção de lesões provocadas pelo estresse oxidativo, dentre as mais comuns a modificação de guanina (8-oxoguanina) e erro no emparelhamento de bases (WHITAKER *et al.*, 2017). Juntamente com essas enzimas, várias proteínas podem contribuir para a remoção da base danificada, dentre elas destacam-se as proteínas codificadas pelo gene

XRCC1 (WHITAKER *et al.*, 2017). A proteína *XRCC1* possui múltiplos domínios capazes de coordenar e interagir com proteínas de reparo de quebras de fita de DNA. Devido ao seu papel na interação, estabilidade e estímulo de complexos de reparo, ela é conhecida como uma proteína “andaime” (*scaffolding protein*) responsável por proteger o material genético dos possíveis danos gerados antes e durante o mecanismo de reparo (Figura 2).

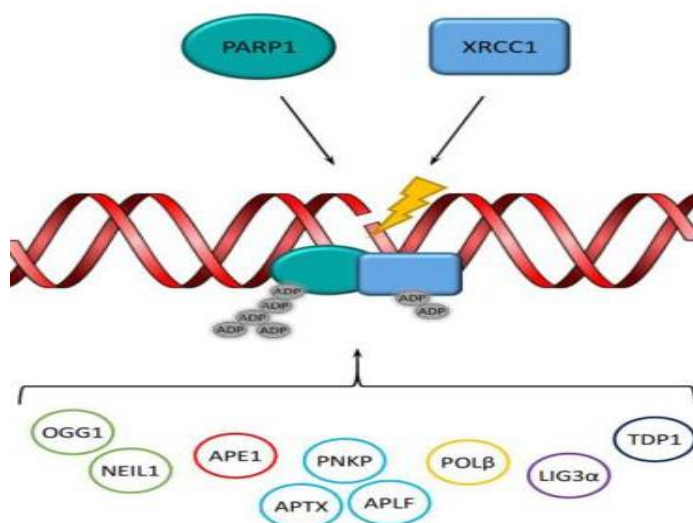


Figura 2 – Sistema de reparo por excisão de bases (*BER*). A proteína *XRCC1* interage com proteínas de reparo de quebras de fita de DNA, dentre elas, a glicosilase *OGG1*, a qual é responsável pela remoção de lesões provocadas pelo estresse oxidativo. Fonte: ABBOTTS; WILSON, 2017.

Fazendo um paralelo com pacientes submetidos à cirurgia minimamente invasiva anestesiados com isoflurano, verificou-se menor expressão do gene *hOGG1* 24 horas após a cirurgia quando comparado aos momentos basal e intraoperatório, e menor expressão do *XRCC1* quando comparado ao momento pós-operatório com o intraoperatório, sugerindo alterações da expressão desses importantes genes durante ou após exposição à anestesia inalatória (BRAZ *et al.*, 2011). Por outro lado, não se sabe, ainda, se a exposição ocupacional aos RGA pode interferir na expressão desses genes-chave. Adicionalmente, a avaliação de genes envolvidos no reparo de danos oxidativos pode ser analisada por metodologia sensível, como a reação em cadeia da

polimerase quantitativa em tempo real (*quantitative-real time polymerase chain reaction* - *qPCR*) para detecção precoce de alterações moleculares.

Portanto, testou-se a hipótese de que a exposição ocupacional aos RGA esteja associada com lesões oxidativas no material genético, bem como em modificações no padrão de expressão de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA em anestesiológicas atuantes em hospital universitário. Dessa maneira, o presente estudo tentou contribuir para melhor entendimento das possíveis vias e mecanismos toxicológicos dos anestésicos inalatórios durante a exposição ocupacional crônica.

2. OBJETIVO

Diante do exposto e havendo necessidade de se conhecer os possíveis efeitos deletérios da exposição ocupacional aos anestésicos, o presente estudo avaliou danos genéticos oxidativos e expressão de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA em profissionais expostos ocupacionalmente aos RGA mais utilizados.

3. METODOLOGIA

3.1 APROVAÇÃO ÉTICA E DELINEAMENTO

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) posteriormente à aprovação do protocolo de estudo pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB-UNESP (CAAE: 55861716.4.0000.5411).

Este estudo transversal envolveu a participação de 60 médicos de ambos os sexos, todos atuantes no HCFMB-UNESP, os quais foram alocados em dois grupos de acordo com a exposição ocupacional ou não aos RGA. O grupo exposto foi constituído por 30 médicos anestesiológicos expostos ocupacionalmente, por no mínimo dois anos, aos resíduos de isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O, enquanto que o grupo controle foi constituído por 30 médicos sem exposição ocupacional (clínica médica). Houve pareamento dos grupos quanto à idade, sexo e estilo de vida. O centro cirúrgico do HCFMB-UNESP tem 13 SO, com diferentes áreas, sendo sete SO com aparelho de ar condicionado em cada sala (portanto sem sistema de exaustão de gases) e seis SO com ar condicionado central com sistema de exaustão de gases, com média de sete trocas de ar por hora. Portanto, os anestesiológicos trabalhavam em ambiente com sistema parcial de exaustão de gases (atuavam em todas as SO).

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam a um questionário detalhado. Não foram incluídos no estudo os portadores de doença maligna, doenças infecciosas ou inflamatórias, as gestantes, os que faziam uso de tabaco, “drogas ilícitas”, medicamentos e suplementação vitamínica, além dos que faziam uso abusivo de álcool.

3.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de sangue venoso foram coletadas em jejum de oito horas em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e em tubos contendo solução estabilizadora de ácido ribonucleico - RNA (*PAXgene*, *Qiagen/PreAnalytiX*, Suíça) de ambos os grupos concomitantemente. Todas as

amostras foram codificadas e processadas sob luz amarela, e analisadas em teste encoberto. As amostras colhidas em tubos com EDTA foram utilizadas para isolamento de células mononucleares (~90% de linfócitos), as quais posteriormente foram congeladas em pequenas alíquotas em *freezer* -80°C até avaliação dos danos oxidativos no DNA. O sangue coletado em tubos *PAXgene* foi congelado a -80°C e serviu para extração de RNA para avaliação da expressão gênica. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3 ISOLAMENTO CELULAR

Após a coleta das amostras, realizou-se o isolamento de linfócitos com *Ficoll-Paque Plus*® (GE Healthcare, Suécia) conforme protocolo descrito (BRAZ; FÁVERO SALVADORI, 2007). Para isso, cada amostra de sangue foi homogeneizada juntamente com 2 ml de solução salina tamponada com fosfato (*PBS*), depositada sobre 3 ml de ficoll e centrifugada a 2.500 rpm a 4°C por 30 min. Em seguida, a camada de linfócitos foi retirada com a utilização de pipeta *Pasteur* e colocada em tubos com 4 ml de *PBS* para nova centrifugação a 1.500 rpm, a 4°C, por 15 min. Os linfócitos foram congelados e, posteriormente, descongelados para realização do teste do cometa.

3.4 TESTE DO COMETA

Os procedimentos realizados neste teste seguiram os protocolos descritos por Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (1991), com algumas modificações (BRAZ *et al.*, 2012). Primeiramente, as lâminas foram codificadas e pré-revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Dez microlitros de linfócitos isolados (~ 1 a 5×10^4 células/ μ l) foram adicionados em 120 μ l de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Essa mistura foi colocada nas lâminas pré-revestidas e, em seguida, as lâminas foram cobertas por lamínulas e deixadas durante 5 min para solidificar a agarose sob refrigeração (4°C). As lamínulas foram delicadamente retiradas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM a pH 10, com Triton X-100 a 1% e dimetilsulfóxido a 10%) por 2 h a 4°C.

Subsequente a esse período, as lâminas foram lavadas com *PBS* por três vezes por 5 min e posteriormente lavadas com solução tampão (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,2 mg/ml de albumina sérica bovina e 0,5 mM EDTA em pH 8). Duas lâminas foram incubadas com 50 µl da enzima FPG (avaliação de danos oxidativos) e duas lâminas com 50 µl de tampão sem enzima (controle; avaliação de danos basais) a 37°C por 30 min (câmara úmida) para cada indivíduo.

Após esse procedimento, as lamínulas foram retiradas e as lâminas dispostas em uma cuba de eletroforese horizontal, a qual foi preenchida com tampão alcalino preparado a fresco (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM em pH > 13). Essa disposição ficou por 40 minutos para desespiralização do DNA. Posteriormente, a eletroforese foi conduzida a 25 V, 0,3 A e 7 W por 30 minutos. Após o término, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização por 15 min e, em seguida, foram fixadas em etanol absoluto e armazenadas a 4°C até o momento da análise.

As lâminas foram coradas com 50 µl de *SYBR Gold*[®] e foram avaliados 200 nucleoides por indivíduo (50 nucleoides por lâmina/tratamento). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments*, Reino Unido) para avaliação de danos basais e oxidativos no DNA. Como dois parâmetros avaliados tiveram resultados semelhantes, os dados foram expressos em *tail moment*.

3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A extração do RNA ocorreu após o descongelamento das amostras em temperatura ambiente, seguindo o protocolo do *kit PAXgene Blood RNA (Qiagen/PreAnalytiX, Suíça)*. Após esse procedimento, a concentração e a pureza foram avaliadas em espectrofotômetro *Nano Drop One (Thermo Fisher Scientific, EUA)*. A absorbância foi demonstrada pela razão A260/A280 que variou de 1,9 a 2,1. As amostras de RNA foram transcritas para DNA complementar (*cDNA*) seguindo o protocolo do fabricante por meio da utilização de *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, EUA)*. Primeiramente, as reações permaneceram a 25°C durante 10 min sendo depois incubadas por 120 min a 37°C e, posteriormente, a 4°C. Até a realização da próxima etapa, as amostras foram armazenadas a -80°C.

A *qPCR* foi realizada com a utilização do sistema *TaqMan* para os genes alvo; as sondas e iniciadores foram utilizadas para os genes *hOGG1* (Hs00213454_m1) e *XRCC1* (Hs00959834_m1), e como gene endógeno selecionou-se a β -actina (*ACTB* - Hs99999903_m1). As amostras de *cDNA* foram colocadas em placas de 96 poços. Ciclos térmicos e detecção em tempo real da fluorescência foram realizados em um *ABI Prism 7500 FAST* (*Applied Biosystems*, EUA) segundo parâmetros de amplificação: desnaturação a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s e 60°C durante 60 s. Em cada placa, foram utilizados controles negativos (sem *cDNA*) a fim de assegurar ausência de contaminação, bem como controles por meio de amostras de *pool* de *cDNA* de indivíduos saudáveis (BRAZ *et al.*, 2011). A análise dos dados foi realizada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e os dados foram apresentados como porcentagem de expressão relativa.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as comparações entre os grupos em relação às características dos participantes, danos oxidativos no DNA e expressão gênica utilizou-se o teste t de Student. A distribuição do sexo foi analisada pelo teste do qui-quadrado. Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão ($X \pm DP$). As análises foram feitas no programa *SAS for Windows*, v. 9.3, EUA. Considerou-se nível de significância (p) de 5%.

4. RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentadas as características dos médicos participantes, mostrando a homogeneidade dos grupos estudados, já que eles foram pareados. Os anestesiológicos tiveram exposição média de 16 anos aos RGA.

Tabela 1 – Características dos grupos avaliados

Características	Grupos	
	Controle (n = 30)	Exposto (n = 30)
Idade (anos)	43 ± 16	42 ± 15
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	26 ± 5	26 ± 3
Sexo (masculino/feminino)	20 / 10	20 / 10

p > 0,05

A Tabela 2 mostra os resultados da avaliação de danos basais e oxidativos no DNA. Não houve diferença significativa entre os grupos nem entre os dois parâmetros avaliados (p > 0,05).

Tabela 2 – Danos no DNA detectados pelo teste do cometa

Parâmetros	Grupos	
	Controle (n = 30)	Exposto (n = 30)
Danos basais no DNA (u.a.)	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,4
Danos oxidativos no DNA (u.a.)	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,5

u.a. = unidade arbitrária. p > 0,05

A Figura 3 mostra que a expressão do gene *XRCC1* foi similar nos dois grupos ($p = 0,94$). Embora possa se observar que o grupo exposto teve leve aumento na quantidade de transcritos em relação ao *hOGG1*, sua expressão também não diferiu estatisticamente entre os grupos ($p = 0,25$).

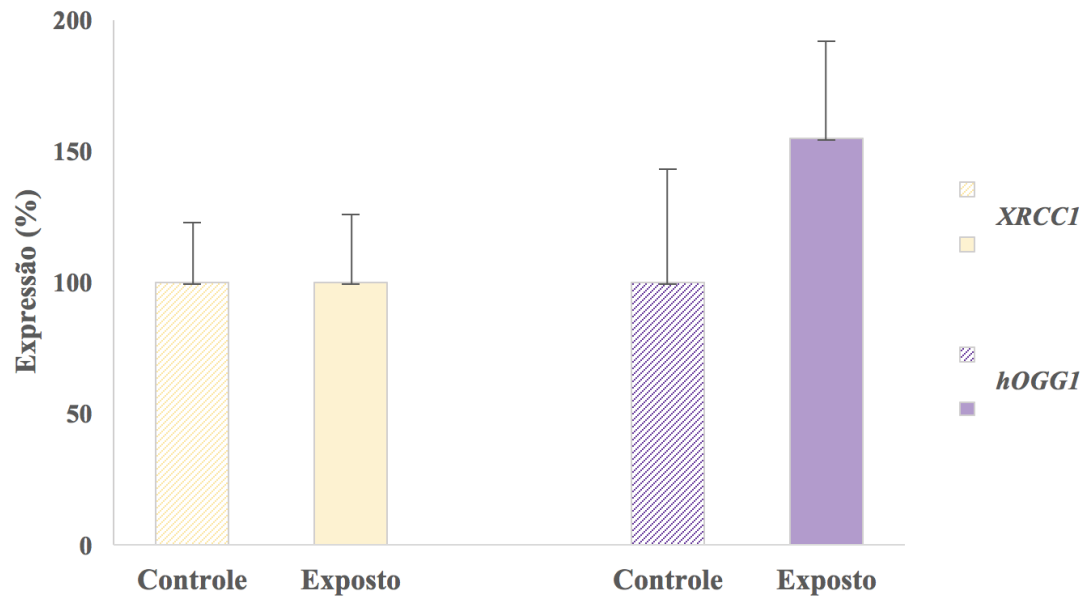


Figura 3 – Expressão relativa de genes de reparo de danos oxidativos no DNA em ambos os grupos estudados. $p > 0,05$

5. DISCUSSÃO

Nossos achados mostraram que a exposição ocupacional crônica aos RGA não induz danos oxidativos no DNA nem altera a expressão de genes relacionados ao reparo de lesões oxidativas no DNA em anesthesiologistas atuantes em hospital universitário. Possivelmente, como não houve indução de estresse oxidativo no material genético (teste do cometa), não houve estímulo para reparo de lesões oxidativas no material genético (expressão gênica).

Diversos trabalhos na literatura já observaram aumento de danos no DNA em profissionais com exposição crônica aos RGA, utilizando diversos marcadores genotóxicos e mutagênicos – teste do cometa, micronúcleo (MN), aberração cromossômica (AC) e troca entre cromátides irmãs (TCI) (CHANDRASEKHAR *et al.*, 2006; EROGLU; CELEP; ERCIYES, 2006; ROZGAJ *et al.*, 2009). Adicionalmente, BILBAN; JAKOPIN; OGRINC (2005) observaram aumento significativo de danos citogenéticos (MN, AC e TCI) em médicas anesthesiologistas expostas ao halotano, isoflurano e N₂O quando comparadas às tecnólogas em radiologia e mulheres não expostas aos RGA. Em uma revisão sistemática, Yilmaz e Çalbayram (2016) revisaram artigos publicados de 1989 a 2015 relacionados ao biomonitoramento e os possíveis riscos de profissionais expostos à poluição anestésica e concluíram que a exposição crônica a esses agentes pode causar efeitos genotóxicos cumulativos.

Em estudo mais antigo, Sardas *et al.* (1998) observaram que funcionários atuantes em SO apresentaram maior nível de danos genéticos que o grupo sem exposição aos RGA. Nesse estudo, também foi analisada a correlação entre o tempo de exposição e o nível de danos basais no DNA, porém não houve significância estatística entre essas duas variáveis. Wrońska-Nofer *et al.* (2012) observaram aumento da geração de ERO como consequência da exposição ocupacional ao N₂O. Por sua vez, essas moléculas reativas são capazes de induzir danos ao genoma em qualquer fase do ciclo celular, sendo uma justificativa para os achados nos quais foram encontrados associação entre exposição e indução de danos genéticos.

Contrariamente ao observado nesses estudos, nossos resultados demonstraram que mesmo após a exposição crônica (média de 16 anos) aos RGA, esses não foram capazes de induzir danos oxidativos no genoma no grupo exposto quando comparado ao grupo controle. Vale salientar que o uso da FPG aumenta tanto a sensibilidade

quanto a especificidade do teste do cometa em detectar lesões oxidativas no DNA. Szyfter *et al.* (2016), por meio de um estudo observacional com 100 indivíduos expostos aos RGA (isoflurano, sevoflurano, halotano e N₂O), também demonstraram que as lesões primárias no DNA dos linfócitos (teste do cometa) desses indivíduos não diferiram estatisticamente em comparação ao grupo não exposto.

A diversidade de resultados encontrados nos estudos relacionados à exposição ocupacional aos RGA pode ser explicada pelas diferenças no período de exposição e anestésicos utilizados, tamanho amostral e metodologias laboratoriais aplicadas (SZYFTER *et al.*, 2016), além de condições das SO. Ressalta-se que os anestesiológicos, no presente estudo, atuavam em SO com sistema parcial de exaustão de gases, utilizavam modernos aparelhos de anestesia além de modernos anestésicos halogenados, utilizavam baixo ou médio fluxo de gases e administravam bastante anestesia venosa, o que provavelmente contribui para menor poluição anestésica, o que pode ter contribuído para ausência de alterações oxidativas no material genético, quando avaliado em células do sangue periférico. Adicionalmente, um terço dos anestesiológicos avaliados eram docentes e, portanto, não estavam diariamente expostos aos RGA. Porém, essa realidade não é universal no Brasil nem em países em desenvolvimento ou não desenvolvidos, nos quais certamente a exposição ocupacional é mais intensa. Ressalta-se, porém, que, em mucosa bucal, nosso grupo de pesquisa já observou aumento na frequência de MN tanto em profissionais expostos por menor tempo de exposição quanto em profissionais cronicamente expostos aos RGA (SOUZA *et al.*, 2016; BRAZ *et al.*, 2018).

Sabe-se que os anestésicos halogenados antigos, como o halotano, tinham alta taxa de metabolização pela enzima CYP2E1 e, em menor grau pela CYP2A6, sendo relacionados com hepatotoxicidade e maior estresse oxidativo. Por outro lado, os halogenados mais recentes e mais comumente utilizados, como o isoflurano, apesar de apresentar estrutura química semelhante ao halotano, possui baixa taxa de biotransformação (NJOKU *et al.*, 1997). O desflurano apresenta alta estabilidade, sendo apenas 0,02% de seu composto biotransformado. Já o sevoflurano difere dos demais anestésicos em sua estrutura química e apresenta taxa um pouco maior de metabolização (2 a 5%). Ressalta-se que nesse estudo foram avaliados os anestésicos halogenados modernos, os quais são poucos metabolizados pelo organismo, além do N₂O, que é um gás e não é metabolizado (TORRI, 2010).

A hipótese de que a exposição prolongada aos RGA causaria alteração na expressão de genes relacionados ao reparo de lesões oxidativas não foi confirmada. Assim, demonstrou-se pela primeira vez na literatura que a exposição ocupacional em anestesiológistas atuantes em centro cirúrgico de hospital universitário não altera a expressão desses genes-chave. A expressão de *XRCC1* está envolvida no reparo eficiente de quebras de fita simples de DNA formadas após a exposição à ionização e agentes alquilantes, sendo um gene responsável na participação de reparo tipo *BER*. O gene *hOOG1* codifica uma enzima responsável pela excisão da 8-oxoguanina que corresponde a um subproduto de base mutagênica resultante da exposição a ERO (BRAZ *et al.*, 2011). De fato, os achados de ausência de alteração significativa na expressão relativa desses dois genes estudados vêm de encontro à ausência de indução de danos oxidativos no DNA. Possivelmente, como não houve indução de estresse oxidativo no material genético, não houve necessidade de reparo de lesões oxidativas no DNA.

Apesar da importância desses genes na prevenção de mutações associadas a danos oxidativos, pode ser que outros mecanismos e vias possam estar envolvidos em relação aos possíveis efeitos tóxicos implicados na exposição ocupacional aos RGA. Ressalta-se a importância da suscetibilidade individual e da capacidade de reparo, as quais são influenciadas por polimorfismos gênicos. Portanto, investigar as variações individuais e a frequência da instabilidade genética em profissionais ocupacionalmente expostos pode ser ferramenta útil na identificação e quantificação do risco dos RGA à saúde desses indivíduos.

Além disso, outras medidas como a regulamentação de limites de exposição, desenvolvimento de medidas educativas e políticas de manutenção preventiva dos equipamentos de anestesia e instalação de sistemas adequados de exaustão de gases no centro cirúrgico poderiam minimizar a poluição anestésica e consequentemente reduzir a exposição desses profissionais até que mais estudos sejam realizados.

6. CONCLUSÃO

Diante das condições do estudo, sugere-se que a exposição crônica aos RGA mais comumente utilizados não esteja associada aos danos oxidativos no genoma nem à modulação de expressão de genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA de anestesiológicos atuantes em centro cirúrgico de hospital universitário. Porém, ressalta-se a importância do constante biomonitoramento humano para a identificação e quantificação de possíveis riscos que os RGA possam exercer sobre a saúde dos profissionais expostos.

7. REFERÊNCIAS*

ABBOTTS, R.; WILSON, D. M. 3rd. Coordination of DNA single strand break repair. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 107, p. 228-244, 2017.

BECKER, D. E.; ROSENBERG, M. Nitrous oxide and the inhalation anesthetics. **Anesthesia Progress**, Chicago, v. 55, p. 124-130, 2008.

BILBAN, M.; JAKOPIN, C. B.; OGRINC, D. Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). **International Archives of Occupational and Environmental Health**, London, v. 78, p. 60-64, 2005.

BRAZ, L. G.; BRAZ, J. R. C.; CAVALCANTE, G. A. S.; SOUZA, K. M.; LUCIO, L. M. C.; BRAZ, M. G. Comparação de resíduos de gases anestésicos em salas de operação com ou sem sistema de exaustão em hospital universitário brasileiro. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 67, p. 516-520, 2017.

BRAZ, M. G.; FÁVERO SALVADORI, D. M. Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 21, p. 972-976, 2007.

BRAZ, M. G.; MAZOTI, M. Á.; GIACOBINO, J.; BRAZ, L. G.; GOLIM, MDE. A.; FERRASI, A. C.; DE CARVALHO, L. R.; BRAZ, J. R.; SALVADORI, D. M. Genotoxicity, cytotoxicity and gene expression in patients undergoing elective surgery under isoflurane anaesthesia. **Mutagenesis**, Oxford, v. 26, p. 415-420, 2011.

BRAZ, M. G.; BRAZ, L. G.; MAZOTI, M. A.; PINOTTI, M. F.; PARDINI, M. I.; BRAZ, J. R.; SALVADORI, D. M. Lower levels of oxidative DNA damage and apoptosis in lymphocytes from patients undergoing surgery with propofol anesthesia. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 53, p. 70-77, 2012.

BRAZ, M. G.; SOUZA, K. M.; LUCIO, L. M. C.; DI RENZO, G. C. C.; FELICIANO, L. M.; MARCONDES, J. P. C.; CHEN, C. O.; BRAZ, J. R. C.; BRAZ, L. G. Detrimental effects detected in exfoliated buccal cells from anesthesiology medical residents occupationally exposed to inhalation anesthetics: An observational study. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 832-833, p. 61-64, 2018.

BROWN, E. N.; PURDON, P. L.; VAN DORT, C. J. General anesthesia and altered states of arousal: a systems neuroscience analysis. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 34, p. 601-628, 2011.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 68 p.

BYHAHN, C.; HELLER, K.; LISCHKE, V.; WESTPHAL, K. Surgeon's occupational exposure to nitrous oxide and sevoflurane during pediatric surgery. **World Journal of Surgery**, New York, v. 25, p.1109-1112, 2001.

CACIARI, T.; CAPOZZELLA, A.; TOMEI, F.; FIASCHETTI, M.; SCHIFANO, M. P.; GIOFFRÈ, P. A.; SANTORO, L.; SACALA, B.; NARDONE, N.; DE, SIO. S.; CHIGHINE, A.; TOMEI, G.; ROSATI, M. V. Professional exposure to anaesthetic gases in health workers: estimate of some hepatic and renal tests. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 164, p. 5-9, 2013.

CANNAN, W. J.; RASHID, I.; TOMKINSON, A. E.; WALLACE, S. S.; PEDERSON, D. S. The Human Ligase III α -XRCC1 Protein Complex Performs DNA Nick Repair after Transient Unwrapping of Nucleosomal DNA. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 292, p. 5227-5238, 2017.

CASALE, T.; CACIARI, T.; ROSATI, M. V.; GIOFFRÈ, P. A.; SCHIFANO, M. P.; CAPOZZELLA, A.; PIMPINELLA, B.; TOMEI, G.; TOMEI, F. Anesthetic gases and occupationally exposed workers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 37, p. 267-274, 2014.

CHANDRASEKHAR, M.; REKHADEVI, P. V.; SAILAJA, N.; RAHMAN, M. F.; REDDY, J. P.; MAHBOON, M.; GROVER, P. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. **Mutagenesis**, Oxford, v. 21, p. 249-254, 2006.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STĚTINA, R. The comet assay: what can it really tell us?. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, p.183-193, 1997.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, p.143-151, 2008.

COSTA PAES, E. R.; BRAZ, M. G.; LIMA, J. T.; GOSMES DA SILVA, M. R.; BENTES DE SOUSA, L.; LIMA, E. S.; CARVALHO DE VASCONCELLOS, M.; CERQUEIRA BRAZ, J. R. DNA damage and antioxidant status in medical residents occupationally exposed to waste anesthetic gases. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 29, p. 280-286, 2014.

EROGLU, A.; CELEP, F.; ERCIYES, N. A comparison of sister chromatid exchanges in lymphocytes of anesthesiologists to nonanesthesiologists in the same hospital. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 102, p. 1573-1577, 2006.

FAIRLEY, H. B. Anesthesia in the Inca empire. **Revista Española de Anestesiología y Reanimación**, Barcelona, v. 54, p. 556-562, 2007.

GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communications**, London, v. 19, p. 141-158, 1993.

HOBBHAHN, J.; HOERAUF, K.; WIESNER, G.; SCHRÖGENDORFER, K.; TAEGER, K. Waste gas exposure during desflurane and isoflurane anaesthesia. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 42, p. 864-867, 1998.

IZDES, S.; SARDAS, S.; KADIOGLU, E.; KARAKAYA, A. E. DNA damage, glutathione, and total antioxidant capacity in anesthesia nurses. **Archives of Environmental & Occupational Health**, Washington, v. 65, p. 211-217, 2010.

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. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 439, p. 199-206, 1999.

KITZ, R. J.; VANDAM, L. D. O campo da prática anestésica moderna. In: MILLER, R. D. **Anestesia**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1993. p. 3-9.

LINDAHL, T.; NYBERG, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, Washington, v. 11, p. 3610-3618, 1972.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUCCHINI, R.; PLACIDI, D.; TOFFOLETTO, F.; ALESSIO, L. Neurotoxicity in operating room personnel working with gaseous and nongaseous anesthesia. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, London, v. 68, p.188-192, 1996.

LUCIO, L. M. C.; BRAZ, M. G.; NASCIMENTO JUNIOR, P.; BRAZ, J. R. C.; BRAZ, L. G. Occupational hazards, DNA damage, and oxidative stress on exposure to waste anesthetic gases. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 68, p. 33-41, 2018.

MALEKIRAD, A. A.; RANJBAR, A.; RAHZANI, K.; KADKHODAEI, M.; REZAIE, A.; TAGHAVI, B.; ABDOLLAHI, M. Oxidative stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 24, p. 597-601, 2005.

MAIA, R. I.; FERNANDES, C. R. Dawning of inhalational anesthesia: a historical perspective. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 52, p. 774-782, 2002.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 674, p. 73-84, 2009.

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).

NJOKU, D.; LASTER, M. J.; GONG, D. H.; EGER, E. I. 2nd; REED, G. F.; MARTIN, J. L. Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 84, p. 173-178, 1997.

OLIVEIRA, C. R. Occupational exposure to anesthetic gases residue. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 59, p. 110-124, 2009.

KRAJEWSKI, W.; KUCHARSKA, M.; PILACIK, B.; FOBKER, M.; STETKIEWICZ, J.; NOFER, J. R.; WRONSKA-NOFER, T. Impaired vitamin B12 metabolic status in healthcare workers occupationally exposed to nitrous oxide. **British Journal of Anaesthesia**, Oxford, v. 99, p. 812-818, 2007.

RESTREPO, J. G.; GARCIA-MARTÍN, E.; MATÍNEZ, C.; AGÚNDEZ, J. A. Polymorphic drug metabolism in anaesthesia. **Current Drug Metabolism**, Bussum, v. 10, p. 236-246, 2009.

ROBINSON, D. H.; TOLEDO, A. H. Historical development of modern anesthesia. **Journal of Investigative Surgery**, London, v. 25, p. 141-149, 2012.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 112-119, 2001.

ROZGAJ, R.; KASUBA, V.; BROZOVIĆ, G.; JAZBEC, A. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, London, v. 212, p. 11-17, 2009.

SANDERS, R. D.; WEIMANN, J.; MAZE, M. Biologic effects of nitrous oxide: a mechanistic and toxicologic review. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 109, p. 707-722, 2008.

SARAIVA, R. Â. Mecanismo de Ação dos Anestésicos Inalatórios. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 52, p. 114-123, 2002.

SARAIVA, R. Â. Desflurano: propriedades físico-químicas, farmacologia e uso clínico. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 53, p. 214-226, 2003.

SARDAS, S.; AYGÜN, N.; GAMLI, M.; UNAL, Y.; BERK, N.; KARAKAYA, A. E. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 418, p. 93-100, 1998.

SCHUTTLE, J.; SCHWILDEN, H. **Modern anesthetics**: handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer, 2008.

SHIRANGI, A.; FRITSCHI, L.; HOLMAN, C. D. Associations of unscavenged anesthetic gases and long working hours with preterm delivery in female veterinarians. **Obstetrics & Gynecology**, New York, v. 113, p. 1008-1017, 2009.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, p.184-191, 1988.

SLOAN, I. A. The new anesthesia machines. **Canadian Journal of Anesthesia**, Toronto, v. 47, p. 201-204, 2000.

SOUZA, K. M.; BRAZ, L. G; NOGUEIRA, F. R.; SOUZA, M. B.; BINCOLETO, L. F.; AUN, A. G.; CORRENTE, J. E.; CARVALHO, L. R.; BRAZ, J. R. C.; BRAZ, M.G. Occupational exposure to anesthetics leads to genomic instability, cytotoxicity and proliferative changes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 791-792, p. 42-48, 2016.

SZYFTER, K.; STACHECKI, I.; KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M.; SZAUMKESSEL, M.; SZYFTER-HARRIS, J.; SOBCZYNSKI, P. Exposure to volatile anaesthetics is not followed by a massive induction of single-strand DNA breaks in operation theatre personnel. **Journal of Applied Genetics**, Poland, v. 57, p. 343-348, 2016.

TICE, R. R.; ANDREWS, P. W.; HIRAI, O.; SINGH, N. P. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 283, p. 157-164, 1991.

TORRI, G. Inhalation anesthetics: a review. **Minerva Anestesiologica**, Torino, v. 76, p. 215-228, 2010.

TÜRKAN, H.; AYDIN, A.; SAYAL, A. Effect of volatile anesthetics on oxidative stress due to occupational exposure. **World Journal of Surgery**, v. 29, p. 540-542, 2005.

VANIS-VATRENJAK, S.; MESIC, A.; ABDAGIC, I.; MUJEZINOVIC, D.; ZVIZDIC, Z. Quality and safety of general anesthesia with propofol and sevoflurane in children aged 1-14 based on laboratory parameters. **Medical Archives**, Bosnia, v. 69, p. 218-221, 2015.

WALLACE, S. S. Base excision repair: a critical player in many games. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 19, p. 14-26, 2014.

WHALEN, F. X.; BACON, D. R.; SMITH, H. M. Inhaled anesthetics: an historical overview. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, Amsterdam, v. 19, p. 323-330, 2005.

WHITAKER, A. M.; SCHAICH, M. A.; SMITH, M. R.; FLYNN, T. S.; FREUDENTHAL, B. D. Base excision repair system. **Frontiers in Bioscience**, Landmark, v. 22, p. 1493-1522, 2017.

WIESNER, G.; HARTH, M.; SZULC, R.; JURCZYK, W.; SOBCZYNSKI, P.; HOERAUF, K. H.; HOBBAHN, J.; TAEGER, K. A follow-up study on occupational exposure to

inhaled anaesthetics in Eastern European surgeons and circulating nurses. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, London, v. 74, p. 16-20, 2001.

WIESNER, G.; SCHIEWE-LANGGARTNER, F.; LINDNER, R.; GRUBER, M. Increased formation of sister chromatid exchanges, but not of micronuclei, in anaesthetists exposed to low levels of sevoflurane. **Anaesthesia**, Oxford, v. 63, p. 861-864, 2008.

WROŃSKA-NOFER, T.; NOFER, J. R.; JAJITE, J.; DZIUBALTOWSKA, E.; SZYMCZAK, W.; WASOWICZ, W.; RYDZYNSKI, K. Oxidative DNA damage and oxidative stress in subjects occupationally exposed to nitrous oxide (N₂O). **Mutation Research**, Amsterdam, v. 731, p. 58-63, 2012.

YILMAZ, S.; ÇALBAYRAM, N. Ç. Exposure to anesthetic gases among operating room personnel and risk of genotoxicity: A systematic review of the human biomonitoring studies. **Journal of Clinical Anesthesia**, Stoneham, v. 25, p. 326-331, 2016.