



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

Flávia Ribeiro Nogueira

**A anestesia inalatória com desflurano associada ou não
ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo
em pacientes?**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Gobbo Braz
Coorientador: Prof. Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz

**Botucatu
2017**

Flávia Ribeiro Nogueira

**A anestesia inalatória com desflurano associada ou não
ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo
em pacientes?**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Gobbo Braz
Coorientador: Prof. Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz

Botucatu
2017

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

Nogueira, Flavia Ribeiro.

A anestesia inalatória com desflurano associado ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes? / Flavia Ribeiro Nogueira. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Mariana Gobbo Braz

Coorientador: José Reinaldo Cerqueira Braz

Capes: 20206003

1. Anestésicos inalatórios. 2. Stress oxidativo. 3. Óxido nitroso. 4. Toxicologia genética. 5. Cirurgia.

Palavras-chave: Anestésicos inalatórios; Estresse oxidativo; Genotoxicidade; Óxido nitroso; Procedimentos cirúrgicos eletivos.

Dedicatória

“Sempre dando graças por tudo a Deus, o Pai”

Efésios 5:20

Dedico primeiramente a Deus que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

“Honra o teu pai e a tua mãe, este é o primeiro mandamento como promessa para que tudo te corra bem...”

Efésios 6:1-3

Aos meus pais Ana Izabel Ribeiro Nogueira e Milton de Souza Nogueira (*in memoriam*), meu porto seguro, obrigada pelo amor, carinho e esforço que dirigiram minha formação dentro e fora de casa, formaram os fundamentos do meu caráter, que carrego por toda minha vida. Obrigada por serem a minha referência de tantas maneiras e estarem sempre presentes na minha vida e segurarem minhas mãos e me ensinarem a dádiva da vida, da fé, do amor e da esperança.

**“Portanto, quem se tornar humilde como uma criança, esse é o maior
no reino dos céus”**

Mateus 18:4

Aos meus sobrinhos Isac Nogueira Oliveira Souza, Isabela Nogueira Oliveira Souza, Amanda Nogueira Garcia (*in memoriam*) e Davi Nogueira Garcia, por me proporcionarem tantos momentos alegres e sorrisos incessantes. Vocês são exemplos de pureza, alegria, perdão e amor.

Agradecimentos especiais

À minha orientadora

Doutora Mariana Gobbo Braz,

Agradeço sobremaneira minha orientadora, pela orientação segura e preciosa, pela devoção, dedicação, incentivo e inestimável influência em minha formação científica e profissional.

“Mas, como está escrito: As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o amam”.

I Coríntios 2:9

Agradecimentos especiais

Ao meu coorientador

Professor Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz,

a quem admiro e respeito. Agradeço pela mansidão, prudência e ensinamentos seguros e precisos.

“A recompensa da humildade e do temor do Senhor são a riqueza, a honra e a vida”.

Provérbios 22:4

Agradecimentos

“Antes de tudo, sou grata ao meu Deus, por todos vocês...”

Romanos 1:8

*A Deus, que nos escolheu e nos constituiu
Continuadores da sua vida e de sua obra
Através da sua força
Vencemos e chegamos até aqui.*

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para execução deste trabalho.

À toda minha família, que sempre esteve presente, respaldando-me em todas as circunstâncias.

Às minhas irmãs Talita Ribeiro Nogueira Garcia e Roberta Ribeiro Nogueira Oliveira Souza pela palavra amiga, amizade, cuidado e apoio incondicional.

Ao meu namorado Rafael José de Castro por tornar meus dias mais leves, amigo de todas as horas, companheiro e incentivador.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo torcendo e vibrando a cada vitória e principalmente as incansáveis orações.

Ao Professor Doutor Leandro Gobbo Braz, que foi fundamental na execução deste trabalho, pela ajuda na seleção dos pacientes e coleta dos dados. Pela serenidade, bondade e humildade.

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia, Nelí Aparecida Pavan, André Renato Passaroni, Joana Jacirene Costa Teixeira e Sônia Maria Martins e Silva por de

maneira sempre disposta me ajudar quando necessário, pelo apreço e capricho com que conduzem suas atividades.

A todos os docentes do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP por propagarem pesquisa de qualidade e seriedade ao conduzirem seus ensinamentos.

Aos médicos residentes que de maneira solícita participaram deste trabalho na coleta sanguínea dos pacientes, principalmente ao Leonardo Riedi de Andrade que colaborou desde o início da pesquisa na seleção dos pacientes.

Aos pacientes, que além de aceitarem participar deste trabalho, compreenderam a importância da pesquisa.

À Prof^a Dr^a Lídia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu IBB/UNESP, pela imensa contribuição ao realizar as análises estatísticas.

À toda equipe do laboratório GENOTOX (FMB/UNESP), principalmente à Kátina Meneghetti de Souza pela amizade que temos desde o início, por sempre me ajudar dentro e fora do laboratório e estar presente em todos os momentos. À Aline Garcia Aun por ser uma grande amiga de longa data e sempre estar disposta a auxiliar em qualquer momento ou situação. Minha gratidão é eterna por você ter me ajudado nos momentos mais difíceis da minha vida. À Vickeline Namba por ser uma querida amiga dentro e fora do laboratório e à Nayara Micarelli Arruda pela amizade e disposição em ajudar no que fosse necessário. Agradeço imensamente essa maravilhosa equipe que formamos e pela harmonia que nos une.

À Dr^a Lorena Mendes de Carvalho Lucio pela disponibilidade e extrema simpatia ao tirar minhas dúvidas tornando-se uma amiga querida.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da FMB/UNESP, Maria Regina Moretto, Silvia Regina de Toledo Estevan, Camila Renata Corrêa e

Vickeline Namba, pelos ensinamentos, disposição e paciência ao explicar e reproduzir cada método quando necessário com afabilidade.

Ao Eduardo Jodi Kuninari por não medir esforços em ajudar, profissionalmente ou pessoalmente, amigo de grande valia.

À secretária Tatiane de Fátima Pineiz Biondo pelas orientações durante todo o processo de Pós-Graduação, pela bondade e simpatia contagiante.

À toda equipe do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica (Omic), principalmente ao João Paulo de Castro Marcondes e Juliana Lara, pela doçura, pelo apoio intelectual e gentileza em todos os momentos que precisei. À Prof^ª Dr^ª Daisy Maria F. Salvadori pela gentileza em permitir minhas análises do teste do cometa em seu laboratório.

A todos os funcionários e alunos da UNIPEX da FMB/UNESP, do Hospital das Clínicas da FMB/UNESP e do IBB da FMB/UNESP que de alguma maneira participaram no desenvolver desse trabalho.

A todos os excelentes profissionais que conheci em Boston/EUA, principalmente ao Professor Chung-Yen Oliver Chen do Antioxidants Research Laboratory, Tufts University, que, apesar do pouco tempo que fiquei (Doutorado Sanduíche), me orientou, tirou dúvidas, ensinou com paciência, questionou e me recebeu com gentileza. Agradeço também ao Jason Walsh pelos ensinamentos técnicos e descontração durante o meu período em Boston.

À Rosemary Cristina da Silva e à Rosemeire Aparecida Vicente, funcionárias 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) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2013/16842-0) pela concessão de auxílio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

“Porque d’Ele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas”

Romanos 11:36

Resumo

Nogueira FR. A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes? [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2017. 79 f.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e de estresse oxidativo do anestésico inalatório halogenado desflurano, associado ou não ao gás óxido nitroso (N₂O). O estudo foi realizado em 40 indivíduos, de ambos os sexos, com estado físico classificado pelo *American Society of Anesthesiologists* (ASA) I, com idade de 18 a 50 anos. Os pacientes foram aleatoriamente alocados em dois grupos de 20, sob desflurano (6%) ou desflurano com N₂O (60%) e foram submetidos a cirurgia minimamente invasiva (septoplastia) com duração mínima de 90 minutos. Amostras sanguíneas foram coletadas antes dos pacientes receberem medicação pré-anestésica (M₀-controle), aos 90 minutos após o início da anestesia inalatória (M₁) e na manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico (M₂). Os danos basais e oxidativos no ácido desoxirribonucleico (DNA) foram avaliados pelo teste do cometa; o estresse oxidativo foi avaliado por marcadores de peroxidação lipídica como malonaldeído (MDA) pelo método de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e 8-isoprostano pelo método de imunoenensaio; a oxidação proteica foi avaliada por proteínas carboniladas por imunoenensaio e o teste de defesa antioxidante plasmática analisado por fluorometria e pelo *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), por espectrofotometria. Não houve diferença significativa em relação os dados demográficos, tempo de cirurgia ou doses dos fármacos administrados entre os grupos. Os resultados de genotoxicidade, estresse oxidativo e da capacidade antioxidante não diferiram estatisticamente entre os dois grupos. Entretanto, na manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico, a anestesia mantida com desflurano mostrou aumento de danos no DNA ($p = 0,01$) e peroxidação lipídica por 4-HNE ($p = 0,03$). Por outro lado, os marcadores de danos oxidativos no DNA, peroxidação lipídica (MDA e 8-isoprostano), proteínas carboniladas e FRAP não se alteraram nos grupos desflurano e desflurano/N₂O ($p > 0,05$). Dessa forma, o N₂O não intensificou os efeitos genotóxicos nem de estresse oxidativo do halogenado desflurano, revelando ser técnica anestésica segura em indivíduos hígidos submetidos a cirurgia minimamente invasiva com duração mínima de 90 minutos.

Palavras-chave: anestésicos inalatórios, óxido nitroso, procedimentos cirúrgicos eletivos, genotoxicidade, estresse oxidativo.

Abstract

Nogueira FR. Does desflurane anesthesia associated or not with nitrous oxide induce genotoxicity and oxidative stress in patients? [thesis]. Botucatu: Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista; 2017. 79 p.

The current study aimed to evaluate the possible genotoxic and oxidative stress effects of the inhalational halogenated anesthetic desflurane, associated or not with nitrous oxide (N₂O). The study was conducted in 40 patients of both sexes, with physical status classified by the American Society of Anesthesiologists (ASA) I, aged 18 to 50 years. Patients who underwent minimally invasive surgery (septoplasty) lasting at least 90 minutes were randomly allocated into two groups of 20 under desflurane (6%) or desflurane with N₂O (60%). Blood samples were collected before the patient received the pre-anesthetic medication (T₀-baseline), 90 minutes after the beginning of inhalation anesthesia (T₁) and on the morning of the postoperative first day (T₂). The basal and oxidative damages in deoxyribonucleic acid (DNA) were evaluated by the comet assay; oxidative stress was evaluated by lipoperoxidation markers as malonaldehyde (MDA) assessed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), 4-hydroxynonenal (4-HNE) and 8-iso-prostaglandin F₂ α (8-isoprostane) by immunoassay; for protein oxidation, the carbonylated proteins were evaluated by immunoassay, and plasma antioxidant defense was analyzed by fluorometry and also by the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), detected by spectrophotometry. There were no significant differences between the groups regarding demographic data, time of surgery or doses of the drugs administered. The results of genotoxicity, oxidative stress and antioxidant capacity did not differ statistically between both groups. However, on the morning of the postoperative first day, anesthesia with desflurane showed increase of DNA damage ($p = 0.01$) and lipid peroxidation by 4-HNE ($p = 0.03$). On the other hand, markers of oxidative damage in DNA, lipid peroxidation (MDA and 8-isoprostane), protein carbonyl, and FRAP changed neither in the desflurane nor in the desflurane/N₂O group ($p > 0.05$). Thus, N₂O did not intensify genotoxic and oxidative stress effects of the halogenated desflurane, proving to be a safe anesthetic technique in healthy individuals who undergo minimally invasive surgery lasting at least 90 minutes.

Keywords: inhalation anesthetics, nitrous oxide, elective surgical procedures, genotoxicity test, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1	Fórmula estrutural dos anestésicos inalatórios mais recentes e do óxido nitroso.....	20
Figura 2	Esquema representando as etapas do teste do cometa..	23
Figura 3	Microscopia fluorescente dos nucleoides avaliados pelo teste do cometa.....	23
Figura 4	Fontes e respostas às espécies reativas de oxigênio endógenas e exógenas e sistema de defesa antioxidante. Quando em equilíbrio, há homeostase, porém quando não eficiente, pode diminuir a resposta proliferativa e defesa do organismo ou permitir a instalação de estresse oxidativo.....	26
Figura 5	Fluxograma dos pacientes do estudo.....	33
Figura 6	Danos basais no DNA (quebras de fita e sítios alcalilábeis) segundo momentos e grupos.....	45
Figura 7	Valores de 4-HNE de pacientes submetidos a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano associado ao N₂O, nos três momentos avaliados.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1	Coefficiente de solubilidade sanguínea, pressão de vapor e ponto de ebulição dos anestésicos inalatórios....	18
Tabela 2	Porcentagem de degradação metabólica e concentração alveolar mínima (CAM) dos anestésicos inalatórios.....	19
Tabela 3	Dados demográficos dos pacientes dos dois grupos avaliados.....	42
Tabela 4	Dados relativos à anestesia e cirurgia.....	42
Tabela 5	Dados hemodinâmicos dos pacientes dos grupos estudados.....	43
Tabela 6	Valores de saturação periférica de oxigênio (SpO₂), pressão expirada de dióxido de carbono (P_{ET}CO₂), concentração expirada de desflurano (DE_SEXP) e temperatura esofágica (T_{ESOF}) segundo momentos e grupos avaliados.....	44
Tabela 7	Danos oxidativos em bases do DNA segundo momentos e grupos apresentados como <i>tail intensity</i> (%).....	46
Tabela 8	Marcadores de estresse oxidativo em lipídios e proteína carbonilada de pacientes submetidos a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano associado ao N₂O nos três momentos avaliados.....	47
Tabela 9	Parâmetros de defesa antioxidante avaliados em pacientes submetidos a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano/N₂O nos três momentos avaliados.....	48

Sumário

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	x
Resumo.....	xi
<i>Abstract</i>	xii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Anestesia inalatória.....	16
1.2 Propriedade farmacológica dos anestésicos e gases inalatórios.....	17
1.3 Uso clínico do óxido nitroso.....	21
1.4 Genotoxicidade dos gases e anestésicos inalatórios.....	21
1.5 Estresse oxidativo dos gases e anestésicos inalatórios.....	25
1.6 Justificativa do estudo.....	29
2 OBJETIVO.....	31
3 MÉTODO.....	32
3.1 Ética e registro.....	32
3.2 Casuística.....	32
3.3 Aleatorização dos grupos.....	33
3.4 Monitorização e procedimento anestesiológico.....	34
3.5 Coleta de material biológico.....	35
3.6 Avaliação de danos basais e oxidativos no DNA.....	36
3.7 Avaliação de marcadores oxidativos em lipídios e proteínas.....	38
3.7.1 Avaliação de peroxidação lipídica.....	38
3.7.2 Avaliação de proteínas carboniladas.....	39
3.8 Avaliação de defesa antioxidante.....	39
3.8.1 Capacidade antioxidante.....	39
3.8.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	40
3.9 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	56
7 REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	68
ANEXO B - Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos.....	69
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	70
APÊNDICE B - Questionário.....	72
APÊNDICE C - Protocolo da Pesquisa.....	76

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, milhões de pessoas são submetidas anualmente a procedimento cirúrgico sob anestesia geral (Schifilliti *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, um grande número de profissionais que trabalha no centro cirúrgico está exposto ocupacionalmente aos resíduos de gases anestésicos. Embora haja grande diferença em termos de concentração e duração da exposição, todos esses indivíduos estão sujeitos ao potencial risco relacionado à exposição aos anestésicos. Enquanto os pacientes são expostos a altas concentrações anestésicas, mas de forma aguda, quando submetidos ao ato cirúrgico, os profissionais que atuam em centro cirúrgico são expostos a concentrações anestésicas muito menores que a dos pacientes, mas em exposição que pode se estender por muitos anos e décadas.

1.1 Anestesia inalatória

A utilização de anestésicos inalatórios começou em meados de 1.800 (Stachnik, 2006) e a demonstração pública bem-sucedida com dietil éter, em 1.846 em Boston (EUA), sinalizou o nascimento de uma era moderna em anestesiologia (Chang *et al.*, 2015). Vários outros compostos surgiram posteriormente, mas o dietil éter manteve-se como padrão de referência nas décadas seguintes por ser seguro e de fácil utilização, mas com inconvenientes como elevada inflamabilidade, alta solubilidade sanguínea e lipídica e indução recorrente de náuseas e vômitos (Sakai *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2015).

Outro agente com importante papel na história da anestesiologia é o óxido nitroso (N₂O), o qual tem sido utilizado desde 1.844 inicialmente por odontologistas, mas que ganhou espaço na área cirúrgica alguns anos mais tarde, com a possibilidade de apresentação em cilindros de metal, o que aumentou a sua disponibilidade e utilização generalizada, inicialmente, como adjuvante da anestesia geral inalatória com dietil éter e, posteriormente, com os anestésicos halogenados (Hopkins, 2005).

Avanços em química, após a segunda guerra mundial, permitiram o desenvolvimento de anestésicos halogenados, os quais são mais estáveis e potentes, não inflamáveis e menos tóxicos que o dietil éter (Stachnik, 2006). Assim, a introdução dos

anestésicos halogenados representou avanço significativo no desenvolvimento da anestesia (Jakobsson, 2012). Em 1.956, o halotano, um alcano fluorado, foi introduzido e rapidamente substituiu o dietil éter como anestésico de escolha. Porém, seu uso foi limitado devido à sua associação com hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (Stachnik, 2006). Entretanto, esse anestésico ainda é utilizado em países em desenvolvimento. Vários compostos halogenados com ligações éter foram introduzidos na prática anesthesiológica, como: enflurano em 1.972, isoflurano em 1.981, desflurano em 1.992 e sevoflurano em 1.995 (Stachnik, 2006). Os halogenados sevoflurano e desflurano representam os anestésicos mais modernos, de terceira geração (Jakobsson, 2012). O uso do desflurano se tornou generalizado nos Estados Unidos e em partes da Europa (Young & Apfelbaum, 1995), mas seu lançamento, no Brasil, foi feito recentemente, principalmente pela necessidade de ser utilizado em vaporizador especial.

1.2 Propriedade farmacológica dos anestésicos e gases inalatórios

O sevoflurano e o desflurano são agentes que têm propriedades físico-químicas mais favoráveis que os halogenados mais antigos, por terem baixas solubilidade sanguínea e taxa de metabolização (Stachnik, 2006). A solubilidade sanguínea do agente anestésico é representada pelo coeficiente de partição sangue/gás, que é a razão entre a concentração do anestésico no sangue com a concentração do anestésico em fase gasosa. Os agentes com menor coeficiente de partição sangue/gás são mais rapidamente absorvidos e eliminados, produzindo, portanto, rápida indução e recuperação anestésicas (Stachnik, 2006). Assim, a solubilidade dos anestésicos inalatórios varia de 0,45 para o desflurano a 2,4 para o halotano (Tabela 1). Semelhantemente ao N₂O, o desflurano é o anestésico halogenado com menor solubilidade sanguínea. Assim, sua concentração alveolar tende a se aproximar da concentração inspirada muito mais rapidamente do que qualquer outro agente volátil e o tempo de recuperação do desflurano é aproximadamente metade do tempo do isoflurano (Stachnik, 2006). Entretanto, o desflurano é extremamente volátil em temperatura ambiente devido à sua alta pressão de vapor e baixo ponto de ebulição (Tabela 1), razões pelas quais, diferentemente dos demais halogenados, houve a necessidade do desenvolvimento de vaporizador especial para sua utilização. Também

pela sua elevada pungência, o desflurano provoca irritação das vias aéreas, o que impossibilita seu uso como indutor anestésico (Saraiva, 2003).

Tabela 1 - Coeficiente de solubilidade sanguínea, pressão de vapor e ponto de ebulição dos anestésicos inalatórios (adaptado de Saraiva, 2003)

Anestésico	Coeficiente Sangue/Gás	Pressão de Vapor (mmHg a 20°C)	Ponto de Ebulição (°C)
Óxido Nitroso	0,47	-	-
Halotano	2,4	244	50,2
Isoflurano	1,4	240	48,5
Sevoflurano	0,65	170	58,5
Desflurano	0,45	600	22,8

Os anestésicos inalatórios são absorvidos a partir dos alvéolos para a circulação sistêmica e a principal via de eliminação é pulmonar, com taxa de metabolização hepática variável de acordo com os halogenados (Sakai *et al.*, 2005; Stachnik, 2006). Na Tabela 2 é mostrada a taxa de degradação metabólica desses agentes. Ressalte-se que o N₂O praticamente não é metabolizado e o desflurano tem a menor metabolização dentre os halogenados, com mínima formação de metabólitos (Njoku *et al.*, 1997). Assim, essas propriedades farmacocinéticas do desflurano em conjunção com sua baixa solubilidade lipídica (a menor entre os halogenados), fazem com que este anestésico tenha rápida recuperação anestésica (Morgan Jr & Mikhail, 2003).

Tabela 2 - Porcentagem de degradação metabólica e concentração alveolar mínima (CAM) dos anestésicos inalatórios (Saraiva, 2003)

Anestésico	Degradação metabólica (%)	CAM (%)
Óxido Nitroso	0,004	104,0
Halotano	20,0	0,8
Isoflurano	0,2	1,2
Sevoflurano	3,0	2,0
Desflurano	0,02	6,0

Os anestésicos halogenados mais modernos e mais utilizados mundialmente (isoflurano, sevoflurano e desflurano) têm estruturas moleculares diferentes e estão associados com menor hepatotoxicidade que o halotano (Safari *et al.*, 2014). O desflurano (2-[difluorometoxi]-1,1,1,2-tetrafluoro-etano) apresenta estrutura química semelhante à do isoflurano, com as duas moléculas diferindo somente pela substituição de um átomo na posição do carbono α ; enquanto o desflurano tem um átomo de flúor, o isoflurano tem um de cloro (Morgan Jr & Mikhail, 2003) (Figura 1). No entanto, essa alteração pelo átomo de flúor diminui, de forma significativa, a metabolização do desflurano, com consequente diminuição de formação de fluoreto (Martin Jr & Njoku, 2005a). Os halogenados são metabolizados pelo citocromo P4502E1 e, embora a produção de metabólitos hepáticos do desflurano seja extremamente baixa (Njoku *et al.*, 1997), há raros relatos de caso sobre dano hepático induzido por esse anestésico (Anderson *et al.*, 2007). Apesar de a lesão hepática induzida por anestesia não ser ocorrência comum, deve-se estar ciente de sua associação com o uso de anestésicos halogenados (Safari *et al.*, 2014).

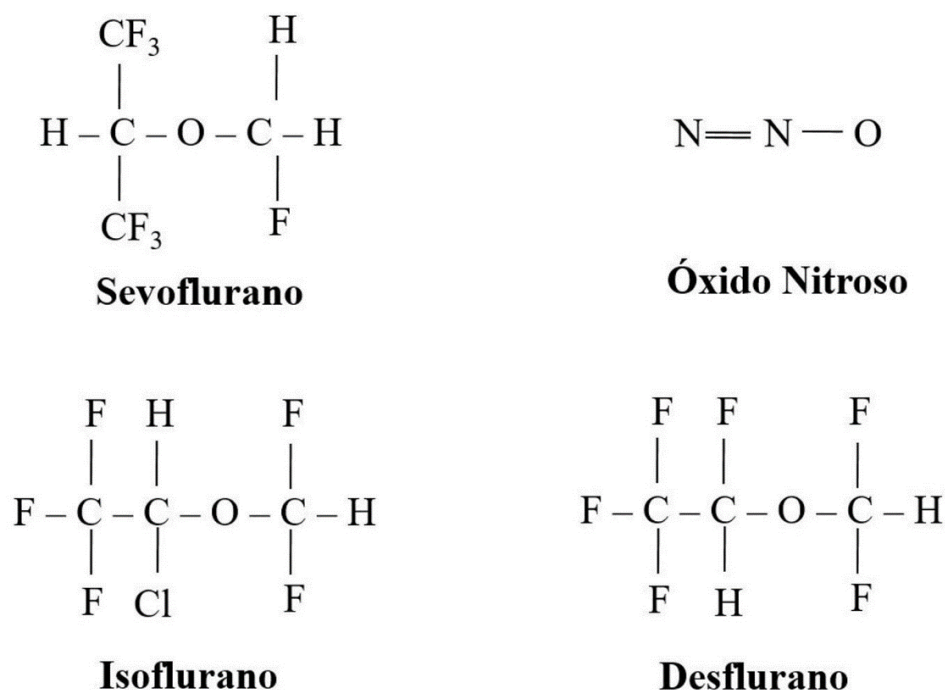


Figura 1 - Fórmula estrutural dos anestésicos inalatórios mais recentes e do óxido nitroso.

A concentração alveolar mínima (CAM) de um agente anestésico inalatório é definida como a concentração mínima do anestésico que determina ausência de movimentação em resposta a um estímulo doloroso em 50% dos pacientes e se trata de nomenclatura padrão utilizada por anesthesiologistas para comparação da potência de agentes anestésicos (Prielipp, 2010). O desflurano apresenta CAM de 6% a 7%, sendo a mais elevada entre os anestésicos halogenados, enquanto a do N₂O é a mais elevada entre todos os inalatórios (Saraiva, 2003; Eger, 2004) (Tabela 2). Assim, o N₂O é um fraco agente anestésico por apresentar CAM muito elevada, o que impossibilita a sua utilização plena em anestesiologia (1 CAM), pois determinaria hipóxia nos pacientes, obrigando o uso desse agente em concentrações menores do que a sua CAM. Dessa forma, ele é utilizado em associação com outros anestésicos mais potentes, possibilitando que haja diminuição da concentração dos anestésicos halogenados (Rampil *et al.*, 1991).

1.3 Uso clínico do óxido nitroso

O N₂O não é apenas o mais antigo, mas também um dos anestésicos mais utilizados em todo o mundo (Nagele *et al.*, 2013). Apesar de não ser irritante para as vias aéreas, possuir baixa solubilidade sanguínea e mínima metabolização hepática, há alguns casos em que a utilização de N₂O deve ser limitada, como por exemplo, em pacientes com deficiência no metabolismo de cobalamina (vitamina B12), considerando que a exposição ao N₂O pode diminuir as concentrações de metionina sintetase, com diminuição importante da cobalamina, podendo alterar as concentrações plasmáticas de folato e homocisteína, interferindo na síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Sanders *et al.*, 2008). A inibição da metionina sintetase em populações vulneráveis anestesiadas com N₂O pode induzir efeitos hematológicos e neurológicos (Sanders *et al.*, 2008). Myles *et al.* (2008) observaram que o uso prolongado do N₂O aumenta a concentração de homocisteína, sugerindo que, especialmente pacientes idosos, vegetarianos/veganos e cronicamente deficientes em dieta com folato e cobalamina podem ter risco cardiovascular aumentado devido à hiperhomocisteinemia. Por outro lado, esses mesmos autores mostraram ausência de evidência de aumento do risco de complicações cardiovasculares e mortalidade, assim como de infecção, pós cirurgias de grande porte não cardíacas (Myles *et al.*, 2014). Além disso, o uso de N₂O pode aumentar a incidência de náuseas e vômitos, porém esse efeito indesejável pode ser controlado com administração preventiva de drogas antieméticas (Buhre *et al.*, 2015; Myles *et al.*, 2016).

1.4 Genotoxicidade dos gases e anestésicos inalatórios

Muitos agentes são utilizados na anestesiologia sem que haja entendimento completo dos potenciais efeitos secundários. Uma compreensão dos possíveis efeitos deletérios dos anestésicos é essencial para se entender possíveis mecanismos de toxicidade e também para auxiliar na decisão sobre a técnica anestésica mais adequada para os pacientes submetidos a cirurgia (Schifilliti *et al.*, 2011).

O monitoramento genético de populações expostas aos agentes anestésicos é importante para avaliação dos possíveis efeitos lesivos ao genoma. Biomarcadores como

aberrações cromossômicas (AC), micronúcleo (MN) e troca entre cromátides irmãs (TCI) são os marcadores de mutagenicidade mais utilizados, enquanto o teste do cometa é o teste de genotoxicidade mais utilizado em estudos epidemiológicos (Chandrasekhar *et al.*, 2006).

Na última década, o teste do cometa (*single gel cell electrophoresis assay*) tornou-se método padrão para avaliação de danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) passíveis de reparo (Collins, 2004). Trata-se de teste relativamente simples, o qual é sensível para avaliar quebras de fita de DNA (quebras de fita simples, dupla e sítios alcalilábeis) em pequeno número de células (Dusinska & Collins, 2008). As células nucleadas são colocadas em lâminas e mergulhadas em solução de lise para exposição do material genético (nucleoides). Em seguida, as lâminas são submetidas à incubação alcalina, a qual permite o relaxamento da molécula de DNA, para em seguida se iniciar a corrida eletroforética, na qual quebras de fita no DNA fragmentado mover-se-ão em direção ao ânodo (pólo positivo), formando imagem semelhante a um cometa (Figura 2). Quanto maior sua cauda, maior o dano no DNA (Figura 3). Para aumentar a sensibilidade do teste do cometa, enzimas de reparo podem ser adicionadas entre as etapas de lise e eletroforese e são utilizadas para detecção de danos oxidativos, como a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) que reconhece purinas oxidadas e endonuclease III (ENDO III) que reconhece pirimidinas oxidadas.

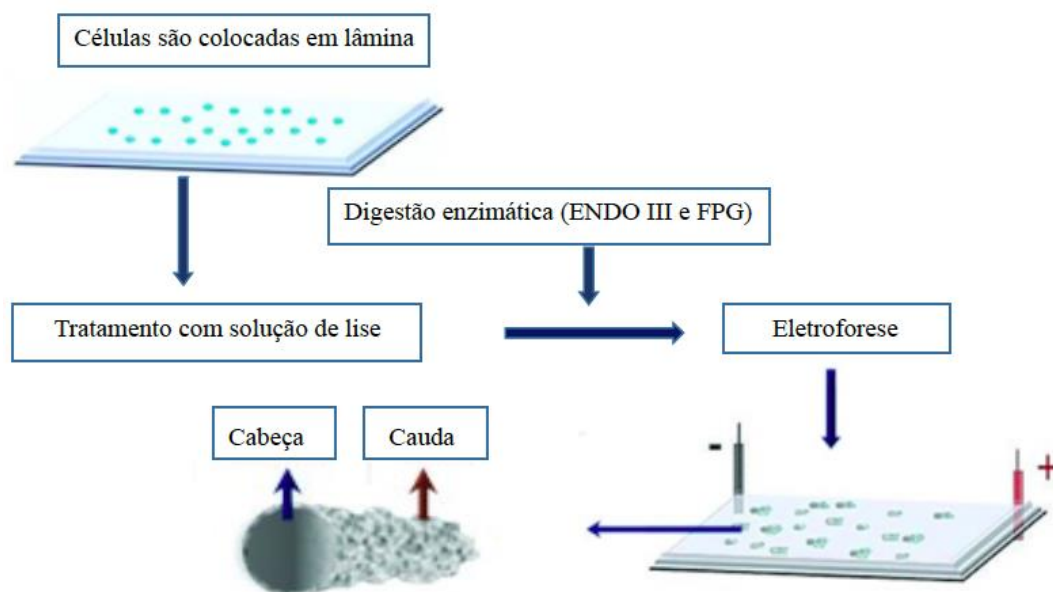


Figura 2 - Esquema representando as etapas do teste do cometa. ENDO III = endonuclease III, FPG = formamidopirimidina DNA glicosilase. Fonte: Figura adaptada de Gunasekarana *et al.*, 2015.

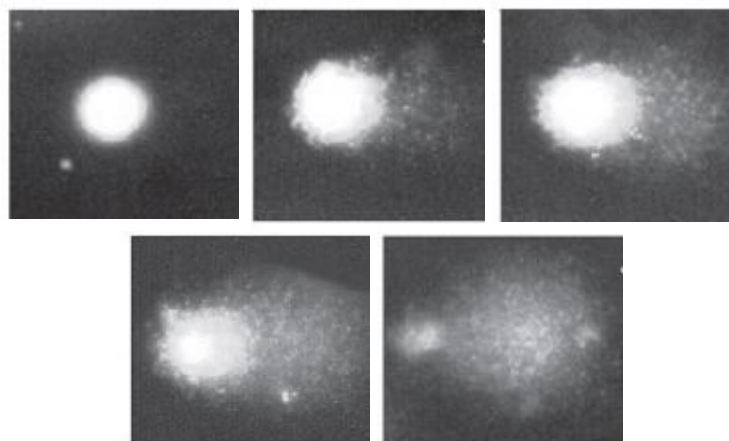


Figura 3 - Microscopia fluorescente dos nucleossomos avaliados pelo teste do cometa. Fonte: Collins, 2004.

Não são totalmente conhecidos os mecanismos pelos quais os anestésicos podem induzir lesões no material genético. Sugere-se que os anestésicos inalatórios possam ser genotóxicos por reagirem diretamente com a molécula de DNA, alquilando a posição N7 das purinas ou formando compostos reativos, liberando espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais induzem vários tipos de lesões (Jaloszynski *et al.*, 1999). Chinellato & Froes (2002) sugerem que os anestésicos halogenados, como o halotano, podem atuar de forma semelhante aos fármacos radiomiméticos, induzindo danos no genoma em qualquer fase do ciclo celular.

Já em relação ao N₂O, este gás inibe a cobalamina de atuar como coenzima da metionina sintetase, com a oxidação do cobalto I (Co⁺) da cobalamina em Co³⁺. Também há evidências de que a oxidação da cobalamina, pelo N₂O, envolva a geração de radical hidroxila (Sanders *et al.*, 2008). A metionina sintetase é uma enzima citosólica com papel crucial na geração de grupos metil, primordiais para síntese de DNA, ácido ribonucleico (RNA), catecolaminas e mielina. Adicionalmente, sugere-se que o estresse oxidativo desempenhe importante papel intermediário na genotoxicidade (danos no material genético) frente à exposição ocupacional ao N₂O (Wrońska-Nofer *et al.*, 2012).

Poucos são os relatos existentes sobre possível genotoxicidade e mutagenicidade do anestésico desflurano. O desflurano não foi considerado mutagênico no teste de Ames - *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Martin Jr & Njoku, 2005b). Entretanto, trabalhos conduzidos *in vitro*, em células linfocitárias, mostraram efeito genotóxico do desflurano pelo teste do cometa (Karpiński *et al.*, 2005; Kaymak *et al.*, 2012). Pelo fato do desflurano ser um dos anestésicos mais novos introduzidos na prática clínica, ainda não há resultados experimentais avaliando seu potencial efeito genotóxico (Braz & Karahalil, 2015). Estudos clínicos observaram mutagenicidade (TCI) do desflurano (6%) (Akin *et al.*, 2005; Aydinli *et al.*, 2011). Conforme Venkatesan & Amar (2006), há poucos dados em relação aos danos no material genético de pacientes submetidos ao desflurano até os dias atuais. Os autores destacam a importância e a necessidade de estudos serem conduzidos para determinação da possível genotoxicidade do desflurano na prática clínica.

Em relação à possível genotoxicidade do N₂O, estudo conduzido *in vitro* com 50% de N₂O mostrou aumento de TCI em linfócitos expostos (Hoerauf *et al.*, 1999) enquanto não houve evidência de mutagenicidade (teste de Ames) quando se utilizou 80%

de N₂O (Baden & Monk, 1981). Estudo clínico conduzido por Krause *et al.* (2013) não observou mutagenicidade, pelo teste de TCI, em crianças submetidas a cirurgia minimamente invasiva sob anestesia com sevoflurano associado ao N₂O.

O único trabalho clínico, na literatura ao nosso alcance, que avaliou a genotoxicidade da anestesia mantida com N₂O (70%) juntamente ao sevoflurano, foi realizado em pacientes com estado físico classificado pelo *American Society of Anesthesiologists* (ASA) I-IV submetidos a cirurgias invasivas e de grande porte, que tiveram aumento de danos no DNA 24 horas após o procedimento anestésico-cirúrgico (Chen *et al.*, 2013). Os autores também observaram que quanto maior o tempo de exposição ao N₂O, maior o dano no material genético. Em editorial publicado no conceituado periódico *Anesthesiology*, Hogan (2013) ressaltou a necessidade de trabalhos clínicos avaliarem a possível genotoxicidade do N₂O, pelo teste do cometa, devido a suas vantagens, por escassez de dados nessa área.

Assim, não há trabalhos existentes que avaliaram a genotoxicidade, pelo teste do cometa, da anestesia mantida com desflurano, associada ou não ao N₂O, em pacientes hígidos (ASA I) submetidos a cirurgia minimamente invasiva.

1.5 Estresse oxidativo dos gases e anestésicos inalatórios

O estresse oxidativo é evento decorrente do desequilíbrio entre a formação de ERO e o sistema de defesa antioxidante. As espécies reativas interagem com as macromoléculas, isto é, aminoácidos/proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, como as bases de DNA, modificando sua estrutura ou função, podendo determinar anormalidades celulares (Kehrer, 2000) (Figura 4).

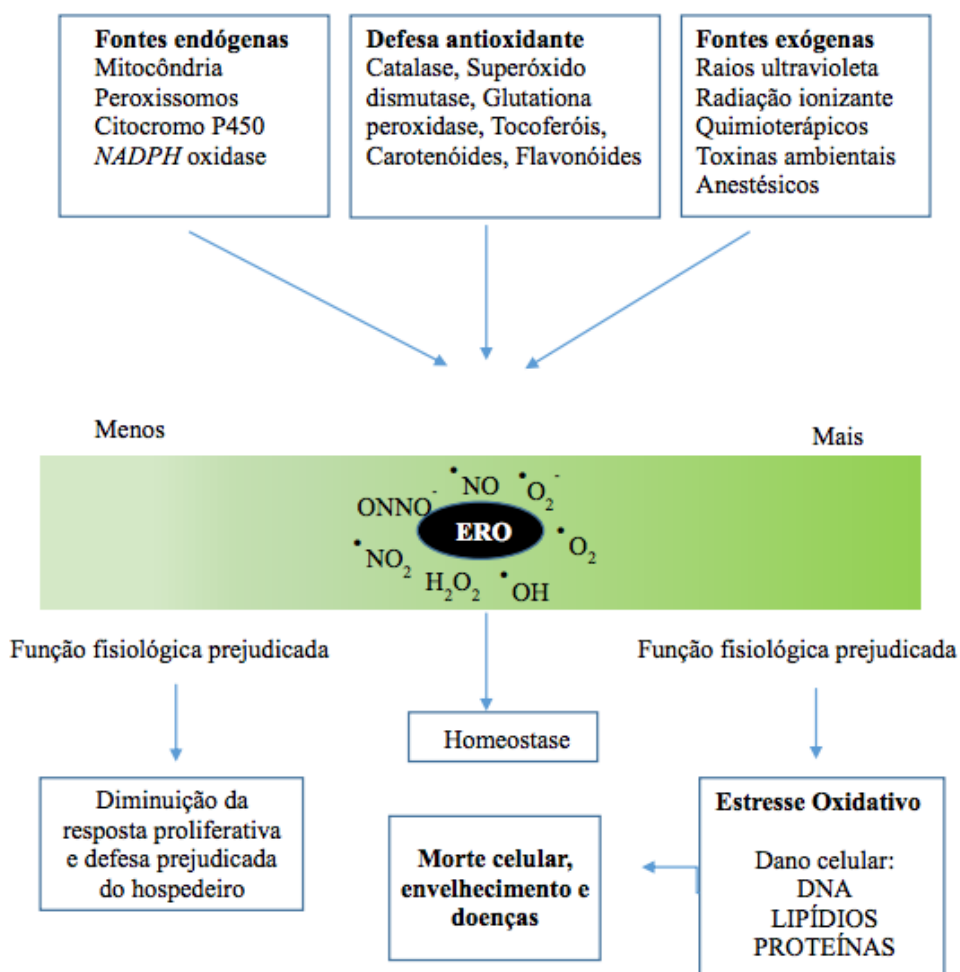


Figura 4 - Fontes e respostas às espécies reativas de oxigênio endógenas e exógenas e sistema de defesa antioxidante. Quando em equilíbrio, há homeostase, porém quando não eficiente, pode diminuir a resposta proliferativa e defesa do organismo ou permitir a instalação de estresse oxidativo. NADPH = Nicotinamide Adenine Dinucleotide P_Hosphate, ERO = espécies reativas de oxigênio, ONNO⁻ = peroxinitrito, •NO = óxido nítrico, •O₂⁻ = radical superóxido, •O₂ = oxigênio singlete, •OH = radical hidroxila, H₂O₂ = peróxido de hidrogênio, •NO₂ = dióxido de nitrogênio, DNA = ácido desoxirribonucleico. Fonte: Figura adaptada de Finkel & Holbrook, 2000 e Vasconcelos *et al.*, 2007.

Em relação aos ácidos nucleicos, a utilização das enzimas FPG e ENDO III, em linfócitos periféricos, pelo teste do cometa, fornece índice de estresse oxidativo em bases do DNA de forma sistêmica (Collins *et al.*, 2008). As ERO atacam o açúcar

desoxirribose e as bases púricas (adenina e guanina) e pirimídicas (timina e citosina). Como resultado, ocorre quebra da cadeia do DNA, ligação cruzada entre as fitas e modificações em suas bases que podem levar à apoptose e mutações (Vasconcelos *et al.*, 2007). Na literatura ao nosso alcance, não se encontrou nenhum trabalho que tenha avaliado os danos oxidativos no DNA em pacientes cirúrgicos sob manutenção anestésica com desflurano associado ou não ao N₂O.

A peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação) é mecanismo bem estabelecido de dano celular em animais e plantas, sendo as membranas celulares muito susceptíveis a ação de ERO (Lee *et al.*, 2015). Os fosfolipídios da membrana celular são particularmente susceptíveis ao processo de peroxidação, o que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, resultando em perda da seletividade da troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, tais como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos. Os fosfolipídios da membrana celular podem ser hidrolisados pela enzima fosfolipase, produzindo ácido araquidônico não-esterificado, que pode sofrer peroxidação por duas vias: a via enzimática, envolvendo as ciclo-oxigenases e as lipoxigenases e a via não-enzimática, por meio da participação de ERO, metais de transição e outros radicais livres (Lima & Abdalla, 2001). Peróxidos lipídicos são indicadores instáveis de estresse oxidativo em células, sendo transformados em compostos mais complexos e reativos como o malonaldeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE), os quais são bi-produtos naturais da peroxidação lipídica. Em relação aos isoprostanos, sugere-se que a formação de 8-iso-prostaglandina F₂-α (8-isoprostano) encontra-se alterada em situações clínicas associadas à inflamação e ao estresse oxidativo (Praticò *et al.*, 2004). Os isoprostanos pertencem à família de eicosanóides e são produzidos não enzimaticamente por meio de ERO que induzem peroxidação de fosfolipídios e lipoproteínas em tecido, plasma e urina e são compostos estáveis que podem ser detectáveis em situação inicial de estresse oxidativo (Roberts & Morrow, 2000). A formação de isoprostano tem sido comparada ao MDA, que é o método mais utilizado para avaliação de peroxidação lipídica (Yin, 2008). Os produtos finais da peroxidação lipídica mediada por espécies reativas incluem, portanto, o MDA, o 4-HNE e os isoprostanos como o 8-isoprostano. Estudo experimental observou peroxidação lipídica em suínos expostos ao desflurano (Allaouchiche *et al.*, 2001). Há controvérsias

quanto aos resultados de lipoperoxidação em pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com desflurano associado ao N₂O (Sivaci *et al.*, 2006; Ceylan *et al.*, 2009).

A oxidação proteica é definida como modificação covalente de proteína induzida por ERO por via direta ou por reações como sub-produtos secundários do estresse oxidativo, resultantes da modificação de uma série de aminoácidos. O aparecimento de grupos carbonilas (como grupos aldeídos e cetonas) em proteínas é decorrente de várias reações oxidativas e constituem marcador padrão do estresse oxidativo. As proteínas carboniladas representam forma irreversível de modificação proteica e demonstraram ser relativamente estáveis, com depuração levando horas e até mesmo dias para serem eliminadas, diferentemente do que ocorre com os produtos de peroxidação lipídica, que são removidos em minutos (Dalle-Donne *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2015). Assim, Sivaci *et al.* (2006) observaram aumento de proteínas oxidadas no pós-operatório de pacientes submetidos a cirurgia laparoscópica anestesiados com desflurano associado ou não ao N₂O (60%).

Dessa forma, é essencial o equilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. Os antioxidantes protegem o sistema biológico contra os efeitos da oxidação excessiva (Ferreira & Matsubara, 1997). A primeira linha de defesa contra os danos oxidativos são os antioxidantes endógenos enzimáticos (glutathione peroxidase [GPX], superóxido dismutase [SOD] e catalase [CAT]) e os não enzimáticos, que podem ser lipossolúveis (tocoferóis, carotenos, retinol, flavonóides) e hidrossolúveis (ácido ascórbico, ácido úrico, albumina), sendo possível a mensuração individual desses antioxidantes (Vasconcelos *et al.*, 2007). Pode-se avaliar, também, a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no plasma ou no soro, proporcionando assim um parâmetro integrado ao invés da simples soma de antioxidantes mensuráveis isoladamente (Ghiselli *et al.*, 2000). Entre as metodologias estão o teste de capacidade antioxidante plasmática, no qual o plasma é colocado em contato com gerador de radicais e substância lipofílica fluorescente a ser oxidada e o *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)* que, em baixo potencial hidrogeniônico (pH), o complexo Fe³⁺-2,4,6-TriPyridyl-S-Triazine (Fe³⁺-TPTZ) é reduzido à forma ferrosa (Fe²⁺) na presença de agentes redutores (antioxidantes) no plasma/soro. Estudo clínico mostrou que anestesia com 6% de desflurano não alterou GPX nem capacidade antioxidante (Erbas *et al.*, 2015). Em outro estudo, observou-se aumento de estresse oxidativo, mas não pela alteração de capacidade

antioxidante, em pacientes submetidas a cesariana com desflurano associado ao N₂O (Yalcin *et al.*, 2013). Da mesma forma, não houve diferença significativa em parâmetros de defesa antioxidante em pacientes submetidos a colocistectomia laparoscópica, quando anestesiados com desflurano associado a 50% de N₂O (Karabayirli *et al.*, 2016).

Assim, poucos são os trabalhos existentes na literatura que avaliaram o *status* antioxidante e oxidativo em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos sob anestesia com o desflurano associado ou não ao N₂O. É importante ressaltar que os estudos existentes diferem no tipo e/ou duração de cirurgia, no tipo de paciente e anestésicos e outros fármacos administrados, fatores que podem influenciar os resultados obtidos.

1.6 Justificativa do estudo

Desde o início da introdução dos anestésicos na prática clínica houve a preocupação em relação à toxicidade orgânica desses agentes. Atualmente, com a evolução dos métodos de detecção de estresse oxidativo e genotoxicidade, tornou-se possível o estudo dos anestésicos em nível sistêmico e celular e, principalmente, no material genético. Infelizmente, poucos grupos, em nível mundial, têm estudado esse assunto e, até onde sabemos, o estudo proposto é pioneiro.

Nosso grupo de pesquisa tem avaliado os efeitos dos anestésicos no material genético e em relação ao estresse oxidativo em pacientes submetidos a anestesia geral venosa e inalatória (Braz *et al.*, 2009; 2011a; 2011b; 2012; 2013; Orosz *et al.*, 2014; Braz *et al.*, 2015). Assim, a realização do presente estudo vem contribuir para verificação de possível efeito tóxico do desflurano, um anestésico inalatório moderno recentemente introduzido em nosso país, sobre o *status* oxidativo e material genético de pacientes expostos. Além disso, o estudo também contribui para melhor entendimento do papel do N₂O utilizado concomitantemente com a anestesia inalatória com desflurano. Deve-se destacar que há escassez de dados quanto à genotoxicidade e estresse oxidativo do desflurano e N₂O avaliados durante e após procedimento cirúrgico minimamente invasivo em pacientes sem comorbidades associadas.

A hipótese da presente pesquisa é que a associação de N₂O ao desflurano pode potencializar os efeitos do halogenado sobre o genoma e *status* redox. Assim, considerando a importância e a relevância da segurança do paciente neste contexto, o estudo contribui para avaliação dos efeitos do desflurano, associado ou não ao N₂O, em pacientes hígidos submetidos a cirurgia minimamente invasiva.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar a possível genotoxicidade e o estresse oxidativo (marcadores oxidativos em ácido nucleico, lipídios e proteínas, além de capacidade antioxidante) durante e após manutenção anestésica com desflurano, associada ou não ao N₂O, em pacientes sem comorbidades associadas e submetidos a cirurgia minimamente invasiva.

3 MÉTODO

3.1 Ética e registro

O recrutamento de pacientes foi realizado no período de abril de 2014 a outubro de 2015 no Hospital das Clínicas (HC), Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP) após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMB - UNESP (n. 363.695; 16/08/2013 - Anexo A) e do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (RBR-6jg23g; 08/11/2013 - Anexo B).

3.2 Casuística

O estudo aleatorizado e duplo-cego envolveu a participação de pacientes com estado físico ASA I (indivíduos saudáveis, que não apresentam outra doença a não ser a condição cirúrgica). Dessa forma, foram recrutados, no HC/FMB-UNESP, apenas adultos hígidos, com faixa etária de 18 a 50 anos, de ambos os sexos, submetidos a cirurgia minimamente invasiva de clínica otorrinológica (septoplastia) com duração mínima de 90 minutos.

Todos os pacientes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice A) e responderam a um questionário detalhado com questões sobre dados demográficos (idade, sexo, índice de massa corporal - IMC, etc), questões de história médica (exposição à radiação, medicação, doenças, etc) e estilo de vida (dieta, exercício físico, uso de álcool e tabaco, etc) (Apêndice B). O fluxograma dos pacientes do estudo está ilustrado na Figura 5.

Foram excluídos fumantes, usuários de drogas ilícitas e de bebidas alcoólicas, usuários de suplementos vitamínicos e/ou medicamentos diários, os ocupacionalmente expostos, os que receberam radiação ionizante ou fizeram ressonância magnética em período inferior a 30 dias, os que já foram submetidos a quimioterapia ou radioterapia, e os portadores de qualquer doença ou em processo infeccioso ou inflamatório.

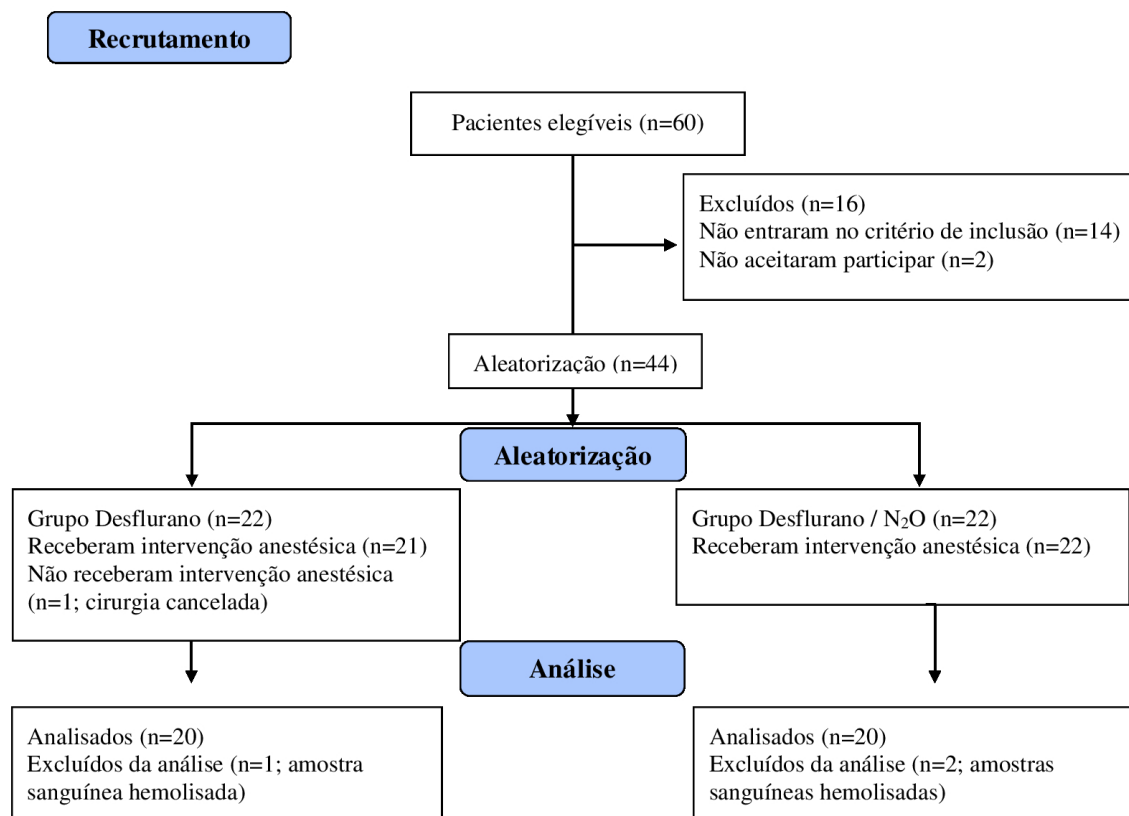


Figura 5 - Fluxograma dos pacientes do estudo.

3.3 Aleatorização dos grupos

Previamente ao início do estudo, foram preparados envelopes opacos contendo a indicação do grupo de estudo pela colocação do nome do anestésico inalatório (desflurano ou desflurano associado ao N₂O). Os envelopes foram lacrados, misturados e numerados sequencialmente. Cada um deles foi fixado ao protocolo de estudo, sendo aberto na sala de operação (SO) pelo anestesiolologista responsável, de acordo com a numeração sequencial, garantindo, dessa forma, a aleatorização dos grupos.

Foram recrutados para o estudo 60 pacientes, sendo que 16 foram excluídos por não entrarem no critério de inclusão ou por não aceitarem participar do estudo. Assim, 44 pacientes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, os quais se diferenciaram pelo uso de desflurano ou de desflurano associado ao N₂O: grupos desflurano e desflurano/N₂O, respectivamente.

3.4 Monitorização e procedimento anestésiológico

Após inserção intravenosa (IV) de cateter 18G, instalou-se terapia fluida intravenosa com 4 ml/kg/h de Ringer com lactato. Os pacientes receberam medicação pré-anestésica com midazolam (3 mg IV) na SO, foram monitorizados com eletrocardioscopia (ECG) nas derivações D_{II} e V₅, pressão arterial não invasiva automática, frequência cardíaca e saturação periférica de oxigênio (SpO₂), utilizando-se biomonitor (Dixtal, Brasil) e receberam aquecimento por convecção da parte inferior do corpo, utilizando-se manta e aparelho específico (*Bair Hugger*[®], *model 750, Arizant Healthcare*, EUA). Utilizou-se também monitorização do bloqueio neuromuscular por meio da sequência de quatro estímulos (*Tof Guard*[®], *Biometer International*, Finlândia).

A indução anestésica foi realizada com o opióide fentanil (5 µg/kg) e o anestésico venoso propofol, na dose de 2 mg/kg, e com brometo de rocurônio (0,6 mg/kg), como bloqueador neuromuscular. Após intubação traqueal, os pulmões dos pacientes foram ventilados mecanicamente, utilizando-se o modo de controle a volume do aparelho de anestesia *Dräger Primus* (*Dräger Medical*, Alemanha). Os pacientes também receberam monitorização da temperatura central, com sensor colocado no esôfago inferior e conectado a monitor de temperatura (*Mallinckrodt Medical*, EUA). Foram monitoradas as concentrações inspirada e expirada de oxigênio, N₂O (grupo desflurano/N₂O), desflurano e a pressão expiratória final de dióxido de carbono (P_{ET}CO₂), utilizando-se o biomonitor integrado ao aparelho de anestesia *Dräger Primus*.

A manutenção anestésica foi feita com desflurano (*Desforane, Baxter*, EUA) utilizando-se, inicialmente, uma concentração de 6%, correspondente a 1,0 CAM e a seguir esta concentração foi alterada para mais ou para menos em conjunção com reinjeções de fentanil (2 µg/kg), caso houvesse necessidade, baseando-se em resposta hemodinâmica ($\pm 20\%$ da pressão arterial e frequência cardíaca iniciais). Doses adicionais de brometo de rocurônio (0,2 mg/kg) foram utilizadas sempre que necessário. O fluxo de gases frescos foi de 2 l/min em ambos os grupos, com mistura de oxigênio e ar comprimido no grupo desflurano e de oxigênio e N₂O (60%) no grupo desflurano/N₂O, com fixação da fração inspirada de 40% de O₂ independentemente do grupo estudado (Apêndice C). Utilizou-se circuito respiratório semifechado com cal sodada para absorção

de CO₂. A P_{ET}CO₂ foi mantida de 30 a 35 milímetros de mercúrio (mm Hg) por meio de alterações na frequência respiratória, baseadas na leitura da P_{ET}CO₂, com manutenção de volume corrente fixo de 8 ml/kg.

No final da cirurgia, analgesia pós-operatória foi feita com tramadol (100 mg) e dipirona (1 g) IV e como antiemético foi utilizada a ondansetrona (8 mg) e os pacientes receberam ou não reversão do bloqueio neuromuscular com sugamadex (2 a 4 mg/kg) IV, se houvesse necessidade, de acordo com a monitorização do bloqueio neuromuscular. A extubação traqueal ocorreu sempre na SO quando o paciente apresentou suficiente estado de alerta (abertura ocular, protrusão da língua e condições de apertar a mão) e relação de, pelo menos, 0,9 entre a primeira e quarta resposta à estimulação neuromuscular. Em seguida, o paciente foi encaminhado à Sala de Recuperação Pós-Anestésica, onde permaneceu até a alta para o leito da Enfermaria.

Os dados hemodinâmicos foram obtidos nos momentos: controle (antes da indução anestésica), e após 30, 60 e 90 minutos da indução da anestesia. Os dados de SpO₂ e P_{ET}CO₂, concentração expirada de desflurano e temperatura esofágica foram obtidos nos momentos: 30, 60 e 90 minutos após a indução da anestesia.

3.5 Coleta de material biológico

Todas as amostras de sangue venoso foram coletadas dos pacientes em jejum, sob luz indireta, em três momentos do estudo: M₀ - antes do paciente receber a medicação pré-anestésica (controle), M₁ - 90 minutos após o início da anestesia inalatória e M₂ - manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico (~ 17 horas), em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e com gel separador. Todas as amostras foram codificadas, resfriadas e levadas imediatamente ao laboratório para processamento.

Todo processamento e metodologias foram realizados sob ar condicionado e luz amarela, para se evitar possível indução de danos no DNA ou indução oxidativa. Parte do sangue coletado com EDTA foi utilizada para isolamento de células mononucleares, assim como para a separação do plasma. Os tubos com gel separador foram utilizados para obtenção do soro. Plasma e soro foram obtidos por meio de centrifugação refrigerada

a 4°C por 15 minutos a 3.500 rotações por minuto (rpm) e foram armazenados em alíquotas em *freezer* -80°C para avaliação de estresse oxidativo. Amostras dos três momentos de pacientes de ambos os grupos foram utilizadas, sempre que possível, para cada metodologia a fim de se evitar possível viés.

Ressalte-se que o processamento e a maioria das metodologias foram realizados no Laboratório GENOTOX e em outros laboratórios da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX, FMB-UNESP), enquanto que o teste *FRAP* foi realizado no *Antioxidants Research Laboratory, Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging*, na *Tufts University* (Boston, EUA).

3.6 Avaliação de danos basais e oxidativos no DNA

As células mononucleares (~ 95% de linfócitos) foram isoladas seguindo o protocolo anteriormente descrito (Braz & Fávero Salvadori, 2007) utilizando-se o método de gradiente *Ficoll-Paque Plus*[®] (*GE Healthcare Bio-Sciences*, Suécia). Amostras (2 ml) de sangue total foram homogeneizadas com 2 ml de *phosphate buffered saline (PBS)* e colocadas, cuidadosamente, sobre 3 ml de ficol e centrifugadas por 30 minutos, a 4°C, a 2.500 rpm. Posteriormente, coletou-se o halo branco (linfócitos) com auxílio de pipeta *Pasteur*, o qual foi transferido para outro tubo, no qual foram adicionados 4 ml de *PBS*. Após nova centrifugação (1.500 rpm por 15 minutos a 4°C), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuscitado.

Após isolamento celular, realizou-se o teste do cometa tanto para avaliação de danos basais no material genético (genotoxicidade), quanto de danos oxidativos (utilização das enzimas FPG e ENDO III). Antes da realização de cada teste do cometa (Tice *et al.*, 2000; Braz *et al.*, 2012) foi necessária a preparação dos reagentes, além das lâminas de microscopia, utilizando-se agarose ponto de fusão normal (PFN) para preparação de gel de primeira camada. Adicionalmente, a agarose do tipo baixo ponto de fusão (BPF) foi feita e armazenada a 4°C. Também foi autoclavado o material e reagentes necessários para utilização das enzimas.

No dia de cada coleta de amostra, foi preciso, previamente, diluir a agarose BPF e mantê-la em banho-maria a 37°C, além de preparar a solução de lise (2,5 M de

cloreto de sódio [NaCl], 100 mM de EDTA, 10 mM de tris, pH 10; 1% de triton-X e 10% de dimetilsulfóxido foram adicionados), a qual foi armazenada a 4°C. Após cada isolamento celular, foram misturados 10 µl de linfócitos frescos com 120 µl de agarose BPF (37°C), pipetados sobre lâminas de primeira camada, as quais foram cobertas com lamínula e colocadas, por 5 minutos, a 4°C. Em seguida, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise por duas horas. Posteriormente, as lâminas que receberiam tratamento enzimático foram retiradas da solução de lise e colocadas em *PBS* (1x) por 5 minutos, sendo transferidas para outra cubeta contendo solução de *Flare* 1x (40 mM de HEPES, 0,1 M de cloreto de potássio, 0,2 mg/ml de albumina do soro bovino e 0,5 mM de EDTA em pH 8 ajustado com hidróxido de potássio) por 15 minutos. De acordo com o tratamento enzimático (FPG e ENDO III - 50 µl, a 1:1.000) as lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas em câmara úmida, a 37°C, por 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram colocadas por 10 minutos, a 4°C, para solidificação da agarose e as lamínulas foram retiradas. Nesse tempo, as lâminas que não receberam tratamento (controle) foram lavadas com *PBS* (1x) por 5 minutos. A seguir, todas as lâminas foram transferidas para cuba de acrílico horizontal, em solução de eletroforese (1 mM de EDTA, 300 mM de hidróxido de sódio [NaOH] em pH > 13), por 40 minutos. Após o tempo de desespiralização do DNA, a corrida eletroforética foi conduzida a 25 V, 0,3 A por 30 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M de tris em pH 7,5) por 15 minutos, sendo em seguida mergulhadas em álcool absoluto (etanol) para fixação e colocadas em tabuleiro para secagem. Posteriormente, as lâminas foram armazenadas em laminários a 4°C até o momento da coloração. Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata e com controle interno.

Imediatamente antes da análise, as lâminas foram coradas com *SYBR Gold* e os nucleoides foram visualizados em microscópio de fluorescência acoplado ao sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV - Perceptive Instruments*, Reino Unido). Por lâmina, 50 nucleoides foram analisados, totalizando 100 nucleoides/tratamento/momento de paciente. Após análise das lâminas realizou-se a tabulação dos dados e o parâmetro *tail intensity* (%) foi considerado para avaliação de danos no DNA.

3.7 Avaliação de marcadores oxidativos em lipídios e proteínas

Utilizou-se *pool* de amostras controle plasmática ou sérica para controle de qualidade, a partir do qual se calculou o coeficiente de variação (CV) intraensaio e interensaio. Admitiram-se valores de $CV \leq 10\%$ e para as curvas-padrão, valores de $R^2 \geq 0,99$.

3.7.1 Avaliação de peroxidação lipídica

Os produtos finais da peroxidação lipídica avaliados foram o MDA, o 4-HNE e o 8-isoprostano.

O MDA foi detectado por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC-LC-10AD *model*, Shimadzu, Japão), considerado método padrão-ouro, conforme protocolos de Tatum *et al.* (1990) e Nielsen *et al.* (1997). Foram adicionados 100 μ l de plasma (de cada momento/paciente) com 700 μ l de ácido ortofosfórico 1% em tubos. As amostras foram agitadas vigorosamente e após acréscimo de 200 μ l de ácido tiobarbitúrico (42 mmol/l) as amostras foram agitadas novamente. Os tubos foram aquecidos, por uma hora, a 100°C, sendo posteriormente resfriados por 10 minutos. Duzentos μ l foram transferidos para tubo de 1,5 ml contendo 200 μ l de NaOH (2 M), diluído em metanol. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por três minutos e 200 μ l de sobrenadante foram colocados em *vial*, sendo 50 μ l injetados no equipamento. A fase móvel constituiu-se de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) a 1 mM e metanol com fluxo de 1,2 ml/min, utilizando-se coluna C18 em fase reversa (Gemini *model*, Phenomenex, EUA; 5 μ m, 150 x 4,6 mm) com detector de fluorescência (RF535 *model*, Shimadzu, Japão) com excitação em 525 nanômetros (nm) e emissão em 551 nm. Realizou-se então o cálculo por meio da curva-padrão utilizando-se o tetraetoxipropano (TEP) e os resultados de MDA foram expressos em μ mol/l.

Tanto o 4-HNE (plasma) quanto o 8-isoprostano (soro) foram padronizados e avaliados, em duplicata, de ambos os grupos de pacientes utilizando-se *kits* comercialmente disponíveis, conforme instruções do fabricante (*OxiSelectTM HNE Adduct Competitive ELISA kit* e *OxiSelectTM 8-iso-Prostaglandin F2 α ELISA kit*, ambos

da *Cell Biolabs*, EUA). Os resultados do 4-HNE foram expressos em $\mu\text{g/ml}$ enquanto que os de 8-isoprostano foram expressos em pg/ml .

3.7.2 Avaliação de proteínas carboniladas

Anteriormente à avaliação de proteínas carboniladas (expressas em nmol/mg), realizada segundo instruções do fabricante (*OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA kit*, *Cell Biolabs*, EUA), foi necessária a determinação das concentrações de proteínas totais nas amostras plasmáticas pelo método *bicinchoninic acid (BCA)*. Assim, as amostras foram inicialmente diluídas em *PBS* (1x) na proporção de 1:100 e foram pipetadas (10 μl , em triplicata) em placa de 96 poços. Também foram pipetados 10 μl dos *standards*, em triplicata, e 200 μl da mistura dos reagentes *BCA protein assay reagent A* e *BCA protein assay reagent B* na proporção de 1:50 em toda placa, a qual foi incubada em estufa por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras ficaram por 10 minutos em temperatura ambiente e depois foram lidas em espectrofotômetro *Synergy HT* (*Biotek*, EUA) a 562 nm. Com os resultados obtidos, conheceu-se a quantidade de proteína de cada amostra, para então, realizar o teste de proteínas carboniladas, o qual exige concentração proteica de 10 $\mu\text{g/ml}$ em cada amostra.

3.8 Avaliação de defesa antioxidante

Utilizou-se *pool* de amostras de controle plasmática ou sérica para controle de qualidade, a partir do qual se calculou o CV, admitindo-se valores $\leq 5\%$.

3.8.1 Capacidade antioxidante

Para avaliação de capacidade antioxidante, seguiu-se protocolo descrito anteriormente (Aldini *et al.*, 2001) com pequenas modificações (Braz *et al.*, 2013). Resumidamente, foram adicionados, em tubos de ensaio, 100 μl de plasma e 100 μl de

controle *phosphatidylcholine* (*PC*) em 300 μ l de *PBS*. Em seguida, 30 μ l da sonda lipofílica *BODIPY* foram diluídas em 3 ml de *PBS* (1x) e 100 μ l foram adicionados em cada tubo, sendo as amostras colocadas em banho-maria (37°C) por 10 minutos. Durante esse período, pesou-se 271 mg do iniciador de radicais 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (*AAPH*), o qual foi diluído em 2 ml de *PBS*. Logo após, foram adicionados *PBS* (485 μ l) a cada tubo de amostra e, em seguida, adicionou-se, vagarosamente, 80 μ l do *AAPH*. Volume de 200 μ l por amostra, em triplicata, foi pipetado, assim como o *PC*, em placa preta de 96 poços. A placa foi colocada no aparelho *Wallac Victor 2* (*PerkinElmer*, EUA) a 37°C por aproximadamente quatro horas e a oxidação da amostra foi monitorada por meio de produto de oxidação de fluorescência do *BODIPY*. Os dados foram tabulados e os cálculos da triplicata foram realizados para obtenção dos resultados, segundo a fórmula: (média da área do *PC* - média da área da amostra)/(média da área do *PC*) x 100. Os resultados foram expressos em porcentagem de defesa antioxidante.

3.8.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (*FRAP*)

Para realização do *FRAP*, utilizou-se protocolo adaptado de Benzie & Strain (1996). Para a curva-padrão, utilizou-se solução *Trolox* (5 mM dissolvido em metanol) em diluição seriada, em seis concentrações (de 31,25 μ M a 1.000 μ M). Amostras de soro foram descongeladas, mantidas em gelo e diluídas em água deionizada (H_2O_d) em proporção de 1:4. Foram adicionados, em cubetas individuais não sensíveis aos raios ultravioleta (UV), 30 μ l de cada amostra diluída, os pontos da curva-padrão de *Trolox* e o *blank* (somente H_2O_d). Em cada cubeta, incluindo o padrão e o *blank*, foram adicionados 90 μ l de H_2O_d e, em seguida, 900 μ l de solução coquetel (300 mM de tampão de acetato em pH 3,6; 10 mM de *TPTZ* em 40 mM de ácido clorídrico [HCl]; 20 mM de cloreto de ferro [$FeCl_3 \cdot 6H_2O$] em 10 ml de H_2O_d na proporção de 10:1:1). Após 60 minutos de incubação em temperatura ambiente, as cubetas foram lidas em espectrofotômetro (UV-1601 *model*, Shimadzu, Japão) na absorbância (ABS) de 593 nm. O cálculo do valor do *FRAP*, em μ M/*Trolox*, foi calculado com base na equação da curva

padrão linear de *Trolox* ($y = a.x + b$), onde $y = \text{ABS}$ da média das duplicatas e $x = \text{valor do FRAP}$, multiplicando-se o valor final por 4 (correção da diluição inicial da amostra).

3.9 Análise estatística

O tamanho amostral foi calculado baseado no teste do cometa, em estudos prévios (Ceylan *et al.*, 2011; Braz *et al.*, 2011a), sendo que 20 pacientes por grupo foram necessários para um erro de tipo I (α) de 0,05 e um erro de tipo II (β) de 0,10 (poder do teste de 90%).

Os dados foram tabulados em *software excel 2011* e analisados estatisticamente utilizando o Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (*Windows Software*, versão 17.1, SPSS Inc., Chicago, EUA). Para o parâmetro sexo o teste do qui-quadrado foi utilizado; para as variáveis paramétricas ($X \pm DP$) realizou-se análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) para comparação dos momentos em cada grupo e o teste t de Student para comparação dos grupos em cada momento. Já para as variáveis não paramétricas (medianas, primeiro e terceiro quartis) realizou-se o teste de Friedman para comparação dos momentos e o teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos em cada momento, sendo que o nível de significância utilizado foi menor que 5%.

4 RESULTADOS

Quarenta e quatro pacientes foram recrutados para o estudo, porém um paciente do grupo desflurano teve a cirurgia cancelada após a aleatorização e outro foi excluído no momento da análise devido à amostra de sangue estar hemolisada, enquanto que no grupo desflurano/N₂O dois pacientes foram excluídos no momento da análise devido às amostras hemolisadas. Assim, 40 pacientes foram analisados, sendo 20 pacientes por grupo (Figura 5). Nenhum dos pacientes teve complicação cirúrgica ou clínica e todos receberam alta do hospital de acordo com as diretrizes estabelecidas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos de pacientes do estudo em relação aos dados demográficos (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes dos dois grupos avaliados

Características	Desflurano (n=20)	Desflurano/N ₂ O (n=20)	Valor de p
Idade (anos)	30 ± 11	28 ± 8	0,56
IMC (kg/m ²)	25 ± 5	24 ± 3	0,50
Sexo (masculino/feminino)	10 (50%) / 10 (50%)	9 (45%) / 11 (55%)	0,75

IMC = índice de massa corporal. Dados apresentados como X ± DP ou número absoluto e frequência (%).

A Tabela 4 mostra que não houve diferença significativa em relação à duração da cirurgia nem das doses de fármacos administrados no intraoperatório entre os grupos, mostrando homogeneidade entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Dados relativos à anestesia e cirurgia

Variável	Desflurano (n = 20)	Desflurano/N ₂ O (n = 20)	Valor de p
Duração da cirurgia (minutos)	142 ± 43	135 ± 58	0,64
Dose total de propofol (mg)	144 ± 26	147 ± 23	0,70
Dose total de fentanil (µg)	466 ± 222	429 ± 210	0,60
Dose total de sugamadex (mg)	189 ± 30	195 ± 74	0,84
Dose total de rocurônio (mg)	48 ± 20	40 ± 10	0,12

Dados apresentados como X ± DP.

A Tabela 5 mostra que a frequência cardíaca teve redução de seus valores durante toda a cirurgia em ambos os grupos ($p < 0,001$) em relação ao momento anterior à indução anestésica. De forma semelhante, as pressões arteriais sistólica e diastólica tiveram diminuição de seus valores ($p < 0,001$) durante toda a cirurgia em relação ao momento anterior à indução anestésica em ambos os grupos, porém sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Dados hemodinâmicos dos pacientes dos grupos estudados

Parâmetro	Grupos	Antes da indução anestésica	Momento após a indução anestésica (minutos)			Valor de p
			30	60	90	
FC (bpm)	Desflurano	80 ± 12	75 ± 12 *	67 ± 11 *	66 ± 7 *	< 0,001
	Desf./N ₂ O	83 ± 16	71 ± 11 *	70 ± 13 *	71 ± 12 *	< 0,001
		p = 0,53	p = 0,33	p = 0,38	p = 0,09	
PAS (mm Hg)	Desflurano	125 ± 18	96 ± 11 *	100 ± 11 *	99 ± 9 *	< 0,001
	Desf./N ₂ O	121 ± 13	98 ± 13 *	100 ± 12 *	121 ± 12 *	< 0,001
		p = 0,44	p = 0,78	p = 0,94	p = 0,52	
PAD (mm Hg)	Desflurano	73 ± 11	51 ± 8 *	51 ± 8 *	56 ± 9 *	< 0,001
	Desf./N ₂ O	73 ± 8	53 ± 10 *	57 ± 12 *	54 ± 9 *	< 0,001
		p = 0,86	p = 0,50	p = 0,09	p = 0,43	

FC = frequência cardíaca, bpm = batimento por minuto, PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, mm Hg = milímetros de mercúrio, Desf./N₂O = desflurano associado ao óxido nitroso. *Difere estatisticamente do momento antes da indução anestésica. Dados apresentados como X ± DP.

Os resultados da Tabela 6 mostram que houve aumento significativo da concentração expirada de desflurano ao longo da cirurgia em ambos os grupos ($p < 0,05$). A saturação periférica de oxigênio e a pressão expiratória de dióxido de carbono não se alteraram significativamente entre momentos e grupos ($p > 0,05$). A temperatura esofágica aumentou gradativamente, porém de forma significativa somente aos 90 minutos após a

indução anestésica em comparação ao momento 30 minutos de indução anestésica em ambos os grupos ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum desses parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Valores de saturação periférica de oxigênio (SpO_2), pressão expirada de dióxido de carbono ($P_{ET}CO_2$), concentração expirada de desflurano (DE_{EXP}) e temperatura esofágica (T_{ESOF}) segundo momentos e grupos avaliados

Parâmetro	Grupos	Momento após a indução anestésica (minutos)			Valor de p
		30	60	90	
DE_{EXP} (%)	Desflurano	$5,0 \pm 0,9$	$5,3 \pm 1,1^*$	$5,7 \pm 1,3^*$	0,002
	Desf./N ₂ O	$5,3 \pm 0,8$	$6,1 \pm 1,5^*$	$6,6 \pm 1,7^*$	< 0,001
		p = 0,26	p = 0,08	p = 0,09	
$P_{ET}CO_2$ (mm Hg)	Desflurano	$33,9 \pm 2,2$	$33,2 \pm 1,5$	$33,7 \pm 2,2$	0,18
	Desf./N ₂ O	$35,1 \pm 3,1$	$34,4 \pm 3,1$	$34,6 \pm 2,7$	0,26
		p = 0,17	p = 0,13	p = 0,26	
T_{ESOF} (°C)	Desflurano	$36,1 \pm 0,5$	$36,2 \pm 0,6$	$36,3 \pm 0,6^*$	< 0,001
	Desf./N ₂ O	$36,3 \pm 0,9$	$36,6 \pm 1,1^*$	$36,7 \pm 1,0^*$	< 0,001
		p = 0,34	p = 0,14	p = 0,12	
SpO_2 (%)	Desflurano	99 ± 1	99 ± 1	99 ± 1	0,27
	Desf./N ₂ O	99 ± 2	99 ± 1	99 ± 1	0,92
		p = 0,83	p = 0,79	p = 0,89	

Desf./N₂O = desflurano associado ao óxido nitroso. *Difere estatisticamente dos 30 minutos após indução anestésica. Dados apresentados como $X \pm DP$.

O teste do cometa mostrou aumento progressivo dos danos basais no DNA em ambos os grupos ao longo dos momentos, que se tornou significativa apenas no grupo desflurano no dia seguinte ao ato anestésico-cirúrgico em relação ao momento basal ($p = 0,01$), mas sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 6).

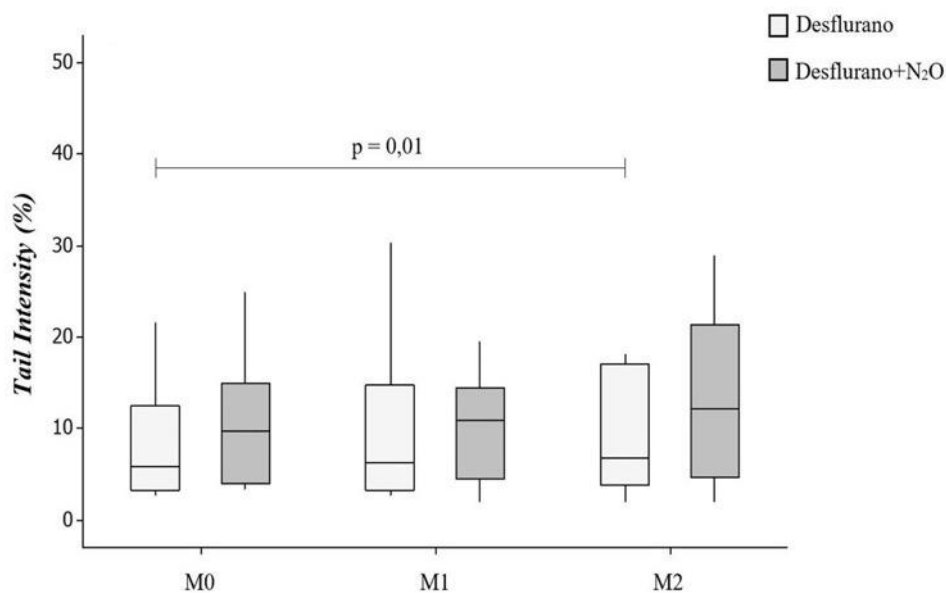


Figura 6 - Danos basais no DNA (quebras de fita e sítios álcali-lábeis) segundo momentos e grupos. M₀ = antes do paciente receber medicação pré-anestésica, M₁ = 90 minutos após o início da anestesia inalatória, M₂ = manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).

Em relação aos danos oxidativos no material genético, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre grupos e momentos em relação às pirimidinas e purinas oxidadas (Tabela 7).

Em relação aos marcadores de lipoperoxidação, a Figura 7 mostra os resultados de 4-HNE. Observou-se aumento de seus valores, em ambos os grupos ao longo dos momentos, que se tornaram significantes apenas no grupo desflurano no dia seguinte ao ato anestésico-cirúrgico em relação ao momento basal ($p = 0,03$), mas sem diferença significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$).

Tabela 7 - Danos oxidativos em bases do DNA segundo momentos e grupos apresentados como *tail intensity* (%)

Danos oxidativos	Grupos	Momentos			Valor de p
		M ₀	M ₁	M ₂	
Pirimidinas	Desflurano	36,9 ± 18,6	39,7 ± 19,0	39,8 ± 17,5	0,68
	Desf./N ₂ O	43,5 ± 13,6	41,0 ± 16,2	37,2 ± 17,1	0,49
		p = 0,29	p = 0,84	p = 0,69	
Purinas	Desflurano	55,1 ± 17,5	52,8 ± 16,6	50,1 ± 19,3	0,47
	Desf./N ₂ O	56,8 ± 17,1	50,4 ± 12,9	56,5 ± 17,4	0,36
		p = 0,81	p = 0,70	p = 0,4	

Desf./N₂O = desflurano associado ao óxido nitroso, M₀ = antes do paciente receber medicação pré-anestésica, M₁ = 90 minutos após o início da anestesia inalatória, M₂ = manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico. Dados apresentados como X ± DP.

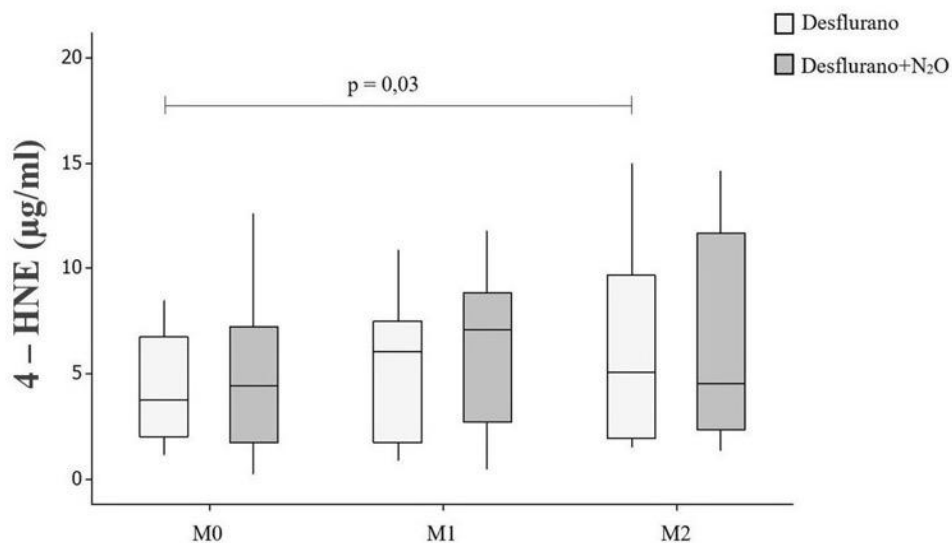


Figura 7 - Valores de 4-HNE de pacientes submetidos a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano associado ao N₂O, nos três momentos avaliados. M₀ = antes do paciente receber medicação pré-anestésica, M₁ = 90 minutos após o início da anestesia inalatória, M₂ = manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).

Os resultados de MDA, 8-isoprostano e proteína carbonilada (Tabela 8) mostraram que não houve alteração significativa entre momentos e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 8 - Marcadores de estresse oxidativo em lipídios e proteína carbonilada de pacientes submetidos a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano associado ao N₂O nos três momentos avaliados

Parâmetro	Grupos	Momentos			Valor de p
		M ₀	M ₁	M ₂	
Malonaldeído ($\mu\text{mol/l}$)	Desflurano	0,49 \pm 0,22	0,45 \pm 0,17	0,43 \pm 0,21	0,25
	Desf./N ₂ O	0,47 \pm 0,16	0,43 \pm 0,07	0,41 \pm 0,20	0,20
		p = 0,84	p = 0,54	p = 0,46	
8-isoprostano (pg/ml)	Desflurano	5729 \pm 3199	7009 \pm 5429	8453 \pm 9772	0,48
	Desf./N ₂ O	5818 \pm 3509	6703 \pm 5336	7024 \pm 6356	0,38
		p = 0,90	p = 0,90	p = 0,60	
Proteína carbonilada (nmol/mg)	Desflurano	3,3 (2,4 - 6,4)	3,5 (2,6 - 7,0)	2,9 (2,1 - 5,5)	0,93
	Desf./N ₂ O	2,8 (2,5 - 5,9)	3,7 (2,9 - 8,5)	3,0 (2,2 - 5,5)	0,13
		p = 0,85	p = 0,81	p = 0,75	

Desf./N₂O = desflurano associado ao óxido nitroso, M₀ = antes do paciente receber medicação pré-anestésica, M₁ = 90 minutos após o início da anestesia inalatória, M₂ = manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico. Dados apresentados como X \pm DP ou mediana (primeiro quartil - terceiro quartil).

Em relação aos valores de defesa antioxidante, os resultados de *FRAP* mostraram que não houve alteração significativa entre momentos e grupos ($p > 0,05$) (Tabela 9). Para capacidade antioxidante, observou-se que no grupo desflurano não houve alteração significativa entre momentos enquanto no grupo desflurano associado ao N₂O houve diminuição da capacidade antioxidante no dia seguinte ao ato anestésico-cirúrgico quando comparado ao intraoperatório ($p = 0,02$), mas sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 9 - Parâmetros de defesa antioxidante avaliados em pacientes submetidos a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano/N₂O nos três momentos avaliados

Parâmetro	Grupos	Momentos			Valor de p
		M ₀	M ₁	M ₂	
<i>FRAP</i> (μ mol/l)	Desflurano	572 (526 - 642)	592 (527 - 736)	567 (482 - 666)	0,21
	Desf./N ₂ O	551 (431 - 628)	659 (486 - 770)	585 (524 - 626)	0,70
		p = 0,28	p = 0,91	p = 0,90	
Capacidade antioxidante (%)	Desflurano	50,5 (48,5 - 56,6)	51,2 (44,9 - 57,2)	48,0 (44,1 - 56,1)	0,28
	Desf./N ₂ O	46,4 (44,7 - 55,7)	50,7 (47,1 - 54,5)	46,0 (43,9 - 50,1) *	0,02
		p = 0,18	p = 0,85	p = 0,32	

FRAP = Ferric Reducing Antioxidante Power, Desf./N₂O = desflurano associado ao óxido nitroso, M₀ = antes do paciente receber medicação pré-anestésica, M₁ = 90 minutos após o início da anestesia inalatória, M₂ = manhã do dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico. *Difere estatisticamente de M₁. Dados apresentados como mediana (primeiro quartil - terceiro quartil).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a população avaliada incluiu adultos jovens, sem comorbidades associadas e com proporção semelhante de ambos os sexos, mostrando homogeneidade dos grupos. Em relação aos dados hemodinâmicos, a diminuição significativa de frequência cardíaca e pressão arterial, em ambos os grupos, durante a cirurgia foi importante para a realização de septoplastia para evitar excessivo sangramento no campo operatório. Os pacientes, em ambos os grupos, mantiveram-se em normotermia. Além disso, houve similaridade entre os grupos em relação à duração cirúrgica e aos fármacos utilizados no intraoperatório, minimizando possível interferência desses fatores em nossos resultados.

Considerando que a associação de N₂O ao anestésico inalatório diminui a concentração necessária dos anestésicos halogenados (Rampil *et al.*, 1991), esperava-se que no grupo desflurano/N₂O fosse utilizada menor concentração do halogenado, o que não ocorreu. Provavelmente, isso foi devido ao fato de que a adequação da profundidade anestésica se baseou em alterações hemodinâmicas e não no índice bispectral (*BIS*), que é considerado método ideal para avaliação da profundidade anestésica (Oliveira *et al.*, 2017). Nós tentamos, na presente pesquisa, o uso do *BIS*, mas isto não foi possível, pois a cirurgia incluída no estudo foi realizada na região facial dos pacientes, interferindo na adequada fixação dos eletrodos do monitor do *BIS* e, conseqüentemente, evitando adequada monitorização com esse método. Os modernos anestésicos halogenados, como sevoflurano e desflurano, diminuem a pressão arterial de maneira concentração-dependente por reduzirem a resistência vascular sistêmica e não por alteração do débito cardíaco (Pagel & Farber, 2015). Por outro lado, o N₂O aumenta o tono venoso e diminui a capacitância venosa. Assim, o uso concomitante de desflurano e N₂O aumenta a resistência vascular sistêmica e, conseqüentemente, a pressão arterial sistêmica quando comparado ao uso isolado do desflurano (Pagel & Farber, 2015). Assim, para manutenção de valores adequados de pressão arterial para a cirurgia proposta no estudo e respeitando a administração fixa de 60% de N₂O no grupo, houve necessidade de manutenção de concentrações mais elevadas de desflurano no grupo desflurano/N₂O.

Em relação à possível genotoxicidade do desflurano, trabalho realizado *in vitro* demonstrou que este anestésico aumentou a migração de danos no DNA quando

linfócitos foram expostos nas concentrações de 10 mM e 1 mM em comparação com a de 0,1 mM, mas não houve aumento significativo de danos ao longo do tempo de exposição - de cinco a 60 minutos (Karpiński *et al.*, 2005). Já em outro trabalho *in vitro*, somente houve aumento de danos no DNA de linfócitos na concentração máxima de 100 mM em comparação às de 0,1 mM, 1 mM e 10 mM, entretanto, em células espermáticas, o desflurano aumentou os danos no DNA somente na maior concentração (100 mM) em comparação à menor concentração (Kaymak *et al.*, 2012). Em trabalhos clínicos, utilizando-se o marcador TCI, Akin *et al.* (2005) observaram aumento significativo de danos genéticos em 15 mulheres com estado físico ASA I e II durante a anestesia mantida com desflurano (5%-6%) e até o sétimo dia do pós-operatório em relação ao momento anterior à anestesia; já pacientes com estado físico ASA I e II submetidos a cirurgia urológica e gastroenterológica que receberam 0,5 CAM (3%) de desflurano não tiveram aumento de danos citogenéticos, diferentemente do que ocorreu em pacientes que receberam 1 CAM (6%) do halogenado após três horas da anestesia (Aydinli *et al.*, 2011). É importante pontuar que esses dois trabalhos clínicos incluíram pacientes com comorbidades associadas (classificados com estado físico ASA II) e que foram submetidos a cirurgias de grande porte, utilizando o tiopental como agente hipnótico, além de baixas doses do opióide fentanil, prática anestesiológica que não é mais utilizada atualmente. Nossos achados, de forma inédita, mostraram que pacientes hígdios (somente ASA I) submetidos a cirurgia minimamente invasiva, os quais receberam manutenção anestésica com desflurano a 6% (1 CAM), tiveram aumento de danos basais no DNA, detectados pelo teste do cometa, no dia seguinte ao ato anestésico-cirúrgico (Nogueira *et al.*, 2016). A CAM do desflurano é muito maior que a dos outros anestésicos halogenados. Assim, sugere-se que a CAM elevada do desflurano pode contribuir para sua genotoxicidade (Chortkoff *et al.*, 1995; Aydinli *et al.*, 2011), uma vez que este anestésico apresenta mínima biotransformação hepática (Njoku *et al.*, 1997).

A presente pesquisa mostrou a mesma tendência de resultado para a anestesia mantida em associação de desflurano e N₂O, sem diferença significativa entre os grupos. O N₂O tem sido utilizado em anestesiologia há mais de 150 anos, entretanto há muitas controvérsias em relação ao seu possível efeito genotóxico/mutagênico/carcinogênico. Há relato que este gás, a 50%, induziu danos genéticos (TCI) quando administrado em linfócitos (Hoerauf *et al.*, 1999). Por outro lado, outros estudos conduzidos *in vitro*

indicaram que o N₂O não tem efeito direto no DNA, pelos resultados negativos obtidos no teste bacteriano de Ames e em teste para detecção de mutação em células pulmonares de *hamster* chinês (O'Donovan & Hammond, 2015). Reforçando nossos achados, trabalho realizado em crianças com estado físico ASA I-II, submetidas a cirurgias minimamente invasivas, induzidas com 8% de sevoflurano e mantidas com sevoflurano e 65% de N₂O, não mostrou alteração dos danos por TCI no final da anestesia, com duração inferior a 60 minutos (Krause *et al.*, 2003). Conforme revisão de O'Donovan & Hammond (2015), os autores ressaltam a escassez e controvérsias dos dados sobre o tema em relação à possível genotoxicidade do N₂O e sugerem que há somente fraca evidência de genotoxicidade desse gás. Assim, nossos dados corroboram tais evidências, especialmente em adultos jovens, sem comorbidades, submetidos a cirurgias pouco invasivas com média pouco superior a duas horas de duração. Ressalte-se também que o N₂O não é metabolizado.

Por outro lado, estudo clínico realizado por Chen *et al.* (2013) mostrou, em pacientes com estado físico ASA I-IV submetidos a cirurgia colorretal, sob anestesia com sevoflurano associado ou não ao N₂O, que somente houve aumento de danos basais no DNA (teste do cometa) no dia posterior à cirurgia no grupo que recebeu N₂O e, quanto mais longa foi a duração cirúrgica, maior foi o nível de danos observados. Os autores demonstraram, também, que a administração superior a duas horas de duração de N₂O está associada ao aumento de infecção pós-cirúrgica em pacientes submetidos a grandes cirurgias sob N₂O a 70%, quando comparados aos pacientes que receberam oxigênio em concentração de 30% ou 80%. Ressalta-se que há diferenças entre os achados de Chen *et al.* (2013) e os nossos, uma vez que utilizamos menor porcentagem de N₂O (60%), com 40% de oxigênio em manutenção com desflurano e não com sevoflurano, além de tipos diferentes de pacientes, cirurgia e momentos de coleta, além do tempo de cirurgia. Adicionalmente, os autores não avaliaram purinas e pirimidinas oxidadas. Dessa forma, nosso trabalho avaliou, pioneiramente, tanto danos basais quanto oxidativos no material genético em cirurgias minimamente invasivas com coleta de amostra biológica aos 90 minutos de anestesia, demonstrando que não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação às lesões no DNA. Portanto, mesmo com o aumento da sensibilidade do teste do cometa em detectar dano oxidativo no DNA (Dusinska & Collins, 2008), não observamos alteração nos níveis de purinas ou pirimidinas oxidadas tanto no grupo que

recebeu N₂O quanto no grupo que não o recebeu. Fazendo um paralelo com nossos trabalhos publicados anteriormente (Braz *et al.*, 2011a; Orosz *et al.*, 2014), também em pacientes com estado físico ASA I submetidos a cirurgia eletiva, com os anestésicos inalatórios isoflurano e sevoflurano respectivamente, também não se observou aumento de danos oxidativos no DNA. Assim, possivelmente, os anestésicos halogenados mais modernos não induzem oxidação no material genético.

As condições fisiológicas celulares exigem equilíbrio entre os processos pró-oxidante e antioxidante (Ribeiro *et al.*, 2005). A produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e de oxigênio (ERO) é parte integrante do metabolismo humano, tendo importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (Vasconcelos *et al.*, 2007). Quando em desequilíbrio, sabe-se que as ERO/ERN podem atacar, além do DNA, os lipídios e as proteínas.

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das espécies reativas, porém a membrana é um dos mais atingidos acarretando alterações em sua estrutura e permeabilidade (Cohen, 1989). O 4-HNE é o produto majoritário da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (Vasconcelos *et al.*, 2007), enquanto que o MDA é um dos marcadores mais frequentemente utilizados na peroxidação lipídica (Yin, 2008). Em relação à peroxidação lipídica avaliada com o desflurano, em estudo realizado em suínos, a anestesia inalatória mantida com desflurano (10%), mas não com sevoflurano, induziu lipoperoxidação (MDA) duas e quatro horas após a exposição, de maneira progressiva (Allaouchiche *et al.*, 2001). Já em trabalho clínico, não se observou indução de peroxidação lipídica em pacientes com estado físico ASA I e II submetidos a cirurgia eletiva durante (60 minutos) ou após 24 horas da anestesia mantida com 6%-8% de desflurano (Cinnella *et al.*, 2007). Já nossos dados mostraram aumento significativo de 4-HNE, mas não de MDA nem de 8-isoprostrano, no grupo que recebeu anestesia com desflurano no dia seguinte ao ato anestésico-cirúrgico. Assim, de forma interessante, observamos tanto aumento de oxidação lipídica quanto aumento de lesões no material genético após horas da exposição ao desflurano. Possivelmente, o marcador 4-HNE é mais sensível que o MDA plasmático ou o 8-isoprostrano sérico na detecção de lipoperoxidação pós exposição ao desflurano. Referente aos trabalhos clínicos que realizaram comparação de peroxidação lipídica em pacientes que receberam desflurano e

desflurano associado a 50% de N₂O, tanto Ceylan *et al.* (2009) quanto Akin *et al.* (2015) não observaram alteração nas concentrações de MDA em pacientes. Assim, de acordo com a literatura, também não encontramos alterações significantes de MDA plasmático durante e após anestesia mantida com desflurano ou desflurano com N₂O (60%). Adicionalmente, também não foi observada diferença entre os grupos avaliados em relação ao 8-isoprostano e ao 4-HNE. Fazendo um paralelo com trabalho realizado com exposição ocupacional, observou-se aumento de 8-isoprostano urinário em enfermeiras expostas aos anestésicos N₂O, isoflurano e sevoflurano em comparação ao grupo não exposto (Wrońska-Nofer *et al.*, 2012). Apesar desse marcador ser detectável em todos os fluidos e tecidos (Roberts & Morrow, 2000), possivelmente sua detecção na urina seja método mais sensível que no soro.

Deve ser enfatizado que não foram encontrados, na literatura ao nosso alcance, trabalhos que comparem pacientes mantidos com desflurano com os que foram mantidos com desflurano associado ao N₂O em relação aos marcadores de estresse oxidativo (danos oxidativos no DNA, 4-HNE e 8-isoprostano), mostrando a originalidade da presente pesquisa, na qual se realizou amplo espectro de marcadores de estresse oxidativo desde ácido nucleico até proteína, para se entender possíveis mecanismos tóxicos dos anestésicos.

Todos os aminoácidos também são susceptíveis à oxidação, principalmente os aromáticos, que são os alvos preferidos de ataque. A oxidação direta de aminoácidos fornece derivados carbonílicos (Weber *et al.*, 2015). Além disso, grupos carbonila podem ser introduzidos em proteínas via reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica (Vasconcelos *et al.*, 2007). Sivaci *et al.* (2006) observaram, em pacientes com estado físico ASA I-III submetidos a laparoscopia, aumento significativo de estresse oxidativo (MDA e proteínas carboniladas) após seis horas e 24 horas do ato cirúrgico sob anestesia com desflurano associado ou não ao N₂O. Diferentemente, nossos dados mostraram que, na comparação de anestesia com desflurano com anestesia associada a 60% de N₂O não houve indução de oxidação lipídica ou proteica em pacientes hígidos submetidos a cirurgia minimamente invasiva, sem lesão de isquemia e reperfusão, como pode ocorrer na cirurgia laparoscópica, até o dia posterior do ato anestésico-cirúrgico (~ 17 horas).

Ao analisarmos a defesa antioxidante, observou-se diminuição da capacidade antioxidante no pós-operatório comparado ao intraoperatório, mas não ao momento basal,

nos pacientes avaliados sob desflurano associado ao N₂O, porém sem diferença significativa entre os grupos. De forma semelhante, apesar do pequeno, mas não significativo aumento da capacidade antioxidante, avaliada pelo *FRAP*, durante o ato anestésico-cirúrgico, não houve diferença entre momentos e grupos avaliados. Dados prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram semelhante perfil de *status* antioxidante em pacientes submetidos a cirurgias eletivas que receberam anestesia com isoflurano ou sevoflurano livre de N₂O (Braz *et al.*, 2013; Orosz *et al.*, 2014). Yalcin *et al.* (2013) também não relataram alteração significativa de capacidade antioxidante no pós-operatório em mulheres com estado físico ASA I e II submetidas a cesárea sob anestesia geral com desflurano. De forma semelhante, Türkan *et al.* (2011) não observaram alteração de enzimas antioxidantes SOD e GPX em pacientes submetidos a anestesia com desflurano no intra ou no pós-operatório. Já outros autores, ao avaliarem pacientes submetidos a cirurgia laparoscópica, com coletas sanguíneas anteriormente e ao final da cirurgia, notaram que os pacientes que receberam anestesia com 6% de desflurano, em fluxo de gases frescos de 6 l/min, tiveram aumento de oxidantes, entretanto GPX e capacidade antioxidante se mantiveram inalteradas (Erbaş *et al.*, 2015). Em relação às enzimas antioxidantes avaliadas em pacientes sob desflurano com 50% de N₂O, não houve alterações de GPX e/ou de SOD (Ceylan *et al.*, 2009; Eroglu *et al.*, 2010; Akin *et al.*, 2015), reforçando que o uso concomitante de N₂O com desflurano não altera a capacidade antioxidante dos pacientes durante ou após a anestesia. Karabayirli *et al.* (2016) também não observaram alteração de *status* antioxidante no pré- e pós-operatório de pacientes que receberam (4%-6%) desflurano associado ao N₂O, em cirurgias de colecistectomia laparoscópica com duração inferior a 60 minutos.

É importante ressaltar que nosso estudo incluiu apenas pacientes adultos com estado físico ASA I submetidos a cirurgia minimamente invasiva, minimizando assim possíveis fatores de confusão. Procedimentos cirúrgicos menos invasivos levam a menor trauma cirúrgico e têm menor impacto na inflamação e no estresse oxidativo do que cirurgias de grande porte e invasivas (Desborough, 2000; Kurosawa & Kato, 2008). Uma possível limitação deste estudo é que se utilizou o propofol para indução da anestesia, uma vez que este agente hipnótico possui propriedade antioxidante (Vasileiou *et al.*, 2009; Braz *et al.*, 2015), o que poderia alterar os resultados. No entanto, além de ser o agente intravenoso mais seguro e mais utilizado para indução anestésica, o propofol foi

administrado de forma semelhante em ambos os grupos em dose única e, levando em conta sua depuração elevada, parece ter tido mínima influência sobre o *status* antioxidante/oxidativo. Adicionalmente, os fármacos utilizados no intraoperatório, como o opióide fentanil e o bloqueador neuromuscular brometo de rocurônio, não são considerados genotóxicos ou indutores de estresse oxidativo (Brambilla & Martelli, 2009; Braz *et al.*, 2013; Orosz *et al.*, 2014). Em relação aos outros fármacos, o antiemético ondansetrona não é considerado genotóxico, o analgésico tramadol não se mostrou genotóxico em humanos e na maioria dos testes realizados de genotoxicidade e mutagenicidade e o analgésico dipirona tem resultados controversos de genotoxicidade, apesar de ter propriedade antioxidante (Tucker *et al.*, 1989; Matthiesen *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2008; Brambilla & Martelli, 2009). Esses fármacos somente foram utilizados no final da cirurgia, em doses semelhantes aos pacientes de ambos os grupos, minimizando possível interferência nos resultados.

Portanto, o presente trabalho clínico contribuiu para preencher importante lacuna em relação aos anestésicos utilizados em associação. Os resultados sugerem que a associação anestésica estudada é uma opção adequada para cirurgias minimamente invasivas em pacientes sem comorbidades associadas. A associação de 60% de N₂O com desflurano não potencializou os efeitos do halogenado tanto no material genético quanto no estado redox.

6 CONCLUSÃO

A comparação da manutenção anestésica com desflurano, associada ou não ao N₂O, não mostrou diferença de genotoxicidade e de estresse oxidativo em pacientes com estado físico ASA I submetidos a cirurgia minimamente invasiva de pelo menos 90 minutos de duração. Entretanto, observou-se que pacientes que receberam o anestésico desflurano tiveram aumento de danos basais no DNA e lipoperoxidação (4-HNE) no dia seguinte ao ato anestésico-cirúrgico. Se há outras consequências adversas desses efeitos da anestesia mantida com desflurano, isso certamente merece mais estudos. Assim, a utilização de N₂O não potencializou os efeitos do desflurano e parece ser técnica anestésica segura em relação ao material genético e *status* oxidativo em indivíduos hígidos submetidos a septoplastia.

7 REFERÊNCIAS

Akin A, Ugur F, Ozkul Y, Esmoğlu A, Gunes I, Ergul H. Desflurane anaesthesia increases sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49:1559-61.

Akin M, Ayoglu H, Okyay D, Ayoglu F, Gür A, Can M, *et al*. Effects of various anesthesia maintenance on serum levels of selenium, copper, zinc, iron and antioxidant capacity. *Rev Bras Anesthesiol*. 2015;65:51-60.

Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1043-50.

Allaouchiche B, Debon R, Goudable J, Chassard D, Duflo F. Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anesth Analg*. 2001;93:981-5.

Anderson JS, Rose NR, Martin JL, Eger EI, Njoku DB. Desflurane hepatitis associated with hapten and autoantigen-specific IgG4 antibodies. *Anesth Analg*. 2007;104:1452-3.

Aydinli B, Özgök A, Demir ZA, Yagar S, Ergün MA, Karaer D, *et al*. Evaluation of dose-related genotoxicity of desflurane by SCE human lymphocytes. *Turk J Med Sci*. 2011;41:1037-41.

Baden JM, Monk SJ. Mutagenicity and toxicity studies with high-pressure nitrous oxide. *Toxicol Lett*. 1981;7:259-62.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2016 [last updated 2016 Dec 28; cited 2017 Jan 12]. 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.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239:70-6.

Brambilla G, Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. *Pharmacol Res.* 2009;60:1-17.

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;21:972-6.

Braz MG, Magalhães MR, Salvadori DM, Ferreira AL, Braz LG, Sakai E, *et al.* Evaluation of DNA damage and lipoperoxidation of propofol in patients undergoing elective surgery. *Eur J Anaesthesiol.* 2009;26:654-60.

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

Braz MG, Braz LG, Barbosa BS, Giacobino J, Orosz JE, Salvadori DM, *et al.* DNA damage in patients who underwent minimally invasive surgery under inhalation or intravenous anesthesia. *Mutat Res.* 2011b;726:251-4.

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

Braz MG, Braz LG, Braz JR, Pierine DT, Correa CR, Ferreira AL, *et al.* Comparison of oxidative stress in ASA physical status I patients scheduled for minimally invasive surgery under balanced or intravenous anesthesia. *Minerva Anesthesiol.* 2013;79:1030-8.

Braz MG, Braz LG, Freire CMM, Lucio LMC, Braz JCR, Tang G, *et al.* Isoflurane and propofol contribute to increasing the antioxidant status of patients during minor elective surgery: a randomized clinical study. *Medicine*. 2015;94:e1266.

Braz MG, Karahalil B. Genotoxicity of anesthetics evaluated in vivo (animals). *Biomed Res Int*. 2015;2015:280802.

Buhre W, Cerny V, Hert SD, Disma N, Habre W, Hendrickx J, *et al.* The current place of nitrous oxide in clinical practice: an expert opinion-based task force consensus statement of the European Society of Anaesthesiology. *Eur J Anaesthesiol*. 2015;32:517-20.

Ceylan BG, Yilmaz F, Eroglu F, Yavuz L, Gulmen S, Vural H. Oxidant and antioxidant activities of different anesthetic techniques. Propofol versus desflurane. *Saudi Med J*. 2009;30:371-6.

Ceylan BG, Nazıroğlu M, Uğuz AC, Barak C, Erdem B, Yavuz L. Effects of vitamin C and E combination on element and oxidative stress levels in the blood of operative patients under desflurane anesthesia. *Biol Trace Elem Res*. 2011;141:16-25.

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;21:249-54.

Chang CY, Goldstein E, Agarwal N, Swan KG. Ether in the developing world: rethinking and abandoned agent. *BMC Anesthesiol*. 2015;15:149.

Chen Y, Liu X, Cheng CH, Gin T, Leslie K, Myles P, *et al.* Leukocyte DNA damage and wound infection after nitrous oxide administration: a randomized controlled trial. *Anesthesiology*. 2013;118:1322-31.

Chinelato AR, Froes NDT. Genotoxic effects on professionals exposed to inhalation anesthetics. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52:79-85.

Cinnella G, Vendemiale G, Dambrosio M, Serviddio G, Pugliese PL, Aspromonte G, *et al.* Effect of propofol, sevoflurane and desflurane on systemic redox balance. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007;20:585-93.

Chortkoff BS, Eger EI II, Crankshaw DP, Gonsowski CT, Dutton RC, Ionescu P. Concentrations of desflurane and propofol that suppress response to command in humans. *Anesth Analg.* 1995;81:737-43.

Cohen MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann Intern Med.* 1989;111:918-31.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26:249-61.

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

Costa D, Gomes A, Lima JL, Fernandes E. Singlet oxygen scavenging activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Redox Rep.* 2008;13:153-60.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2013;329:23-38.

Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth.* 2000;85:109-17.

Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis.* 2008;23:191-205.

Eger EI. Characteristics of anesthetic agents used for induction and maintenance of general anesthesia. *Am J Health Syst Pharm.* 2004;61:S3-10.

Erbas M, Demiraran Y, Yildirim HA, Sezen G, Iskender A, Karagoz I, *et al.* Comparação dos efeitos da perfusão de sevoflurano, desflurano e propofol sobre o sistema oxidante/antioxidante durante anestesia geral. *Rev Bras Anesthesiol.* 2015;65:68-72.

Eroglu F, Yavuz L, Ceylan BG, Yilmaz F, Eroglu E, Delibas N, *et al.* New volatile anesthetic, desflurane, reduces vitamin E level in blood of operative patients via oxidative stress. *Cell Biochem Funct.* 2010;28:211-6.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil.* 1997;43:61-8.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408:239-47.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:1106-14.

Gunasekarana V, Raj GV, Chand P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *J Clin Diagn Res.* 2015;9:GE01-5.

Hoerauf KH, Schrögenderfer KF, Wiesner G, Gruber M, Spacek A, Kress HG, *et al.* Sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to isoflurane and nitrous oxide in vitro. *Br J Anaesth.* 1999;82:268-70.

Hogan K. Nitrous oxide genotoxicity. *Anesthesiology.* 2013;118:1258-60.

Hopkins PM. Nitrous oxide: a unique drug of continuing importance for anaesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2005;19:381-9.

Jakobsson J. Desflurane: a clinical update of a third-generation inhaled anaesthetic. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012;56:420-32.

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;439:199-206.

Karabayirli S, Surgit O, Kasikara H, Koca Bicer C, Ergin M, Irem Demircioglu R, *et al.* The effects of adding ischemic preconditioning during desflurane inhalation anesthesia or propofol total intravenous anesthesia on pneumoperitoneum-induced oxidative stress. *Acta Chir Belg.* 2016;24:1-9.

Karpiński TM, Kostrzewska-Poczekaj M, Stachecki I, Mikstacki A, Szyfter K. Genotoxicity of the volatile anaesthetic desflurane in human lymphocytes in vitro, established by comet assay. *J Appl Genet.* 2005;463:319-24.

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;31:1207-13.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149:43-50.

Krause T, Scholz J, Jansen L, Boettcher H, Koch C, Wappler F, *et al.* Sevoflurane anaesthesia does not induce the formation of sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of children. *Br J Anaesth.* 2003;90:233-5.

Kurosawa S, Kato M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. *J Anesth.* 2008;22:263-77.

Lee YM, Song BC, Yeum KJ. Impact of volatile anesthetics on oxidative stress and inflammation. *Biomed Res Int.* 2015;2015:242709.

Lima ES, Abdalla DS. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm.* 2001;37:293-303.

Martin Jr JL, Njoku DB. Metabolism and toxicity of inhaled anesthetics. In: Miller RD, editor. Miller's Anesthesia. 6th ed. Pensilvânia: Elsevier; 2005a. p. 238.

Martin Jr JL, Njoku DB. Metabolism and toxicity of inhaled anesthetics. In: Miller RD, ed. Miller's Anesthesia 6th ed. Pensilvânia: Elsevier; 2005b. p. 262.

Matthiesen T, Wöhrmann T, Coogan TP, Uragg H. The experimental toxicology of tramadol: an overview. *Toxicol Lett.* 1998;95:63-71.

Morgan Jr GE, Mikhail MS. Anestésicos inalatórios. In: Anestesiologia clínica. 2^a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 117.

Myles PS, Chan MT, Leslie K, Peyton P, Paech M, Forbes A. Effect of nitrous oxide on plasma homocysteine and folate in patients undergoing major surgery. *Br J Anaesth.* 2008;100:780-6.

Myles PS, Leslie K, Chan TV, Forbes A, Peyton PJ, Paech MJ, *et al.* The safety of addition of nitrous oxide to general anaesthesia in at-risk patients having major non-cardiac surgery (ENIGMA-II): a randomised, single-blind trial. *Lancet.* 2014;384:1446-54.

Myles PS, Chan MT, Kasza J, Paech MJ, Leslie K, Peyton PJ, *et al.* Severe nausea and vomiting in the evaluation of nitrous oxide in the gas mixture for anesthesia II trial. *Anesthesiology.* 2016;124:1032-40.

Nagele P, Brown F, Francis A, Scott MG, Gage BF, Miller JP. Influence of nitrous oxide anesthesia, B-vitamins, and MTHFR gene polymorphisms on perioperative cardiac events: the vitamins in nitrous oxide (VINO) randomized trial. *Anesthesiology.* 2013;119:19-28.

Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of lifestyle factors. *Clin Chem*. 1997;43:1209-14.

Njoku D, Laster MJ, Gong DH, Eger EI, Reed GF, Martin JL. Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. *Anesth Analg*. 1997;84:173-8.

Nogueira FR, Braz LG, Andrade LR, Carvalho ALR, Vane LA, Módolo NSP, *et al*. Evaluation of genotoxicity of general anesthesia maintained with desflurane in patients under minor surgery. *Environ Mol Mutagen*. 2016;57:312-6.

O'Donovan MR, Hammond TG. Is nitrous oxide a genotoxic carcinogen? *Mutagenesis*. 2015;30:459-62.

Oliveira D, Bernardo WM, Nunes VM. Benefício da anestesia geral com monitoração do índice bispectral em comparação com o monitoramento guiado apenas por parâmetros clínicos. Revisão sistemática e metanálise. *Rev Bras Anesthesiol*. 2017;67:72-84.

Orosz JE, Braz LG, Ferreira AL, Amorim RB, Salvadori DM, Yeum KJ, *et al*. Balanced anesthesia with sevoflurane does not alter redox status in patients undergoing surgical procedures. *Mutat Res*. 2014;773:29-33.

Pagel PS, Farber NE. Inhaled anesthetics: cardiovascular pharmacology. In Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL. *Miller's Anesthesia*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier-Sanders, 2015. pp 706-51.

Praticò D, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA. F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases. *Chem Phys Lipids*. 2004;128:165-71.

Prielipp RC. An anesthesiologist's perspective on inhaled anesthesia decision-making. *Am J Health Syst Pharm*. 2010;67:13-20.

Rampil IJ, Lockhart SH, Zwass MS, Peterson N, Yasuda N, Eger EI, *et al.* Clinical characteristics of desflurane in surgical patients: minimum alveolar concentration. *Anesthesiology*. 1991;74:429-33.

Ribeiro SM, Queiroz JH, Pelúzo MC, Costa NM, Matta LP, Queiroz ME. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. *Biosci J*. 2005;21:133-49.

Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:505-13.

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

Sakai EM, Connolly MD, Klauck MS. Inhalation anesthesiology and volatile liquid anesthetics: focus on isoflurane, desflurane, and sevoflurane. *Pharmacotherapy*. 2005;25:1773-88.

Sanders RD, Weimann J, Maze M. Biologic effects of nitrous oxide: a mechanistic and toxicologic review. *Anesthesiology*. 2008;109:707-22.

Saraiva RA. Desflurane: physicochemical properties, pharmacology and clinical use. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003;53:214-26.

Schifilliti D, Mondello S, D'Arrigo MG, Chillè G, Fodale V. Genotoxic effects of anesthetic agents: an update. *Expert Opin Drug Saf*. 2011;10:891-9.

Sivaci R, Kahraman A, Serteser M, Sahin DA, Dilek ON. Cytotoxic effects of volatile anesthetics with free radicals undergoing laparoscopic surgery. *Clin Biochem*. 2006;39:293-8.

Stachnik J. Inhaled anesthetic agents. *Am J Health Pharm*. 2006;63:623-34.

Tatum VL, Changchit C, Chow CK. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids*. 1990;25:226-9.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, *et al.* Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35:206-21.

Tucker ML, Jackson MR, Scales MD, Spurling NW, Tweats DJ, Capel-Edwards K. Ondansetron: pre-clinical safety evaluation. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989;25:S79-93.

Türkan H, Aydın A, Sayal A, Karahalil B. The effect of sevoflurane and desflurane on markers of oxidative status in erythrocyte. *Toxicol Ind Health*. 2011;27:181-6.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30:1323-38.

Vasileiou I, Xanthos T, Koudouna E, Perrea D, Klonaris C, Katsargyris A, *et al.* Propofol: a review of its non-anaesthetic effects. *Eur J Pharmacol*. 2009;605:1-8.

Venkatesan T, Amar N. Genotoxic effects of anaesthetic agents. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50:636-7.

Weber D, Davies MJ, Grune T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol*. 2015;5:367-80.

Wrońska-Nofer T, Nofer JR, Jajte J, Dziubałtowska E, Szymczak W, Krajewski W, *et al.* Oxidative DNA damage and oxidative stress in subjects occupationally exposed to nitrous oxide (N₂O). *Mutat Res*. 2012;731:58-63.

Yalcin S, Aydoğan H, Yuce HH, Kucuk A, Karahan MA, Vural M, *et al.* Effects of sevoflurane and desflurane on oxidative stress during general anesthesia for elective cesarean section. *Wien Klin Wochenschr.* 2013;125:467-73.

Yin H. New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. *Biofactors.* 2008;34:109-24.

Young CJ, Apfelbaum JL. Inhalational anesthetics: desflurane and sevoflurane. *J Clin Anesth.* 1995;7:564-77.

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes?

Pesquisador: Flávia Ribeiro Nogueira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17889513.7.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Anestesiologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 363.695

Data da Relatoria: 16/08/2013

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 363.695

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO em reunião EXTRAORDINÁRIA do CEP em 19/08/2013, sem necessidade de envio à CONEP.

BOTUCATU, 19 de Agosto de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

ANEXO B

REGISTRO BRASILEIRO DE ENSAIOS CLÍNICOS

The screenshot displays the homepage of the Brazilian Clinical Trials Registry (RBR). At the top, there is a navigation bar with the logo of the Ministry of Health (Saúde) and the text "REGISTRO BRASILEIRO DE Ensaios Clínicos". A login section on the right includes fields for "USUÁRIO" (username) and "SENHA" (password), with a "ENTRAR" button and links for "Esqueceu a senha?" and "Registrar-se". Language options "PT | ES | EN" are also present.

Below the navigation bar, there are links for "NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO" and a search bar with a "Buscar ensaios" button and a link to "BUSCA AVANÇADA".

The main content area shows a breadcrumb trail: "HOME / ENSAIOS REGISTRADOS /". The featured clinical trial is titled "RBR-6jg23g" with the subtitle "A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes?". It includes the registration date "Data de registro: 8 de Nov. de 2013 às 14:29" and the last update date "Last Update: 13 de Set. de 2016 às 09:52".

Under the heading "Tipo do estudo:", there is a section for "Intervenções".

Under the heading "Titulo científico:", there are two boxes showing the title in different languages:

- PT-BR:** A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes?
- EN:** Does desflurane anesthesia associated or not with nitrous oxide induce genotoxicity and oxidative stress in patients?

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12- CNS-MS)

O(a) sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes?”, que pretende estudar se o anestésico desflurano (via inalatória) associado ou não ao óxido nitroso (via inalatória) que serão utilizados durante a cirurgia, têm algum efeito sobre o DNA - material genético (o componente que determina suas características individuais) presente nas células do sangue. Será avaliado se esses anestésicos podem causar danos diretamente na estrutura do DNA. Deve ser ressaltado que os anestésicos desflurano e óxido nitroso já são utilizados durante o procedimento cirúrgico não só no Brasil, mas em vários países no mundo.

O(a) sr(a) foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa por ter o estado físico classificado pela Sociedade Americana de Anestesiologistas como ASA I (indivíduos saudáveis, que não apresentam outra doença a não ser a condição cirúrgica). Serão adultos entre 18 e 50 anos, submetidos a cirurgia eletiva minimamente invasiva (septoplastia).

O questionário consta de algumas perguntas sobre vida pessoal (nome, data de nascimento, sexo, peso, altura, etc), algumas informações gerais (alimentação, exercício, exposição a substâncias tóxicas, uso de bebida alcoólica e cigarro e drogas ilícitas, etc) e história médica (uso de medicamentos e suplementos vitamínicos, doenças, etc). O questionário será aplicado pelo próprio pesquisador e não será gravado, e as respostas ao questionário terão duração de aproximadamente 15 minutos. O questionário é de caráter confidencial e será aplicado antes da realização da cirurgia. Sua identificação será preservada e somente os pesquisadores envolvidos no trabalho terão conhecimento de suas informações, com o comprometimento de mantê-las em sigilo. Na apresentação e publicação dos resultados da pesquisa não haverá identificação dos pacientes selecionados.

Desta forma, solicitamos seu consentimento para que sejam coletadas 3 amostras de 20 ml de sangue periférico: a primeira será realizada no momento imediatamente antes do início da cirurgia, a segunda durante a cirurgia e a terceira um dia após a cirurgia (pós-operatório). A quantidade de sangue que será coletada não afetará sua recuperação pós-cirúrgica, pois o volume a ser coletado é muito pequeno em relação ao volume total de sangue do seu organismo. A coleta será realizada por profissional experiente e o procedimento pode causar desconforto pela picada da agulha, mas com risco mínimo ou

quase inexistente, já que será utilizado material estéril e descartável. Ao participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a ação do anestésico desflurano associado ou não ao óxido nítrico no material genético. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

O projeto contribuirá para melhor entendimento do papel do anestésico inalatório óxido nítrico e do desflurano no material genético dos pacientes submetidos a anestesia.

Caso você não queira participar da pesquisa, isto não trará nenhum prejuízo no seu tratamento médico. Sempre que quiser, poderá pedir mais informações sobre a pesquisa por meio do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário, por meio do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa. Você poderá retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido total sigilo do seu nome, do questionário aplicado ou dos resultados dos testes em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo, e a outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, pelo telefone: (14) 3880-1608 / 1609.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome: _____ Assinatura: _____

Pesquisadora: Flávia Ribeiro Nogueira

Data: ____/____/____ Assinatura: _____

E-mail: flaviarnogueira@hotmail.com

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

E-mail: mgbraz@fmb.unesp.br

APÊNDICE B**QUESTIONÁRIO**

A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes?

Registro hospitalar do paciente:

Código do indivíduo no estudo:

Data: ____/____/____

I – Identificação

01-Nome:

02-Sexo: () masculino () feminino

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

04-Data de nascimento: ____/____/____

05-Idade (anos):

06-Peso (kg):

07-Altura (cm):

08-IMC (índice de massa corporal):

09-Origem (cidade):

10-Profissão:

II - Informações gerais

11-Considera sua alimentação saudável? () sim () não

Consome:

Alimento	Sim	Não	Frequência
Frutas			
Verduras e legumes			
Carboidratos			
Frituras			
Leite e derivados			
Carnes			
Açúcares e doces			

- 12- Quantos copos de água ingere por dia?
- 13-Faz exercícios regularmente? () sim () não
- 14-Se sim, qual tipo (musculação, caminhada, etc)?
- 15-Quantas vezes por semana?
- 16-Fuma? () sim () não
- 17-Se sim, há quanto tempo?
- 18-Quantos cigarros/dia?
- 19-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, etc)?:
- 20-Já fumou? () sim () não
- 21-Há quanto tempo deixou de fumar?
- 22-Quantos cigarros/dia fumava?
- 23-Durante quanto tempo fumou?
- 24-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, etc)?:
- 25-Consome bebida alcoólica? () sim () não
- 26-Se sim, quanto por semana (copos)?:
- 27-Tipo de bebida (cachaça, cerveja, uísque, vinho, etc)?
- 28-Já consumiu bebida alcoólica? () sim () não
- 29-Há quanto tempo deixou de beber?
- 30-Consome drogas? () sim () não Qual?
- 31-Há quanto tempo?
- 32-Tem contato com substâncias tóxicas? () sim () não
- 33-Se sim, qual (produtos de limpeza, agrotóxicos, gasolina, tinta)?
- 34-Há quanto tempo?

35-Foi submetido a raio X recentemente (dentário ou antes da cirurgia)?
() sim () não Quando?

36-Sabe quantas chapas de RX foram feitas?

37- Foi submetido a ressonância magnética nos últimos 30 dias?
() sim () não Quando?

38- Já fez tratamento com quimioterápico ou radioterapia? () sim () não

39-Se sim, qual?

40-Há quanto tempo?

41-Tem alguma doença (asma, hipertensão, diabetes, hepatite, lúpus, artrite, câncer)?
() sim () não

42-Qual?

43-Já teve alguma doença grave? () sim () não Qual?

44-Há quanto tempo?

45-Passou por algum estresse ultimamente? () sim () não Qual?

III - História Médica

46-É alérgico a algum tipo de medicamento? () sim () não

47-Se sim, qual?

48-Faz uso de algum tipo de medicamento (antibiótico, anti-inflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, corticóide, anti-convulsivante, insulina, hipoglicemiante)?
() sim () não

49-Se sim, qual (is)?

50-Frequência/dia:

51-Faz uso de vitamina/antioxidante (complexo vitamínico)? () sim () não

52-Se sim, qual (is)?

53-Frequência/dia:

54-Há quanto tempo?

55-Tomou alguma medicação no último mês (remédio para pressão, antibiótico, tranquilizantes, remédio para tirar a dor, antiácidos, anti-histamínicos, corticóides, anti-inflamatórios)?

() sim () não

56-Se sim, qual (is)?

57-Frequência/dia:

58-Há quanto tempo parou?

59- Teve alguma infecção ou inflamação no último mês? () sim () não

60- Se sim, qual (is)?

61- Há quanto tempo parou?

62- Está resfriado ou gripado? () sim () não

63-Já fez alguma cirurgia? () sim () não

64-Se sim, quantas?

65-Há quanto tempo foi a última?

66-Já foi submetido a anestesia? () sim () não

67-Se sim, sabe o tipo de anestesia (local, geral, raquídea, regional)?

68-Há quanto tempo?

69-Se sim, você sabe se é mais resistente ou sensível a algum anestésico?

APÊNDICE C

PROTOCOLO DA PESQUISA

A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes?

Data:

Número do paciente:

Anestesia (de acordo com o protocolo): () Desflurano

() Desflurano + Óxido nitroso

NOME:

RG DO HOSPITAL:

ASA:

SEXO:

IDADE:

ALTURA:

PESO:

NÚMERO DO LEITO HOSPITALAR:

TIPO DE CIRURGIA:

Participarão deste estudo pacientes com indicação de anestesia para septoplastia, com duração de, pelo menos, 90 minutos

Crítérios de Inclusão: pacientes ASA I, de ambos os sexos, entre 18-50 anos de idade e não fumantes

Crítérios de exclusão: recusa em participar, portadores de doença maligna ou genética, diabéticos, pacientes que receberam radiação recente, pacientes que fazem uso regular de álcool ou alguma medicação ou droga ilícita, fumantes e expostos a poluentes ambientais (ver questionário)

Aparelho de Anestesia: Primus (Dräger)

Monitorização: incluir também o BNM

Etiquetagem dos tubos de coleta:

Número do paciente (101, 102, 103,...), momento da amostra (M₀, M₁ ou M₂), data e nome dos responsáveis.

Após as duas coletas de sangue, avisar Flávia Nogueira (996167780 ou 3880-1632) para vir buscar os tubos de sangue. Colocar o protocolo preenchido de volta na pasta azul, que tem o título da pesquisa “A anestesia inalatória com desflurano associada ou não ao óxido nitroso é genotóxica e induz estresse oxidativo em pacientes?”, bem como o nome do Dr Braz. Qualquer dúvida conversar com o Dr Braz (99682 3026) ou Dr Leandro (99739 1712) ou Dra Mariana (99775 7936).

Após a punção venosa:

*** 1ª coleta de sangue venoso (20 ml):** primeiramente despejar os 8 ml nos 2 tubos com EDTA (tampa roxa - 4 ml/tubo) e homogeneizar lentamente 5x. Depois despejar 12 ml em 3 tubos com gel separador (tampa amarela - 4 ml/tubo) e, por último, despejar exatamente 2,5 ml no outro tubo com estabilizador de RNA (tampa vermelha-PAXgene - até a marcação!), e homogeneizar, lentamente, o tubo por 10x. Marcar a hora da coleta e colocar os tubos no isopor (na estante, em cima do gelinho) e tampá-lo. Avisar a Flávia Nogueira (telefone acima).

Após a coleta de sangue:

MPA: midazolam (3 mg) IV

Hidratação: RL – 4 ml/kg/h

GRUPO DESFLURANO

Indução:

propofol: 2 mg/kg

fentanil: 5 µg/kg (indução) e manutenção com doses adicionais (s/n) de 1 a 2 µg/kg

rocurônio: 0,6 mg/kg (indução) e manutenção com 0,2 mg/kg (s/n) – de acordo com o BNM

Manutenção:

fentanil: 1 a 2 µg/kg s/n

rocurônio: 0,2 mg/kg s/n (de acordo com o BNM)

desflurano: 1 CAM (6%) inicialmente e alterando de acordo com a necessidade do paciente

Fluxo de gases frescos: 2 L/min, fixando 40% de O₂ - **NÃO USAR N₂O!**

VC: 8 ml/kg **P_{ET}CO₂:** 30-35 mm Hg

GRUPO DESFLURANO + ÓXIDO NITROSO

Indução:

propofol: 2 mg/kg

fentanil: 5 µg/kg

brometo de rocurônio: 0,6 mg/kg

Manutenção:

fentanil: 1 a 2 µg/kg s/n

rocurônio: 0,2 mg/kg s/n (de acordo com o BNM)

desflurano: 1 CAM (6%) inicialmente e alterando de acordo com a necessidade do paciente

Fluxo de gases frescos: 2 L/min, fixando 40% de O₂ e 60% de N₂O

VC: 8 ml/kg **P_{ET}CO₂:** 30-35 mm Hg

Após 90 min do início da indução anestésica, puncionar veia em membro oposto ao da infusão de líquidos e realizar:

*** 2ª coleta de sangue venoso (20 ml):** primeiramente despejar os 8 ml nos 2 tubos com EDTA (tampa roxa - 4 ml/tubo) e homogeneizar lentamente 5x. Depois despejar 12 ml em 3 tubos com gel separador (tampa amarela - 4 ml/tubo) e, por último, despejar exatamente 2,5 ml no outro tubo com estabilizador de RNA (tampa vermelha-PAXgene - até a marcação!), e homogeneizar, lentamente, o tubo por 10x. Marcar a hora da coleta e colocar os tubos no isopor (na estante, em cima do gelinho) e tampá-lo. Avisar a Flávia Nogueira (telefone acima).

Final da cirurgia:

Analgesia pós-operatória: tramadol (100 mg) e dipirona (1 g) IV

Antiemético: ondansetrom (8 mg) IV

Descurarização: sugamadex (2 a 4 mg/kg), se houver necessidade, de acordo com a resposta ao BNM

Início da anestesia:-----

Início da cirurgia:-----

Fim da anestesia:-----

Fim da cirurgia:-----

Duração (min) da anestesia:-----

Duração (min) da cirurgia: -----

Dose total de propofol (mg):-----

Dose total de sugamadex (mg) -----

Dose total de fentanil (µg):-----

Dose total de rocurônio (mg):-----

Medicações no pré-operatório (fármaco e dose):

Medicações no intraoperatório (fármaco e dose):

*** 3ª coleta de sangue venoso (20 ml) - DIA SEGUINTE À CIRURGIA, DE MANHÃ:** primeiramente despejar os 8 ml nos 2 tubos com EDTA (tampa roxa - 4 ml/tubo) e homogeneizar lentamente 5x. Depois despejar 12 ml em 3 tubos com gel separador (tampa amarela - 4 ml/tubo) e, por último, despejar exatamente 2,5 ml no outro tubo com estabilizador de RNA (tampa vermelha-PAXgene - até a marcação!), e

