



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

Kátina Meneghetti de Souza

**Avaliação de danos no material genético em
anestesiologistas**

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Mariana Gobbo Braz

Co-orientador: Prof. Dr Leandro Gobbo Braz

Botucatu

2016

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

Kátina Meneghetti de Souza

**Avaliação de danos no material genético em
anestesiologistas**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Gobbo Braz

Co-orientador: Prof. Dr Leandro Gobbo Braz

Botucatu

2016

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

Souza, Kátina Meneghetti de.

Avaliação de danos no material genético em
anestesiologistas / Kátina Meneghetti de Souza. -
Botucatu, 2016

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

Orientador: Mariana Gobbo Braz

Coorientador: Leandro Gobbo Braz

Capes: 20206003

1. Exposição ocupacional. 2. Anestesistas. 3. Poluição.
4. Anestésicos. 5. Gases - Aspectos ambientais. 6. Ensaio
cometa. 7. Ensaio para Micronúcleos.

Palavras-chave: Anestésicos inalatórios; Exposição
ocupacional; Poluição ambiental; Teste de genotoxicidade.

Kátina Meneghetti de Souza

AVALIAÇÃO DE DANOS NO MATERIAL GENÉTICO EM
ANESTESIOLOGISTAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre

Presidente e Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Gobbo Braz
Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr João Paulo de Castro Marcondes
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Dr José Eduardo Bagnara Orosz
Pontifícia Universidade Católica de Campinas PUC

Botucatu, 26 de fevereiro de 2016, às 14horas.

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus que é o meu fôlego de vida.

Ao meu amado esposo, Eduardo, principal intercessor, exemplo de esforço, honra, lealdade, motivo da minha persistência, que mesmo ciente da minha ausência não mediu esforços nem palavras de incentivo para a execução e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, fontes inesgotáveis de amor, cujos valores são pautados nas sagradas escrituras, por incentivarem meu desenvolvimento como um ser humano e profissional melhor, seus exemplos são perfeitos cursores para uma vida de caráter impecável.

Agradecimento Especial

Doutora Mariana Gobbo Braz

Minha orientadora. Definição em poucas palavras: esmero, ética e paixão pelo trabalho.

Porque cada árvore se conhece pelo seu próprio fruto.

Lucas 6:44a

Agradecimento Especial

Ao Professor Assistente Doutor Leandro Gobbo Braz

O homem bom do bem tesouro do coração tira o bem.

Lucas 6:45a

Agradecimentos

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram mesmo sabendo que isso significaria minha ausência muitas vezes prolongada.

À Daniele Garcia Costa pelo apoio incondicional, amor de irmã, paciência nos momentos difíceis e todas as preciosas orações.

Às minhas amigas mais que irmãs, Simone Aparecida Soares Cavallari, Alexandra Ribeiro Leite e Susana Assoni Fracalossi, por todo incentivo, parceria, consolo, presença de espírito mesmo há quilômetros de distância, incansáveis orações e compreensão por minhas ausências. “O homem de muitos amigos deve mostrar-se amigável, mas há um amigo mais chegado que irmão”. Provérbios 18:24.

Às minhas amigas intercessoras que me abençoaram com suas constantes orações, certamente elas fizeram toda diferença para a conclusão deste trabalho.

À Michelle Catarina Pires por ter sido um valioso instrumento nas mãos de Deus para meu ingresso no Mestrado.

À Flávia e família Ribeiro Nogueira, parceiras de oração que muito me abençoaram nos últimos três anos e me ensinaram o que de fato é combater o bom combate, Deus foi muito generoso comigo.

Agradeço a todos que trabalharam para a realização deste trabalho, especialmente a equipe do Laboratório Genotox da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

À Luciana Maria Feliciano e Raphael Franco de Toledo por dividirem seus conhecimentos em análise microscópica e favorecerem a análise correta de biomarcadores de instabilidade genômica apresentados neste estudo.

Ao Dr João Paulo de Castro Marcondes pela ajuda técnica e por sempre se disponibilizar para o debate de ideias e esclarecimento de inúmeras dúvidas.

À toda equipe do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica (Omics) por possibilitarem a execução de análises em tempo integral quando necessário e toda ajuda desprendida.

À Vickeline Namba, Ana Paula Doria, José Lucas de Carvalho e Dr^a Lorena Mendes de Carvalho Lucio (UNESP) pela ajuda técnica e esclarecimento de dúvidas.

À Dr^a Elaine Keiko, Eduardo Jodi Kuninari e Cristina Maria Teixeira Fortes por promoverem meu acesso aos médicos do Hospital das Clínicas de Botucatu.

Ao Dr José Reinaldo Cerqueira Braz por acreditar na contribuição multidisciplinar no processo científico, que possibilitou o ingresso de diferentes profissionais da área da saúde no Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e por nos contagiar com seu amor pela pesquisa.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) pelo empenho na formação de melhores profissionais.

À secretária Tatiane de Fátima Pineiz Biondo, pela disponibilidade, paciência e orientações precisas nos processos inerentes ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

À Joana Jacirene Costa Teixeira, à Sônia Maria Martins e Silva e à Neli Aparecida Pavan, funcionárias da secretaria do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e ao André Renato Passaroni, funcionário do serviço de computação do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), por não medirem esforços em auxiliar os alunos do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia e favorecerem o desenvolvimento de pesquisas com qualidade.

Ao Prof. Adj. Dr José Eduardo Corrente e Prof^a Dr^a Lídia Raquel de Carvalho do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), pela excelência nas instruções e auxílio na execução do melhor processo de análises estatísticas.

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) pela bolsa de estudos.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2013/05084-8) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (processo nº 471604/2013-5), além da Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP (Edital Primeiros Projetos -12/2015-PROPe) pela concessão de auxílios financeiros que viabilizaram a execução deste trabalho.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria”

Provérbios 1:7a

Resumo

Souza KM. Avaliação de danos no material genético em anesthesiologists [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2016. 71 f.

A carência e a divergência de dados sobre o potencial genotóxico e mutagênico da exposição ocupacional aos anestésicos inalatórios mais modernos e mais utilizados atualmente estimularam a realização da presente pesquisa, que teve como objetivos avaliar os danos sistêmicos no DNA e os diferentes tipos celulares e biomarcadores de instabilidade genômica em células esfoliadas da mucosa oral em anesthesiologists. O estudo foi realizado em 60 médicos que atuavam no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, os quais foram alocados em dois grupos: exposto, constituído por anesthesiologists expostos aos resíduos de gases anestésicos (isoflurano, sevoflurano, desflurano e óxido nitroso – N_2O) por pelo menos dois anos e controle, constituído por médicos não expostos ocupacionalmente, os quais foram pareados por idade, sexo e estilo de vida com o grupo exposto. Amostras de sangue e de células esfoliadas orais foram coletadas de todos os participantes; os danos basais no DNA foram avaliados em linfócitos periféricos pelo teste do cometa e o teste do micronúcleo (MN) bucal foi utilizado para avaliação de diferentes parâmetros em células esfoliadas orais. As concentrações de N_2O e dos halogenados foram mensuradas nas salas de operação com a utilização de espectrofotômetro infravermelho portátil. As concentrações médias de resíduos de gases anestésicos para todos os halogenados foi maior que 5 partes por milhão (ppm) e superior a 150 ppm para o N_2O . Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos danos no DNA e não houve influência da idade, sexo e tempo de exposição no teste do cometa. O grupo exposto apresentou maiores frequências de MN e de dois parâmetros de morte celular (cariorrexe e picnose), e menor frequência de células basais quando comparados com o grupo controle. As anesthesiologists foram mais sensíveis às alterações citotóxicas decorrentes da exposição ocupacional. Em conclusão, a exposição aos resíduos dos gases anestésicos determinou instabilidade genômica e citotoxicidade, detectadas pelo MN bucal, mas não induziu danos sistêmicos no DNA, avaliados pelo teste do cometa, em anesthesiologists. Assim, esses profissionais podem ser considerados em risco de apresentarem alterações genéticas decorrentes de exposição ocupacional.

Palavras-chave: exposição ocupacional, anestésicos inalatórios, poluição ambiental, testes de genotoxicidade

Abstract

Souza KM. Evaluation of DNA damage in anesthesiologists [thesis]. Botucatu: Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista; 2016. 71 f.

Due to the lack and controversial data on the genotoxic and mutagenic potential of occupational exposure to the modern and most used inhaled anesthetics, the aim of the current study was to evaluate the systemic DNA damage, and the different cell types and genomic instability biomarkers in buccal exfoliated cells in anesthesiologists. The study was conducted in 60 physicians who worked in the Hospital of Botucatu Medical School - UNESP, and were allocated in two groups: the exposed group, consisted of anesthesiologists exposed to waste anesthetic gases (isoflurane, sevoflurane, desflurane and nitrous oxide - N₂O) at least two years, and the control group consisted of non-exposed physicians, who were matched by age, sex and lifestyle with the exposed group. Venous blood and buccal exfoliated cells samples were collected from all participants; basal DNA damage was evaluated in peripheral lymphocytes by the comet assay, and the buccal micronucleus (MN) cytome (BMCyt) assay was used to evaluate different parameters in oral cells. The concentrations of N₂O and halogenated anesthetics were measured in the operating rooms, by using of portable infrared spectrophotometer. The average concentrations of waste gases were greater than 5 parts per million (ppm) for all the halogenated anesthetics and more than 150 ppm for N₂O. There was no significant difference between the groups in relation to DNA damage and there was no influence of the variables age, sex and time of exposure in the comet assay. The exposed group showed higher frequencies of MN and two cell death parameters (karyorrhexis and pyknosis), and lower frequency of basal cells compared to the control group. The female anesthesiologists were more sensitive to cytotoxic effects due to the occupational exposure. In conclusion, the exposure to waste anesthetic gases determined genomic instability and cytotoxicity detected by BMCyt assay, but did not induce systemic DNA damage assessed by the comet assay in anesthesiologists. Thus, these professionals can be considered at risk of presenting genetic alterations resulting from the occupational exposure.

Keywords: occupational exposure, anesthetic gases, environmental pollution, genotoxicity test

Lista de Ilustrações

Figura 1	Representação do teste do cometa alcalino (Tice <i>et al.</i> , 2000).....	19
Figura 2	Esquema da cavidade oral com diferenciação dos tipos celulares (normais e mortes) e biomarcadores de instabilidade genômica detectados pelo método teste do micronúcleo bucal <i>BM</i> Cyt (Thomas <i>et al.</i> , 2009).....	21
Figura 3	Fórmula do <i>TWA</i> (Schiewe-Langgartner <i>et al.</i> , 2005).....	29

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados demográficos ($X \pm DP$ ou número absoluto - %).	31
Tabela 2	Danos no DNA detectados em linfócitos periféricos pelo teste do cometa e frequência da população de células normais e anormais e de biomarcadores de instabilidade genômica detectados pelo teste do micronúcleo bucal – <i>BM Cyt</i> ($X \pm DP$).	32
Tabela 3	Danos no DNA detectados pelo teste do cometa de acordo com idade, tempo de exposição e sexo.	33
Tabela 4	Frequência de micronúcleos em células esfoliadas orais em ambos os grupos de acordo com idade, tempo de exposição e sexo.	34
Tabela 5	Frequência de brotos nucleares e de células binucleadas e basais identificadas e quantificadas pelo teste <i>BM Cyt</i> nos dois grupos, conforme o sexo.	35
Tabela 6	Frequência de mortes celulares em células esfoliadas orais nos grupos estudados de acordo com o sexo.	36
Tabela 7	Concentração de anestésicos halogenados e de N_2O (ppm) nas salas de operação ($X \pm DP$ e valores mínimo e máximo; valor do <i>TWA</i> para N_2O).	37

Sumário

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	vi
Epígrafe.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
Lista de Ilustrações.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	15
<i>Gases e anestésicos inalatórios.....</i>	<i>15</i>
<i>Exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos.....</i>	<i>16</i>
<i>Testes para avaliação de biomonitoramento humano.....</i>	<i>18</i>
<i>Resíduos de gases anestésicos e danos no material genético.....</i>	<i>21</i>
2 OBJETIVO.....	24
3 MÉTODO.....	25
3.1 Ética e registro.....	25
3.2 Casuística.....	25
3.3 Coleta de amostras biológicas.....	26
3.4 Teste do cometa.....	26
3.5 Teste do micronúcleo bucal (BMCyt).....	28
3.6 Mensuração dos resíduos de gases anestésicos em salas de operação.....	29
3.7 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS.....	31
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO.....	44
7 REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	53
ANEXO B - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos.....	56
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).....	57
APÊNDICE B – Questionário.....	59

1 INTRODUÇÃO

Gases e anestésicos inalatórios

Historicamente, 16 de outubro de 1846 é considerada a data em que se realizou a primeira intervenção cirúrgica sob anestesia, utilizando-se éter (Rezende, 2009). Algum tempo depois, o clorofórmio também passou a ser utilizado, mas antes disso o óxido nitroso (N_2O) já havia sido descoberto, porém seu primeiro uso foi como droga de abuso e ficou conhecido como gás hilariante ou gás do riso (Boros, 2003) e, como anestésico, foi utilizado pela primeira vez em 1884 (Smith, 2010).

O N_2O é um composto inorgânico com apresentação gasosa, inodoro, de estrutura simples e linear, com estabilidade química em temperatura e pressão ambiente. Possui algumas vantagens de utilização, dentre elas a aceleração do tempo de indução anestésica e o despertar quando associado a outros anestésicos inalatórios, além de reduzir a concentração alveolar mínima (CAM) desses anestésicos e a quantidade necessária a ser administrada, o que favorece a redução de custos em anestesia (Duarte *et al.*, 2012).

Outras substâncias passaram a ser testadas devido aos efeitos maléficos como intensa hipotensão, batimentos cardíacos anormais e fibrilação ventricular, causados por anestésicos mais antigos, como éter e clorofórmio (Raventós, 1956). Dentre esses agentes estão os derivados halogenados (compostos orgânicos obtidos pela substituição de pelo menos um átomo de hidrogênio de um hidrocarboneto por átomo de halogênio, como flúor, cloro, bromo ou iodo) como o tricloroetileno (C_2HCl_3), metoxiflurano ($C_3H_4Cl_2F_2O$), halotano ($C_2HBrClF_3$) e enflurano ($C_3H_2ClF_5O$).

Os anestésicos inalatórios modernos mais utilizados atualmente são os halogenados isoflurano ($C_3H_2ClF_5O$), sevoflurano ($C_4H_3F_7O$) e desflurano ($C_3H_2F_6O$). Com base nos efeitos clínicos, acredita-se que os anestésicos halogenados mais novos atuem sobre as sinapses, interferindo na memória e no estado de alerta, no entanto, o mecanismo real ainda não é explicado de forma clara e objetiva (Saraiva, 2002). Dentre algumas vantagens da utilização dos anestésicos halogenados mais modernos estão a indução e recuperação anestésica mais rápidas, os baixos coeficientes de partição sangue/gás e o baixo custo (Young & Apfelbaum, 1995; Wolverson *et al.*, 1998).

A metabolização dos anestésicos halogenados é via citocromo P450, pela CYP2E1 (Kharasch & Thummel, 1993) e a taxa de metabolização é em torno de 5% para o

sevoflurano, 0,2% para o isoflurano e 0,02% para o desflurano (Souza & Tardelli, 2011). Em relação ao N₂O, este gás não é metabolizado e é rapidamente eliminado em forma inalterada pelos pulmões.

Embora a taxa de metabolização dos anestésicos halogenados mais modernos seja baixa, um estudo mostrou que o hexafluoroisopropanol, o qual é um metabólito do sevoflurano, foi encontrado na urina de profissionais expostos a baixas concentrações desse anestésico (Scapellato *et al.*, 2014). Pouco se tem estudado sobre marcadores específicos da metabolização ou toxicidade dos anestésicos inalatórios em profissionais ocupacionalmente expostos.

Exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos

A exposição ocupacional ao N₂O e aos anestésicos halogenados em profissionais que atuam em centro cirúrgico (anestesiologistas, cirurgiões, enfermeiros, auxiliares e técnicos), consultórios odontológicos (dentistas e auxiliares técnicos) e laboratórios de pesquisa que realizam experimentos com anestésicos inalatórios (pesquisadores, técnicos, alunos de graduação e de pós-graduação) pode resultar em efeitos adversos à saúde. Embora esses profissionais estejam expostos à concentração anestésica muito menor que a dos pacientes, essa exposição pode ser crônica.

Alterações neurocomportamentais já foram observadas em profissionais expostos aos anestésicos inalatórios (Lucchini *et al.*, 1996). O N₂O, embora seja rapidamente eliminado do organismo, por apresentar baixa solubilidade sanguínea e tecidual, pode ocasionar, em profissionais expostos, alterações hematopoiéticas (Sweeney *et al.*, 1985) e inativação da cianocobalamina (vitamina B12) (Krajewski *et al.*, 2007). A exposição crônica aos resíduos de gases anestésicos também é considerada fator de risco ao processo reprodutivo, com aumento na incidência de abortos (Rowland *et al.*, 1995; Boivin, 1997; Moppett, 2015), da redução da fertilidade (Ahlborg *et al.*, 1996) e de defeitos congênitos, especialmente relacionados ao N₂O (Bodin *et al.*, 1999).

Sabe-se que as salas de operação são responsáveis por 30% dos resíduos hospitalares. Além disso, os resíduos de gases anestésicos possuem efeitos adversos ao meio ambiente, com danos à camada de ozônio, contribuindo para o efeito estufa (Irwin *et al.*, 2009). O N₂O e o desflurano possuem meia vida na atmosfera de 114 e 14 anos, respectivamente, com potencial de contribuição para o aquecimento global, enquanto o

isoflurano e o sevoflurano apresentam meia vida menores, de 3,2 e 1,1 anos, respectivamente (Sulbaek Andersen *et al.*, 2012).

Certamente, a exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos depende dos métodos e organização do ambiente de trabalho, como a utilização ou não de anestésicos inalatórios e das concentrações empregadas, do tipo de anestésico utilizado, do sistema respiratório empregado, o uso de menores ou maiores fluxos de gases frescos (FGF) que propiciam, respectivamente, menor ou maior escape de gases anestésicos do circuito respiratório, da existência de sistema de exaustão e renovação de ar da sala de operação, da presença direta do profissional junto ao paciente e/ou ao circuito respiratório, de máscaras faciais mal adaptadas no paciente, do uso de tubos traqueais com ou sem balonetes, entre outros (Wiesner *et al.*, 2001a; Oliveira, 2009).

Mesmo com a utilização de sistema de exaustão de ar ambiente nos hospitais mais modernos, os profissionais que atuam em centros cirúrgicos ainda são expostos às concentrações residuais de N₂O e anestésicos halogenados, particularmente durante as anestесias pediátricas (Byhahn *et al.*, 2001). A evolução da anestesiologia possibilitou a utilização de aparelhos de anestesia com baixo FGF e com sistema de exaustão para resíduos de gases anestésicos e à monitorização da concentração dos anestésicos inalatórios. Entretanto, o assunto é ainda bastante relevante, pois a utilização desses modernos aparelhos de anestesia ainda não é universal nos hospitais do Brasil.

Para minimizar os riscos à saúde, as autoridades públicas recomendam valores limites aos resíduos de gases anestésicos. Os limites de exposição recomendados pelo *National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH, 1977)* dos EUA são de 2 partes por milhão (ppm) para os anestésicos halogenados e 25 ppm para o N₂O para uma média ponderada de tempo (*time-weighted average - TWA*). No entanto, os limites recomendados diferem para cada país e na Alemanha, por exemplo, o valor recomendado para os halogenados difere para cada anestésico e para o N₂O é de 100 ppm na média diária de trabalho (8 h/dia *TWA*) (Hoerauf *et al.*, 1996). Por outro lado, não existem valores limites para exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos no Brasil e nem recomendações a respeito de como proceder à monitoração ambiental ou sua periodicidade (Oliveira, 2009).

Testes para avaliação de biomonitoramento humano

O biomonitoramento humano tem sido empregado como instrumento útil na identificação e quantificação de riscos relacionados às exposições que conferem prejuízo à saúde (Chinelato & Froes, 2002).

Existem várias metodologias que avaliam os danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), desde lesões primárias até lesões fixadas. O teste do cometa ou eletroforese em gel de células individualizadas (*single-cell gel electrophoresis assay - SCGE*) é um ensaio de genotoxicidade que detecta quebras de fita simples e dupla do DNA, sítios álcali-lábeis e lesões oxidativas específicas (Tice *et al.*, 2000). Esta técnica consiste na imersão de células eucarióticas em gel de agarose, lise da membrana celular por detergentes e sais alcalinos e posterior eletroforese (Singh *et al.*, 1988). Sob condições alcalinas de eletroforese, as células com danos no DNA apresentam maior taxa de migração da molécula em direção ao ânodo, imitando a aparência de um cometa (cabeça e cauda) (Figura 1). Portanto, o teste do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, as quais são passíveis de reparo. Enquanto outras técnicas de biomonitoramento genético são limitadas para aplicação em linfócitos circulantes ou células em proliferação, o teste do cometa pode ser utilizado para quaisquer tipos de células nucleadas, sendo necessário apenas um pequeno número delas, as quais não precisam estar em divisão (Kassie *et al.*, 2000). Além disso, é uma técnica relativamente rápida, simples, sensível e de baixo custo.

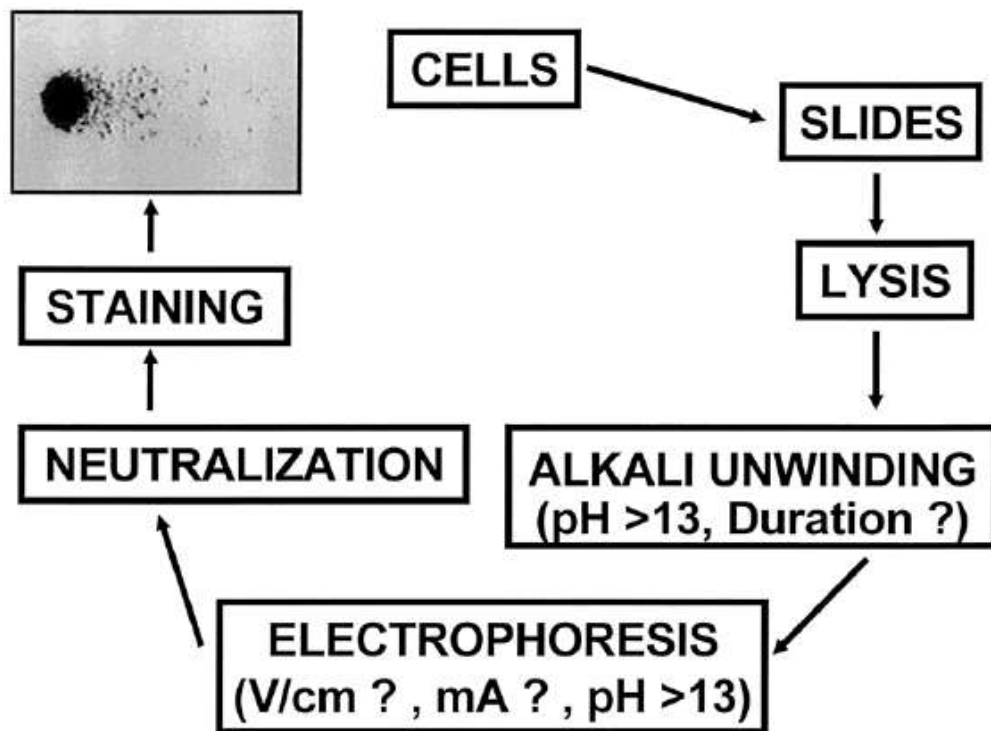


Figura 1. Representação do teste do cometa alcalino (Tice *et al.*, 2000).

Comparado a outros testes citogenéticos, o teste do micronúcleo (MN) apresenta vantagens como rapidez e fácil análise (Fenech, 1993; Tucker & Preston, 1996). Trata-se de ensaio de mutagenicidade já estabelecido que detecta o potencial mutagênico de vários agentes, entre eles os agentes físicos e químicos. Os MNs são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas, sendo resultantes dos fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o MN representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou de dano no aparelho mitótico. O MN constitui-se, portanto, de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal (Salvadori *et al.*, 2003).

A técnica do MN foi inicialmente descrita na década de 1970 para rastrear, principalmente, produtos químicos com potencial de quebra cromossômica (Schmid, 1975). Posteriormente, iniciou-se a técnica de MN *in vitro* e foi descoberto que, com a utilização de determinadas substâncias durante o cultivo celular, era possível bloquear a citocinese, fornecendo mais parâmetros de genotoxicidade e citotoxicidade como avaliação de quebras cromossômicas, perda de cromossomos, rearranjo cromossômico (pontes nucleoplásmicas), inibição da divisão celular, necrose e apoptose (Fenech, 2000). Atualmente, a principal

metodologia utilizada para verificação de instabilidade genômica em seres humanos é a do MN, o qual pode ser detectado tanto em linfócitos periféricos como em células esfoliadas. Inclusive já se verificou uma correlação positiva entre a frequência de MNs em linfócitos e células esfoliadas da mucosa bucal (Ceppi *et al.*, 2010).

O teste do MN em células epiteliais bucais, conhecido como *the buccal micronucleus cytome (BMCyt) assay* (Thomas *et al.*, 2009), é um ensaio cuja utilização para o biomonitoramento de alterações genéticas em seres humanos têm crescido, uma vez que apresenta algumas vantagens por ser minimamente invasivo e de rápido preparo, sem necessidade de cultivo celular (Bonassi *et al.*, 2011). Ressalta-se que o ensaio *BMCyt* é bastante versátil, pois podem ser feitas análises de avaliação de danos no DNA, proliferação celular, diferenciação celular e morte celular (Bolognesi *et al.*, 2015) (Figura 2).

Além disso, a mucosa oral é a primeira barreira contra substâncias que podem entrar no organismo pela via respiratória na forma de gases e vapores. Assim como a pele, a mucosa oral se renova de forma descamativa. Há uma variação no tempo de renovação entre todos os tecidos orais; o tecido de renovação mais rápido é o epitélio juncional (de quatro a seis dias) e o que se renova mais lentamente é o palato duro (24 dias). Já a bochecha e região interna dos lábios, os quais são utilizados para coleta das células utilizadas no teste do micronúcleo bucal *BMCyt*, possuem período de renovação em torno de 14 dias (Bath-Balogh & Fehrenbach, 2012).

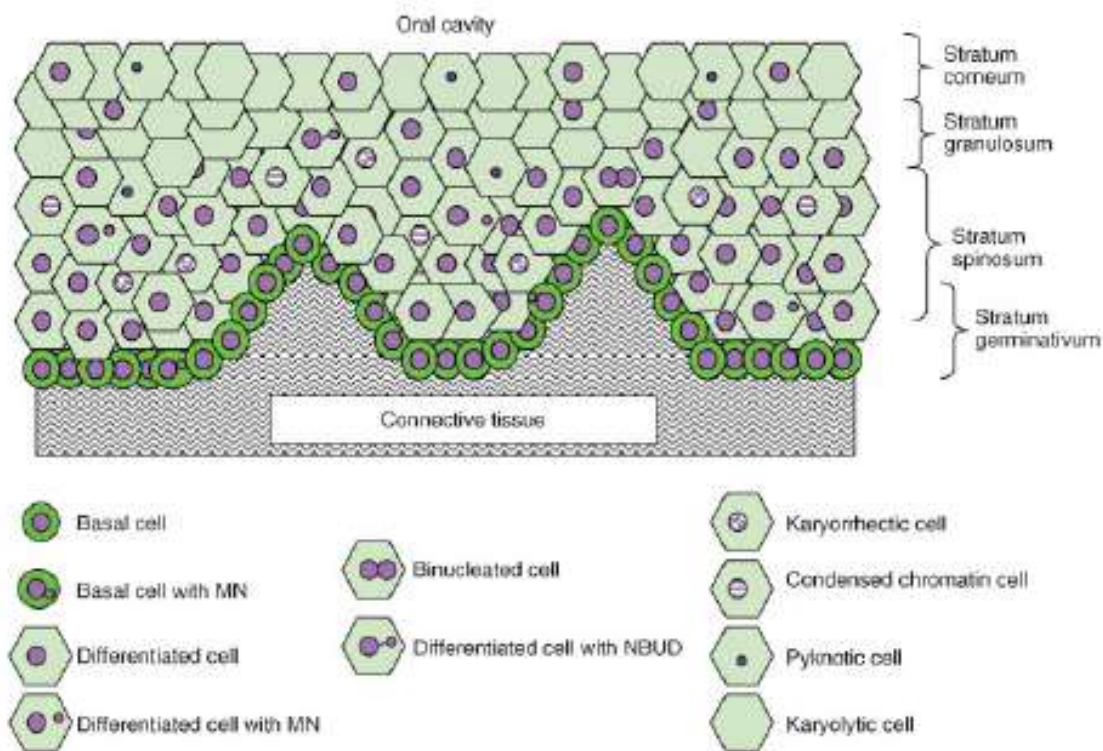


Figura 2. Esquema da cavidade oral com diferenciação dos tipos celulares (normais e mortos) e biomarcadores de instabilidade genômica detectados pelo método teste do micronúcleo bucal BMCyt (Thomas *et al.*, 2009).

Resíduos de gases anestésicos e danos no material genético

Vários estudos têm identificado, em profissionais que trabalham em hospital (exposição ocupacional), aumento de danos no material genético, especialmente os que trabalham em centro cirúrgico, os que trabalham com radiação ionizante e os que manipulam reagentes tóxicos e drogas antineoplásicas (Bonassi *et al.*, 1997; Lewinska *et al.*, 2005; Baysal *et al.*, 2009; Ladeira *et al.*, 2011; Mahboob *et al.*, 2012; Sakly *et al.*, 2012).

Ainda são escassos os dados sobre genotoxicidade e mutagenicidade dos anestésicos em profissionais ocupacionalmente expostos no Brasil. Chinelato & Froes (2002) avaliaram 11 anestesiológistas expostos predominantemente ao halotano, com tempo de exposição superior a cinco anos e verificaram aumento na frequência de aberrações cromossômicas (AC), mas não de trocas entre cromátides irmãs (TCI). Já Araujo *et al.* (2013) avaliaram os efeitos citotóxico e mutagênico utilizando o teste do MN em linfócitos periféricos de profissionais expostos a vários anestésicos (halotano, enflurano, isoflurano,

sevoflurano, N₂O, entre outros) e verificaram que o índice proliferativo não diferiu entre grupo exposto e controle, no entanto, a frequência de MN foi maior no grupo exposto. Em outro trabalho, Costa Paes *et al.* (2014) avaliaram médicos residentes (áreas de anestesiologia e cirurgia) expostos ocupacionalmente aos resíduos de isoflurano e também de sevoflurano e N₂O e foi observado aumento significativo de danos no DNA no grupo exposto quando comparado com o grupo controle. Nenhuma dessas pesquisas determinou a concentração dos resíduos de gases anestésicos em salas de operação.

Trabalho realizado na Turquia mostrou aumento significativo de quebras no DNA em anestesiológicos, enfermeiros e técnicos expostos por período de um a 17 anos aos resíduos de gases anestésicos halotano, isoflurano e N₂O (Sardas *et al.*, 1998). Aumento de danos no material genético, detectados pelo teste do cometa, também foi verificado em anestesiológicos, cirurgiões, enfermeiras e técnicos expostos, em média de 19 anos, ao halotano, isoflurano, sevoflurano e N₂O no Egito (El-Ebiary *et al.*, 2013).

Na revisão de literatura ao nosso alcance, apenas um estudo avaliou a frequência de MN em mucosa oral em profissionais expostos a vários resíduos de gases anestésicos (Chandrasekhar *et al.*, 2006). Por outro lado, nenhum estudo avaliou, até o momento, os tipos de células e outras alterações nucleares detectados pelo *BMCyt* após exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos.

Deve-se destacar que os estudos citados anteriormente avaliaram profissionais expostos a vários anestésicos incluindo alguns halogenados mais antigos, os quais têm maior toxicidade, como o halotano e o enflurano. Chinelato & Froes (2002) sugerem que o halotano possa atuar de forma semelhante aos fármacos radiomiméticos, os quais induzem danos no genoma em qualquer fase do ciclo celular. Adicionalmente, nos trabalhos citados anteriormente, também não foram determinados os valores de resíduos de gases anestésicos nas salas de operação e há pouco relato sobre sistema de exaustão do ar no centro cirúrgico.

Estudo realizado em salas de operação com sistema de exaustão mostrou aumento na formação de MN em linfócitos periféricos especialmente em enfermeiros e anestesiológicos expostos aos resíduos de isoflurano, sevoflurano e N₂O (Rozgaj *et al.*, 2009). Já o estudo realizado por Wiesner *et al.* (2001b) não observou aumento na frequência de MNs em linfócitos de profissionais expostos às concentrações de N₂O (em torno de 12 ppm) e para os anestésicos isoflurano, sevoflurano e desflurano (< 0,5 ppm) em hospital universitário da Alemanha, o qual possuía sistema ativo de exaustão nas salas de operação. Entretanto, os autores observaram aumento significativo de MNs em profissionais atuantes em hospital universitário do Leste Europeu, o qual era isento de sistema de exaustão de

gases. Esses profissionais eram expostos às concentrações elevadas de N₂O (170 ppm) e de anestésicos halotano e isoflurano (4 ppm), quando comparados aos respectivos controles.

Por outro lado, estudo realizado na Alemanha verificou que profissionais expostos diariamente por 8 h-TWA a 11,8 ppm de N₂O e 0,5 ppm de isoflurano apresentaram aumento de TCI, mesmo não sendo expostos a altas concentrações dos resíduos anestésicos (Hoerauf *et al.*, 1999). De maneira similar, anestesiológicos expostos por oito horas diárias a baixas concentrações de resíduos do anestésico halogenado sevoflurano (0,2 ppm) sem exposição ao N₂O, tiveram frequência aumentada de TCI, mas não de MNs em linfócitos de sangue periférico (Wiesner *et al.*, 2008).

Estudo realizado em enfermeiras e anestesiológicos ocupacionalmente expostos, em diversos hospitais com diferentes sistemas de exaustão de resíduos de gases anestésicos, mostrou correlação positiva entre danos no DNA e valores de concentração de N₂O acima do limite de exposição ocupacional recomendado na Polônia, diferentemente do que ocorreu com os anestésicos isoflurano e sevoflurano, cujas concentrações estavam abaixo do limite recomendado (Wrońska-Nofer *et al.*, 2009).

Assim, a carência e a divergência de dados sobre o potencial genotóxico e mutagênico da exposição ocupacional aos anestésicos inalatórios mais modernos e mais utilizados atualmente, juntamente com a ausência de dados, na literatura nacional, quanto à determinação dos valores de resíduos de gases anestésicos em salas de operação, estimularam a realização do presente estudo.

2 OBJETIVO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar os danos sistêmicos no DNA e o potencial proliferativo celular, os diferentes parâmetros de mortes celulares e os biomarcadores de instabilidade genômica em células esfoliadas da mucosa oral em anesthesiologistas.

3 MÉTODO

3.1 Ética e registro

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, após aprovação do Comitê de Ética local (n. 417.865; Anexo A). O estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (RBR-4vrz2m; Anexo B).

3.2 Casuística

O estudo foi realizado em 60 profissionais atuantes no HC da FMB - UNESP, de acordo (ou não) com a exposição ocupacional aos anestésicos halogenados (isoflurano, sevoflurano e desflurano) e ao N₂O. O grupo exposto foi composto por 30 anestesiológicos expostos por pelo menos dois anos. O grupo controle foi constituído por 30 médicos da clínica médica, os quais foram pareados por idade, sexo e estilo de vida com o grupo exposto. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice A) e responderam a um questionário detalhado (Apêndice B) sobre dados demográficos (idade, sexo, índice de massa corporal - IMC, etc.), histórico médico (vacinação, medicamentos, doenças, etc.), estilo de vida (dieta, exercício físico, consumo de álcool, tabaco, etc.) e dados adicionais sobre exposição ocupacional. Para evitar possíveis fatores de confusão, foram excluídos do estudo as mulheres grávidas, os portadores de doenças malignas, infecciosas ou inflamatórias, os que faziam uso de suplementos vitamínicos, drogas, tabaco além dos indivíduos que consumiam álcool acima do considerado moderado (*National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism-NIAAA, 2015*).

3.3 Coleta de amostras biológicas

Para evitar possível viés, todas as amostras foram realizadas concomitantemente de ambos os grupos antes do período de férias e sempre no mesmo período (manhã) com oito horas de jejum. Além disso, os participantes foram instruídos a suspender o uso de antisséptico bucal por pelo menos três dias antes da coleta.

Amostras de sangue venoso foram colhidas em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Anteriormente à coleta de células bucais, solicitou-se, a todos os indivíduos, para realizarem três bochechos vigorosos com água morna para eliminar possíveis resíduos. As células esfoliadas da mucosa bucal foram obtidas de ambos os lados da cavidade oral (bochecha) e do lábio inferior com o auxílio de *cytobrush*, a qual foi colocada em tubo de 15 ml contendo solução salina gelada (*phosphate buffer saline* - *PBS*). Todas as amostras foram codificadas e imediatamente processadas sob luz amarela para evitar possíveis danos adicionais ao material genético.

3.4 Teste do cometa

Após a coleta de sangue, as células mononucleares (constituídas especialmente de linfócitos) foram isoladas utilizando o método de gradiente de *Ficoll-Paque*[®], seguindo o protocolo anteriormente descrito (Braz & Fávero Salvadori, 2007): amostras (2 ml) de sangue total foram homogeneizadas em 2 ml de tampão fosfato salino (*PBS*) e colocadas, cuidadosamente, sobre 3 ml de *Ficoll-Paque*[®]; após centrifugação (30 min a 2.500 rpm, a 4°C), os linfócitos (halo branco) foram coletados com auxílio de pipeta *Pasteur* e transferidos para outro tubo, no qual foram adicionados 4 ml de *PBS*. Após nova centrifugação (1.500 rpm por 15 min a 4°C), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspendido. Os linfócitos (250 µl) foram transferidos para criotubo contendo 250 µl de meio *Instituto Roswell Memorial Park* (*RPMI-1640*), 200 µl de soro fetal bovino e 50 µl de dimetilsulfóxido (*DMSO*). Os criotubos foram congelados, em duplicata, gradualmente até serem armazenados em -80°C para avaliação posterior de danos no DNA, pelo teste do cometa (Risom & Knudsen, 1999).

O descongelamento também foi feito de maneira gradual (do *freezer* -80°C para o -20°C e depois a 4°C e banho-maria a 37°C de forma rápida, até restar um traço de gelo no criotubo) para melhor preservação celular. Assim, os linfócitos foram transferidos para um

tubo de 15 ml contendo 1 ml de *RPMI*, foram homogeneizados por inversão e os tubos foram centrifugados (2.000 rpm por 4 min a 4°C). O sobrenadante (1 ml) foi desprezado e foi acrescido 1 ml de *RPMI*, seguido de homogeneização e centrifugação. Por último, 1,6 ml do sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado e utilizado para início do teste do cometa. De acordo com as técnicas descritas por Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (1991) e padronizações prévias, o teste do cometa foi utilizado para avaliação de danos basais no DNA de ambos os grupos estudados.

Inicialmente, as lâminas foram preparadas com gel para primeira camada utilizando-se agarose ponto de fusão normal (PFN). A PFN foi diluída em *PBS*, aquecida em micro-ondas e mantida em banho-maria a 60°C. Com o auxílio de uma pinça, as lâminas foram mergulhadas no gel de agarose PFN e colocadas para secar.

Foram misturados, vagarosamente, 10 µl de linfócitos com 120 µl de 0,5% de agarose baixo ponto de fusão (BPF) diluída e mantida em banho-maria a 37°C. Essa mistura foi pipetada sobre as lâminas previamente cobertas com uma camada de 1,5% de agarose PFN, as quais foram cobertas por lamínula e colocadas na geladeira por 8 min para solidificação da agarose. A lamínula foi retirada cuidadosamente e as lâminas foram mergulhadas por pelo menos 2 h em solução de lise gelada (recém preparada com EDTA 100 mM, NaCl 2,5 M, Tris 10 mM; pH 10, com 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO). Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em *PBS* (1 x) por 5 min e transferidas para cuba de acrílico horizontal, em solução de eletroforese (recém-preparada com EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH > 13) por 20 min. Após o tempo de desespiralização do DNA, a corrida eletroforética foi conduzida a 25 V e 0,3 A por 20 min. Após a eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (Tris 0,4 M; pH 7,5) por 15 min, sendo em seguida mergulhadas em álcool absoluto (etanol) para fixação e colocadas para secagem em temperatura ambiente. Posteriormente, foram armazenadas em laminários a 4°C até o momento da coloração. As lâminas foram realizadas em duplicata e com controle interno na eletroforese.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com 80 µl de *SYBR Gold* (1:10.000 em água Milli-Q), cobertas com lamínula e 100 nucleóides (50 nucleóides/lâmina) foram analisados em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instruments*, Reino Unido), em aumento de 400x. Como parâmetro para a avaliação dos danos no DNA considerou-se o *tail moment – TM* (u.a.).

3.5 Teste do micronúcleo bucal (BM_{Cyt})

Após a coleta, as células da mucosa bucal foram imediatamente transferidas para solução salina gelada (5 ml) até o momento de processamento das amostras no laboratório. Em seguida, os tubos contendo solução salina e células foram centrifugados (1.000 rpm por 5 min a 4°C), o sobrenadante foi retirado e foi adicionada solução fixadora (5 ml de metanol/ácido acético na proporção 3:1) e os tubos foram centrifugados novamente (1.000 rpm por 5 min a 4°C). Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, as amostras foram gotejadas em lâminas limpas previamente, com secagem à temperatura ambiente por 24 h seguindo o protocolo de Thomas *et al.* (2009), com pequenas adequações. O material excedente foi mantido em *freezer* -20°C.

As lâminas foram submetidas à coloração de *Feulgen*/*Fast Green*, conforme prévia padronização, iniciando-se pela etapa de hidrólise por imersão em HCl 5 M a 37°C durante 20 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada por três vezes e posteriormente foram imersas em *Feulgen* (reativo de *Schiff*) durante 90 min e depois em água destilada durante 10 min. As lâminas foram secas durante a noite e no dia seguinte realizou-se a coloração com *Fast Green* a 3% por 20 s. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e foram cobertas com lamínulas após a secagem. A coloração de *Feulgen* confere ao núcleo cor lilás, que se intensifica quanto maior a concentração de DNA. O corante *Fast Green* confere ao citoplasma a cor verde (contra coloração, o que diferencia o núcleo do citoplasma).

As lâminas, em duplicata, foram analisadas de forma encoberta utilizando o microscópio Olympus BX43 (Tóquio, Japão) com ampliação de 1.000x. Os MNs e toda a população celular oral foram determinados utilizando os critérios de identificação e quantificação descritos e recomendados por Tolbert *et al.* (1992) e Thomas *et al.* (2009). Realizou-se a análise de 1.000 células por indivíduo para identificar células basais, diferenciadas e binucleadas; cromatina condensada, cariorrexe, picnose e cariólise. Para MN e broto nuclear foram analisadas 2.000 células diferenciadas.

3.6 Mensuração dos resíduos de gases anestésicos em salas de operação

O HC da FMB – UNESP tem 13 salas de operação, com diferentes áreas (23,5 m² - 40,2 m²). Seis salas de operação possuem um aparelho de ar condicionado em cada sala (portanto sem sistema de exaustão de gases) e sete salas de operação possuem ar condicionado central com sistema de exaustão de gases, sendo que nessas salas a circulação de ar é feita somente com 25% de ar novo (ambiente externo), o que leva de 6 a 8 trocas de ar/hora.

Utilizou-se o aparelho *InfraRan 4-gas anesthetic specific vapor analyzer* (Wilks Enterprise, East Norwalk, EUA) para medir, em tempo real, por espectrofotometria infravermelha, as concentrações de anestésicos halogenados (isoflurano, sevoflurano e desflurano) e N₂O nas salas de operação (Pickworth *et al.*, 2013). Antes do início de cada mensuração, o aparelho foi calibrado, como recomendado pelo fabricante. As concentrações de N₂O e dos halogenados foram medidas no ar, com fluxo de amostras de 10 l/min, sempre na área de respiração do anestesiológista, durante cirurgias sob anestesia balanceada. Foram realizados cálculos para obtenção das médias e valores mínimo e máximo para cada concentração residual de anestésico. Para o N₂O também se calculou o TWA (durante administração anestésica) utilizando-se a fórmula específica (Figura 3).

$$TWA = \frac{c_1 * t_1 + c_2 * t_2 + ... c_n * t_n}{t_1 + t_2 + ... t_n}$$

Figura 3. Fórmula do TWA (Schiewe-Langgartner *et al.*, 2005).

3.7 Análise estatística

O tamanho amostral foi calculado para os danos no DNA (teste do cometa), estimando-se uma diferença esperada entre o grupo controle e o exposto em torno de 0,20 e com um desvio de 0,27, com poder do teste de 80%, ficando estabelecido 27 indivíduos. Tanto os dados de danos no DNA como os demográficos foram analisados pelo teste *t de Student*, exceto para a distribuição do sexo, a qual foi analisada pelo teste do qui-quadrado.

Os tipos celulares e de danos citogenéticos na mucosa oral, além da associação entre os marcadores e as variáveis idade, tempo de exposição e sexo foram analisados usando modelo de regressão de *Poisson*. Os valores foram expressos em média e desvio padrão ($X \pm DP$) ou em número absoluto. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

Sessenta médicos participaram do estudo, mas houve exclusão de três indivíduos do grupo controle (falta de dados) e os resultados foram analisados em 57 médicos. A Tabela 1 mostra os dados demográficos e não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). O tempo médio de exposição aos resíduos de gases anestésicos (grupo exposto) foi de 16 anos (de 2 a 44 anos).

Tabela 1 - Dados demográficos ($X \pm DP$ ou número absoluto - %)

Características	Grupo controle (n = 27)	Grupo exposto (n = 30)
Idade (anos)	41,0 $\pm$ 14,0	42,0 $\pm$ 15,9
Sexo (masculino/feminino)	18 (67%) / 9 (33%)	20 (67%) / 10 (33%)
Índice de massa corpórea (kg/m²)	26,1 $\pm$ 4,6	26,1 $\pm$ 3,3

$p > 0,05$

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos pelo teste do cometa e pelo teste do MN em mucosa oral (*BM_{Cyt}*) nos grupos estudados. Frequências significativamente mais elevadas foram encontradas no grupo exposto quando comparado com o grupo não exposto para MN ($p = 0,034$), cariorrexe ($p < 0,0001$) e picnose ($p = 0,024$). Por outro lado, a frequência de células basais foi significativamente menor no grupo exposto quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0027$). Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos, em relação aos danos no DNA avaliados em linfócitos periféricos pelo teste do cometa, assim como para broto nuclear, cariólise, cromatina condensada, células binucleadas e diferenciadas normais pelo teste *BM_{Cyt}*.

Tabela 2 - Danos no DNA detectados em linfócitos periféricos pelo teste do cometa e frequência da população de células normais e anormais e de biomarcadores de instabilidade genômica detectados pelo teste do micronúcleo bucal – *BMCyt* ($X \pm DP$)

Parâmetros	Grupo controle (n = 27)	Grupo exposto (n = 30)	Valor de p
Teste do cometa^a	0,31 $\pm$ 0,27	0,34 $\pm$ 0,30	0,72
Micronúcleo^b	0,33 $\pm$ 0,55	0,77 $\pm$ 1,28	0,034
Broto nuclear^b	1,33 $\pm$ 1,62	1,50 $\pm$ 2,30	0,60
Cariólise^c	18,04 $\pm$ 7,81	19,87 $\pm$ 7,33	0,11
Cariorrexe^c	10,67 $\pm$ 5,10	14,37 $\pm$ 6,39	< 0,0001
Picnose^c	2,04 $\pm$ 1,37	3,00 $\pm$ 1,60	0,024
Cromatina condensada^c	17,78 $\pm$ 8,21	19,67 $\pm$ 7,94	0,10
Células binucleadas^c	7,41 $\pm$ 3,09	6,50 $\pm$ 3,88	0,19
Células basais^c	24,26 $\pm$ 9,08	20,50 $\pm$ 5,90	0,0027
Células diferenciadas normais^c	944,72 $\pm$ 1,95	934,9 $\pm$ 5,1	0,35

^au.a.; ^b por 2.000 células analisadas; ^c por 1.000 células analisadas.

Quando as variáveis idade e sexo foram analisadas para o teste do cometa, mostrou-se que não houve nenhuma diferença significativa detectada tanto dentro do mesmo grupo como entre os grupos. Também não houve diferença significativa entre os anestesiológicos em relação ao tempo de exposição aos resíduos de gases anestésicos por período menor ou maior que 15 anos (Tabela 3).

Tabela 3 - Danos no DNA detectados pelo teste do cometa de acordo com idade, tempo de exposição e sexo

Parâmetros	Grupo controle		Grupo exposto		Valor de p entre os grupos
	n	X ± DP	n	X ± DP	
Idade (anos)					
< 40	16	0,26 ± 0,24	17	0,36 ± 0,35	0,36
≥ 40	11	0,38 ± 0,31	13	0,30 ± 0,21	0,51
		p = 0,28		p = 0,63	
Tempo de exposição (anos)					
< 15			19	0,34 ± 0,34	
≥ 15			11	0,32 ± 0,22	
				p = 0,88	
Sexo					
Masculino	18	0,28 ± 0,26	20	0,33 ± 0,28	0,55
Feminino	9	0,37 ± 0,29	10	0,37 ± 0,34	0,96
		p = 0,43		p = 0,72	

A Tabela 4 mostra a frequência de MNs bucais, em ambos os grupos, conforme as variáveis idade, sexo e tempo de exposição. O grupo exposto mostrou aumento significativo de danos citogenéticos nos profissionais com idade ≥ 40 anos comparado aos profissionais não expostos na mesma idade ($p = 0,033$). Entretanto, esta diferença não foi devido ao maior tempo de exposição aos resíduos de gases anestésicos ($p > 0,05$). Em relação à variável sexo, apesar das médias de MNs do grupo exposto serem maiores que as do grupo controle, não houve diferença significativa entre os grupos ou intragrupo.

Tabela 4 - Frequência de micronúcleos em células esfoliadas orais em ambos os grupos de acordo com idade, tempo de exposição e sexo

Parâmetros	Grupo controle		Grupo exposto		Valor de p entre os grupos
	n	X ± DP	n	X ± DP	
Idade (anos)					
< 40	16	0,44 ± 0,63	17	0,65 ± 1,11	0,41
≥ 40	11	0,18 ± 0,40	13	0,92 ± 1,50	0,033
		p = 0,27		p = 0,39	
Tempo de exposição (anos)					
< 15			19	0,79 ± 1,32	
≥ 15			11	0,73 ± 1,27	
				p = 0,85	
Sexo					
Masculino	18	0,33 ± 0,59	20	0,70 ± 1,30	0,09
Feminino	9	0,33 ± 0,50	10	0,90 ± 1,29	0,13
		p = 1,00		p = 0,55	

A Tabela 5 mostra a frequência de brotos nucleares, células binucleadas e células basais analisadas pelo teste *BMCyt* de acordo com os grupos e sexo. O grupo controle foi constituído por 18 homens e nove mulheres enquanto que o grupo exposto, por 20 homens e dez mulheres. As mulheres de ambos os grupos (controle e exposto) apresentaram maior frequência de brotos nucleares em comparação com os homens ($p < 0,05$), mas sem diferença significativa entre os grupos. Não houve diferenças significativas entre sexo e grupos em relação aos defeitos citocinéticos avaliados por células binucleadas. A frequência de células basais foi inferior nos homens expostos quando comparados com as mulheres expostas ($p = 0,02$) e quando em comparação com os homens não expostos ($p < 0,001$).

Tabela 5 - Frequência de brotos nucleares e de células binucleadas e basais identificadas e quantificadas pelo teste *BMCyt* nos dois grupos, conforme o sexo

Parâmetros	Sexo	Grupo controle	Grupo exposto	Valor de p entre os grupos
		X $\pm$ DP	X $\pm$ DP	
Broto nuclear	M	0,94 $\pm$ 1,30	1,05 $\pm$ 1,57	0,74
	F	2,11 $\pm$ 1,96	2,40 $\pm$ 3,24	0,67
		p = 0,01	p = 0,005	
Células binucleadas	M	6,78 $\pm$ 2,78	6,35 $\pm$ 3,90	0,60
	F	8,67 $\pm$ 3,46	6,80 $\pm$ 4,05	0,14
		p = 0,08	p = 0,64	
Células basais	M	24,39 $\pm$ 8,42	19,20 $\pm$ 5,60	0,0006
	F	24,00 $\pm$ 10,83	23,10 $\pm$ 5,90	0,68
		p = 0,84	p = 0,02	

M: sexo masculino; F: sexo feminino.

Em relação às mortes celulares (Tabela 6), as mulheres de ambos os grupos apresentaram maiores frequências de cariorrexe ($p < 0,05$) em comparação aos homens. Tanto os homens quanto as mulheres anesthesiologistas apresentaram maior frequência de células cariorréticas quando comparados aos respectivos controles ($p < 0,05$). Em relação à picnose, as profissionais expostas apresentaram maior frequência em comparação com as profissionais não expostas aos resíduos de gases anestésicos ($p = 0,04$). As mulheres expostas tiveram maior frequência de cariólise quando comparadas aos homens expostos ($p = 0,017$) e às médicas não expostas ($p = 0,006$).

Tabela 6 - Frequência de mortes celulares em células esfoliadas orais nos grupos estudados de acordo com o sexo

Tipos de morte celular	Sexo	Grupo controle	Grupo exposto	Valor de p entre os grupos
		X $\pm$ DP	X $\pm$ DP	
Cariorrexe	M	9,67 $\pm$ 4,72	12,45 $\pm$ 5,65	0,01
	F	12,67 $\pm$ 5,52	18,20 $\pm$ 6,29	0,002
		p = 0,024	p < 0,0001	
Picnose	M	2,28 $\pm$ 1,36	3,00 $\pm$ 1,78	0,17
	F	1,56 $\pm$ 1,33	3,00 $\pm$ 1,25	0,04
		p = 0,21	p = 1,00	
Cariólise	M	18,56 $\pm$ 6,98	18,50 $\pm$ 6,79	0,96
	F	17,00 $\pm$ 9,64	22,60 $\pm$ 7,96	0,006
		p = 0,36	p = 0,017	

M: sexo masculino; F: sexo feminino.

A Tabela 7 mostra os resultados das concentrações de resíduos de gases anestésicos em salas de operação. Todos os halogenados (desflurano > sevoflurano > isoflurano) e especialmente o gás N₂O contribuíram para a poluição do ar ambiente.

Tabela 7 - Concentração de anestésicos halogenados e de N₂O (ppm) nas salas de operação (X ± DP e valores mínimo e máximo; valor do TWA para N₂O)

Anestésicos	Concentração (ppm)
Isoflurano	5,5 ± 4,4 (0,4 – 16,5)
Sevoflurano	7,7 ± 8,7 (0,2 – 34,4)
Desflurano	16,4 ± 6,0 (8,2 – 23,2)
N ₂ O	150,3 ± 135,7 (61,0 – 350,0); 178 ± 152 (TWA)

5 DISCUSSÃO

O estudo realizado em anesthesiologistas expostos aos resíduos de gases anestésicos mostrou: (i) ausência de danos sistêmicos significativos no DNA, detectados pelo teste do cometa e (ii) pela primeira vez, a ocorrência de danos genéticos, com aumento de MN e de anomalias nucleares tais como cariorrexe e picnose, e de menor frequência de células basais, detectados em mucosa oral.

De acordo com o *National Institutes of Health* (NIH, 2015), foram constatados efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição excessiva aos resíduos de gases anestésicos, principalmente para os agentes anestésicos mais antigos, os quais não são mais comumente utilizados. No entanto, em relação aos anestésicos mais modernos, os estudos são inconclusivos sobre os possíveis efeitos tóxicos decorrentes da exposição ocupacional; consequentemente, mais estudos devem ser realizados para melhor elucidação do papel dos anestésicos inalatórios.

Segundo o *NIOSH* (1977), o limite de exposição para o N_2O é de 25 ppm como *TWA* por tempo de exposição; já para os halogenados o limite máximo recomendado é de 2 ppm como teto (*ceiling*) ao invés de *TWA*. Os halogenados descritos pelo *NIOSH* são o metoxiflurano, halotano e enflurano, ou seja, os anestésicos inalatórios mais antigos. Portanto, não há recomendações de limite de exposição para os anestésicos mais modernos, como isoflurano, sevoflurano e desflurano. Portanto, segundo a *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA, 2000) é necessário minimizar a exposição ocupacional mantendo-a em concentrações as menores possíveis.

No presente estudo, as concentrações residuais de N_2O estiveram sete vezes acima do limite recomendado pela *NIOSH*. As concentrações de anestésicos inalatórios nos circuitos respiratórios dos aparelhos de anestesia são expressas em termos da CAM, que é de aproximadamente 6% para desflurano, seguido de 1,9% para o sevoflurano e 1,2% de isoflurano. O desflurano evapora-se muito facilmente à temperatura ambiente por ter ponto de ebulição muito baixo, requerendo o uso de vaporizador especial (Saraiva, 2003). Possivelmente isso pode ter contribuído para as concentrações residuais mais elevadas desse anestésico. Assim, parece haver uma relação entre a CAM e as concentrações ambientais dos halogenados. De fato, de maneira semelhante aos nossos resultados, concentrações de desflurano e em menor grau de isoflurano, também foram encontradas excedentes a 2 ppm em amostras coletadas próximas de enfermeiras que trabalhavam em salas de recuperação anestésica mal ventiladas (Sessler & Badgwell, 1998).

Adicionalmente, os anestesiológicos utilizaram FGF considerado médio (1 - 2 l/min) (Baker, 1994). A utilização de mínimo e baixo FGF (0,25 - 1 l/min) reduz a poluição ambiental (Coimbra *et al.*, 2006). Ressalta-se também que apenas metade das salas de operação analisadas tinham sistema de exaustão de gases com 75% de recirculação de ar (6 a 8 trocas de ar/hora) no ambiente. No entanto, os sistemas de exaustão mais modernos e recomendados para as salas de operação consistem em sistema de fluxo laminar com total renovação do ar, levando a um mínimo de 15 trocas de ar/h, sem recirculação de ar (NIOSH, 2007). Assim, esses vários fatores devem ter contribuído para as concentrações residuais encontradas no estudo, principalmente para o N₂O.

Algumas medidas podem ser feitas para redução da poluição dos resíduos dos gases anestésicos. Certamente, a principal é a implantação de sistema ativo de exaustão de gases e de renovação de ar em todas as salas de operação. A utilização de baixo FGF, a diminuição ou descontinuidade do uso de N₂O e o aumento de anestesia venosa total devem ser estimulados para redução dos riscos de exposição ocupacional.

Em relação aos estudos que avaliaram a exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos e danos no genoma, detectados pelo teste do cometa, os resultados são controversos. Assim, alguns estudos observaram aumento significativo de danos no DNA em diferentes profissionais ocupacionalmente expostos aos resíduos de gases anestésicos (Sardas *et al.*, 1998; Izdes *et al.*, 2010; El-Ebiary *et al.*, 2013) enquanto outros trabalhos da literatura não encontraram alterações significantes (Bozkurt *et al.*, 2002; Szyfter *et al.*, 2004).

Comparando-se, especificamente, anestesiológicos com um grupo controle, também não se observou diferença significativa em relação aos danos no DNA (Rozgaj *et al.*, 2009), achados que respaldam nossos resultados. Trabalho publicado recentemente também mostrou ausência de diferença significativa no nível de danos basais no DNA de 100 profissionais ocupacionalmente expostos aos resíduos de gases anestésicos quando comparados ao grupo não exposto (Szyfter *et al.*, 2015). Sugere-se que uma resposta adaptativa possa surgir frente à exposição prolongada, pois os linfócitos circulantes resistiriam melhor aos efeitos de possíveis agentes tóxicos como os anestésicos (Rozgaj *et al.*, 2009; Szyfter *et al.*, 2015).

Possivelmente os resultados discrepantes podem ser explicados por diferentes: profissionais expostos, cargas horárias de trabalho, tempo de exposição, tipos e frequência de anestésicos halogenados utilizados; da presença ou ausência da utilização do N₂O; do uso e frequência de utilização de anestesia venosa; dos aparelhos e sistema de anestesia utilizados; da presença ou ausência de sistemas de exaustão das salas de operação; das concentrações

residuais dos gases anestésicos; e mesmo das diferenças existentes na realização do teste do cometa (tempo de eletroforese, tipo de análise e parâmetro utilizado, etc).

Alguns estudos (Chandrasekhar *et al.*, 2006; Szyfter *et al.*, 2015) também não detectaram a influência de variáveis como idade, sexo e tempo de exposição aos resíduos de gases anestésicos no teste do cometa, dando suporte aos nossos dados. Fazendo um paralelo, nosso grupo de pesquisa também não observou aumento de danos no DNA avaliados pelo teste do cometa quando pacientes submetidos a cirurgia foram anestesiados com isoflurano ou sevoflurano (Braz *et al.*, 2011).

Hipóteses sobre possíveis mecanismos de genotoxicidade dos anestésicos halogenados incluem a interação destes agentes com o DNA, alquilando a posição N7 das purinas ou pela formação de compostos reativos, liberando espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais induzem vários tipos de lesões (Jaloszynski *et al.*, 1999). Por outro lado, nossos dados mostram que a exposição ocupacional não induziu quebras na fita de DNA ou sítios álcali-lábeis em linfócitos periféricos em anestesiológicos expostos aos resíduos dos halogenados mais modernos como isoflurano, sevoflurano e desflurano, além do N₂O. Deve-se ressaltar que esses halogenados são pouco metabolizados, diferentemente dos halogenados mais antigos, que produziam metabólitos reativos. Já a exposição ao N₂O pode aumentar as concentrações de homocisteína e diminuir as concentrações de metionina sintetase, diminuindo assim a vitamina B12, podendo interferir na síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Sanders *et al.*, 2008). De fato, estudo realizado em enfermeiras que atuavam em centro cirúrgico demonstrou correlação positiva entre danos oxidativos no DNA e níveis de N₂O no ar ambiente. Em contraste, nenhuma associação foi observada entre efeitos genotóxicos com isoflurano ou sevoflurano (Wrońska-Nofer *et al.*, 2012).

Anestesiológicos que trabalhavam em salas de operação sem sistema ativo de exaustão e estiveram expostos em média de 6,5 anos aos resíduos de sevoflurano e N₂O tiveram aumento da frequência de TCI em relação ao grupo não exposto (Eroglu *et al.*, 2006). Esses autores também observaram que as frequências de TCI desses profissionais diminuíram para níveis semelhantes ao do grupo controle após dois meses de afastamento do centro cirúrgico. Esses dados reafirmam a importância dos anestesiológicos tirarem período de férias, pois os danos sistêmicos podem ser reversíveis.

Estudos sobre danos citogenéticos são relevantes porque esses eventos estão relacionados com a oncogênese. De fato, Bonassi *et al.* (2007) afirmaram que o MN além de ser um indicativo de dano genético (cromossômico) também é marcador precoce de carcinogênese. Anestesiológicos seguidos de técnicos, enfermeiras e cirurgiões expostos a

halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O tiveram aumento da frequência de MN bucal quando comparados ao grupo controle (Chandrasekhar *et al.*, 2006). Esses autores também relataram que os profissionais expostos tabagistas, usuários de álcool e com idade ≥ 35 anos tiveram as maiores frequências de danos. De forma semelhante, também encontramos aumento significativo de MN detectado pelo *BMCyt* em anestesiológicos expostos a isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O, sendo que houve tendência dos anestesiológicos do sexo masculino terem mais danos (MN) que o grupo controle. Também observamos que os anestesiológicos com ≥ 40 anos de idade tiveram maior instabilidade genômica quando comparados aos médicos controles na mesma faixa etária. Dessa forma, pode-se assumir que os anestesiológicos de idade mais avançada têm maior risco genético. Assim como o fator idade é preditor importante na avaliação de MNs em linfócitos, também parece ser para os MNs bucais (Bonassi *et al.*, 2011).

Adicionalmente à análise de indicadores de instabilidade genômica como o MN, o teste *BMCyt* possibilita a análise de broto nuclear (indicativo da amplificação gênica/danos no DNA) e de vários marcadores de morte celular analisados por cromatina condensada, cariorrexe, picnose e cariólise, assim como de células basais (potencial proliferativo) e de células binucleadas (por falha na citocinese) (Thomas *et al.*, 2009). Portanto, nosso trabalho é inédito ao demonstrar alterações pelo ensaio *BMCyt* em exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos mais modernos.

A proporção de células basais juntamente com as células em processo de morte é indicativa de capacidade regenerativa do tecido bucal (Çelik *et al.*, 2013). Sabe-se que a capacidade de regeneração de tecidos e órgãos é fundamental para o envelhecimento saudável. Em relação às células epiteliais basais, menor frequência desse tipo celular foi observada em indivíduos com doença neurodegenerativa em relação ao grupo de indivíduos saudáveis (Thomas *et al.*, 2007). Possivelmente, a menor frequência dessas células em anestesiológicos, especialmente no sexo masculino, pode indicar alteração de índice proliferativo. Adicionalmente, indicadores de citotoxicidade também foram encontrados em maior frequência nos anestesiológicos; os eventos cariorrexe e picnose estão relacionados com fase tardia de apoptose e morte celular, respectivamente, mas os mecanismos exatos ainda não são conhecidos (Thomas *et al.*, 2007).

De forma interessante, as mulheres anestesiológicas foram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos, avaliados na mucosa bucal, relacionados à exposição ocupacional. Possivelmente, o papel dos hormônios femininos pode ter influenciado os dados encontrados. Estudo mostrou que mulheres expostas ocupacionalmente aos resíduos de gases anestésicos

apresentaram mais danos no material genético, incluindo aumento de AC, MN e TCI quando comparadas ao grupo controle ou mesmo às radiologistas (Bilban *et al.*, 2005).

Até o presente momento, nenhum efeito do fator sexo havia sido demonstrado quando o teste *BMCyt* foi realizado em indivíduos com exposição ocupacional (Bonassi *et al.*, 2011). No entanto, nossos dados indicam haver influência do sexo sobre os biomarcadores de *BMCyt* em relação à exposição ocupacional aos anestésicos. Conforme Pasquini *et al.* (2001), a análise de MN em linfócitos parece ser importante para detecção de possíveis efeitos genotóxicos nos anestesiológicos, e as mulheres parecem ser mais susceptíveis a esses efeitos que os homens. Entretanto, de forma semelhante à nossa pesquisa, os autores também não observaram relação entre a frequência de MN e a duração da exposição ocupacional.

Acredita-se que a exposição repetida aos agentes citotóxicos pode resultar em dano celular, compensação da proliferação celular, hiperplasia e por último desenvolvimento tumoral (Swenberg, 1993). De fato, existem indícios da relação entre proliferação celular e indução de câncer (Mally & Jagetia, 2002), pois a proliferação pode aumentar o risco de mutações, as quais consistem em passo inicial para a tumorigênese. Certamente, a influência do sistema imunológico, nutricional, do estilo de vida, da capacidade de reparo de DNA e susceptibilidade genética individual deve ser levada em conta no processo de oncogênese.

É interessante notar que o teste do MN realizado em linfócitos foi demonstrado como o indicador mais sensível de instabilidade genômica causada pelos anestésicos inalatórios (Rozgaj *et al.*, 2001). Assim, também pode-se afirmar que o teste do MN avaliado nas células esfoliadas orais apresenta alta sensibilidade para detecção de danos entre os profissionais expostos e os não expostos, além de apresentar como vantagens ser menos invasivo, possibilitar a análise de outros marcadores genéticos e maior facilidade de aplicação no biomonitoramento humano. O *BMCyt* pode ser utilizado para monitorar eventos precoces de genotoxicidade resultantes de potenciais agentes genotóxicos/carcinogênicos que entram no organismo através da inalação e/ou ingestão (Thomas *et al.*, 2009). De fato, o *BMCyt* vem tendo aceitação crescente como biomarcador confiável de genotoxicidade em estudos de exposição ocupacional (Salama *et al.*, 1999). O fato dos anestesiológicos, sob as condições de exposição, terem mostrado instabilidade genômica em mucosa bucal, sugere-se que a análise *BMCyt* deve ser utilizada para monitoramento de possíveis efeitos tóxicos no material genético decorrentes da exposição ocupacional em anestesiológicos e outros profissionais que trabalham nas salas de operação. Assim, diferentemente da avaliação, pelo teste do cometa, de danos passíveis de reparo em linfócitos periféricos, as células da mucosa oral representam a

primeira barreira por onde as substâncias voláteis penetram no organismo, estando expostas aos agentes anestésicos.

Considerando-se que os resíduos de gases anestésicos induzem alterações genéticas em anesthesiologistas, os resultados do presente estudo indicam a necessidade de que a exposição ocupacional seja a menor possível.

6 CONCLUSÃO

A exposição aos resíduos dos gases anestésicos determina instabilidade genômica, alterações no índice proliferativo e citotoxicidade, detectadas pelo teste do micronúcleo bucal (*BM_{Cyt}*), mas não induz danos sistêmicos no DNA, avaliados pelo teste do cometa, em anesthesiologistas. Assim, esses profissionais podem ser considerados em risco de apresentarem alterações genéticas decorrentes de exposição ocupacional.

7 REFERÊNCIAS*

- Ahlborg G Jr, Axelsson G, Bodin L. Shiftwork, nitrous oxide exposure and subfertility among Swedish midwives. *Int J Epidemiol*. 1996;25:783-90.
- Araujo TK, da Silva-Grecco RL, Bisinotto FM, Roso NC, Pissetti CW, da Cruz RM, et al. Genotoxic effects of anesthetics in operating room personnel evaluated by micronucleus test. *J Anesthesiol Clin Sci*. 2013;2:26. doi:<http://dx.doi.org/10.7243/2049-9752-2-26>
- Baker AB. Low-flow and closed circuits. *Anaesth Intensive Care*. 1994;22:341-42.
- Bath-Balogh M, Fehrenbach MJ. Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
- Baysal Z, Cengiz M, Ozgonul A, Cakir M, Celik H, Kocyigit A. Oxidative status and DNA damage in operating room personnel. *Clin Biochem*. 2009;42:189-93.
- Bilban M, Jakopin CB, Ogrinc D. Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). *Int Arch Occup Environ Health*. 2005;78:60-4.
- Bodin L, Axelsson G, Ahlborg G Jr. The association of shift work and nitrous oxide exposure in pregnancy with birth weight and gestational age. *Epidemiology*. 1999;10:429-36.
- Boivin JF. Risk of spontaneous abortion in women occupationally exposed to anaesthetic gases: a meta-analysis. *Occup Environ Med*. 1997;54:541-8.
- Bolognesi C, Roggieri P, Ropolo M, Thomas P, Hor M, Fenech M, et al. Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*. 2015;4:545-55.
- Bonassi S, Forni A, Bigatti P, Canevarollo N, De Ferrari M, Lando C, et al. Chromosome aberrations in hospital workers: evidence from surveillance studies in Italy (1963-1993). *Am J Ind Med*. 1997;31:353-60.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2015 [last updated 2015 November 04; cited 2015 Dec 09]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007;8:625-31.

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

Boros LF. Sedação consciente com os gases óxido nitroso/oxigênio em odontologia. *Clín Científ*. 2003;2:241-4.

Bozkurt G, Memis D, Karabogaz G, Pamukcu Z, Ture M, Karamanlioglu B, et al. Genotoxicity of waste anaesthetic gases. *Anaesth Intensive Care*. 2002;30:597-602.

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, 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*. 2011;726:251-4.

Byhahn C, Heller K, Lischke V, Westphal K. Surgeon's occupational exposure to nitrous oxide and sevoflurane during pediatric surgery. *World J Surg*. 2001;25:1109-12.

Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat. Res*. 2010;705:11-19.

Çelik A, Yildirim S, Ekinici SY, Taşdelen B. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013;92:265-70.

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.

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

Coimbra P, Barros L, Matos R, Matias C, Vazquez A, Órfão C, et al. Low flow anesthesia: the costs in euros. *J Port Soc Anesthesiol*. 2006;15:27-31.

Costa Paes ER, Braz MG, Lima JT, Silva MRG, Sousa LB, Lima ES, et al. DNA damage and antioxidant status in medical residents occupationally exposed to waste anesthetic gases. *Acta Cir Bras*. 2014;29:280-6.

Duarte LTD, Durval Neto GF, Mendes FF. Uso do óxido nitroso em pediatria. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012;62:451-67.

El-Ebiary AA, Abuelfadl AA, Sarhan NI, Othman MM. Assessment of genotoxicity risk in operation room personnel by the alkaline comet assay. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32:563-70.

Eroglu A, Celep F, Erciyes N. A comparison of sister chromatid exchanges in lymphocytes of anesthesiologists to non anesthesiologists in the same hospital. *Anesth Analg*. 2006;102:1573-7.

Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*. 1993;285:35-44.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mut Res*. 2000;455:81-95.

Hoerauf KH, Koller C, Jakob W, Taeger K, Hobbhahn J. Isoflurane waste gas exposure during general anaesthesia: the laryngeal mask compared with tracheal intubation. *Br J Anaesth*. 1996;77:189-93.

Hoerauf KH, Wiesner G, Schroegendorfer KF, Jobst BP, Spacek A, Harth M, et al. Waste anaesthetic gases induce sister chromatid exchanges in lymphocytes of operating room personnel. *Br J Anaesth*. 1999;82:764-6.

Irwin MG, Trinh T, Yao CL. Occupational exposure to anaesthetic gases: a role for TIVA. *Expert Opin Drug Saf*. 2009;8:473-83.

Izdes S, Sardas S, Kadioglu E, Karakaya AE. DNA damage, glutathione, and total antioxidant capacity in anesthesia nurses. *Arch Environ Occup Health*. 2010;65:211-7.

Jaloszynski P, Kujawski M, Wasowicz M, Szulc R, Szyfter K. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and desflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutat Res*. 1999;439:199-206.

Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mut Res*. 2000;463:13-31.

Kharasch ED, Thummel KE. Identification of cytochrome P4502E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane. *Anesthesiology*. 1993;79:795-807.

Krajewski W, Kucharska M, Pilacik B, Fobker M, Stetkiewicz J, Nofer JR, et al. Impaired vitamin B12 metabolic status in health care workers occupationally exposed to nitrous oxide. *Br J Anaesth*. 2007;99:812-8.

Ladeira C, Viegas S, Carolino E, Prista J, Gomes MC, Brito M. Genotoxicity biomarkers in occupational exposure to formaldehyde-the case of histopathology laboratories. *Mutat Res*. 2011;721:15-20.

Lewinska D, Stepnik M, Krajewski W, Arkusz J, Stanczyk M, Wronska-Nofer T. Increased incidence of micronuclei assessed with the micronucleus assay and the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in peripheral blood lymphocytes of nurses exposed to nitrous oxide. *Mutat Res*. 2005;581:1-9.

Lucchini R, Placidi D, Toffoletto F, Alessio L. Neurotoxicity in operating room personnel working with gaseous and nongaseous anesthesia. *Int Arch Occup Environ Health*. 1996;68:188-92.

Mahboob M, Rahman MF, Rekhadevi PV, Sailaja N, Balasubramanyam A, Prabhakar PV, et al. Monitoring of oxidative stress in nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs. *Toxicol Int*. 2012;19:20-4.

Mally A, Jagetia JK. Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology*. 2002;180:233-48.

Moppett I. Inhalational anaesthetics. *Anaesth Intensive Care*. 2015;16:641-46.

National Institute of Occupational Safety and Health (US). Criteria for recommended standard: occupational exposure to waste anesthetic gases and vapors [Internet]. Atlanta: Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control; 1977 [access 5 Jan 2016]. (Publication; n. 77B140). Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/1970/77-140.html>.

National Institute of Occupational Safety and Health (US). Waste anesthetic gases: occupational hazards in hospitals [Internet]. Atlanta: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007 [access 5 Jan 2016]. disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2007-151/pdfs/2007-151.pdf>

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). Drinking Levels Defined [Internet]. Bethesda: NIAAA; 2015 [acesso 5 Jan 2016]. Disponível em: <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>

National Institutes of Health (US). Division of Occupational Health and Safety. Office of Research Services. Waste anesthetic gas (WAG) surveillance program [Internet]. Bethesda: NIH; 2015 [acesso 5 Jan 2016]. Disponível em: [http://www.ors.od.nih.gov/sr/dohs/Documents/Waste%20Anesthetic%20Gas%20\(WAG\)%20Surveillance%20Program.pdf](http://www.ors.od.nih.gov/sr/dohs/Documents/Waste%20Anesthetic%20Gas%20(WAG)%20Surveillance%20Program.pdf)

Occupational Safety and Health Administration (US). Anesthetic gases: guidelines for workplace exposures [Internet]. Washington: OSHA; 2000 [acesso 5 Jan 2016]. Disponível em: <https://www.osha.gov/dts/osta/anestheticgases/index.html>

Oliveira CR. Occupational exposure to anesthetic gases residue. *Rev Bras Anesthesiol.* 2009;59:110-24.

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

Pickworth T, Jerath A, DeVine R, Kherani N, Wąsowicz M. The scavenging of volatile anesthetic agents in the cardiovascular intensive care unit environment: a technical report. *Can J Anaesth.* 2013;60:38-43.

Raventós J. The action of fluothane*-A new volatile anaesthetic. *Br J Pharmacol.* 1956;11:394.

Rezende JM. Breve história da anestesia geral. In: *À sombra do plátano: crônicas de história da medicina.* São Paulo: Editora Unifesp; 2009. p. 103-109.

Risom L, Knudsen LE. Use of cryopreserved peripheral mononuclear blood cells in biomonitoring. *Mutat Res.* 1999;440:131-8.

Rozgaj R, Kasuba V, Jazbec A. Preliminary study of cytogenetic damage in personnel exposed to anesthetic gases. *Mutagenesis.* 2001;16:139-43.

- Rozgaj R, Kasuba V, Brozovic G, Jazbec A. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212:11-7.
- Rowland AS, Baird DD, Shore DL, Weinberg CR, Savitz DA, Wilcox AJ. Nitrous oxide and spontaneous abortion in female dental assistants. *Am J Epidemiol*. 1995;141:531-8.
- Sakly A, Gaspar JF, Kerkeni E, Silva S, Teixeira JP, Chaari N, et al. Genotoxic damage in hospital workers exposed to ionizing radiation and metabolic gene polymorphisms. *J Toxicol Environ Health A*. 2012;75:934-46.
- Salama SA, Serrana M, Au WW. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutat Res*. 1999;436:99-112.
- Salvadori DM, Ribeiro LR, Fenech M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: Ribeiro LC, Salvadori DM, Marques EK, editores. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Editora Ulbra; 2003. p. 201-23.
- Sanders RD, Weimann J, Maze M. Biologic effects of nitrous oxide: a mechanistic and toxicologic review. *Anesthesiology*. 2008;109:707-22.
- Saraiva RA. Mecanismo de ação dos anestésicos inalatórios. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52:114-23.
- Saraiva RA. Desflurane: physicochemical properties, pharmacology and clinical use. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003;53:214-26.
- Sardas S, Aygün N, Gamli M, Unal Y, Unal N, Berk N, et al. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutat Res*. 1998;418:93-100.
- Scapellato ML, Carrieri M, Maccà I, Salamon F, Trevisan A, Manno M, et al. Biomonitoring occupational sevoflurane exposure at low levels by urinary sevoflurane and hexafluoroisopropanol. *Toxicol Lett*. 2014;231:154-60.
- Schiewe-Langgartner F, Wiesner G, Gruber M, Hobbhahn J. Exposition des personnels gegenüber sevofluran. *Anaesthesist*. 2005;54:667-72.
- Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975;31:9-15.

- Sessler DI, Badgwell JM. Exposure of postoperative nurses to exhaled anesthetic gases. *Anesth Analg*. 1998;87:1083-8.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-91.
- Smith FD. Management of exposure to waste anesthetic gases. *AORN J*. 2010;91:482-94.
- Souza CM, Tardelli MA. Anestesia inalatória. In: Amaral JLG, Geretto P, Tardelli MA, Machado FR, Yamashita AM. *Guia de anestesiologia e medicina intensiva* [Internet]. São Paulo: Manole; 2011 [acesso 7 Jan 2016]. Cap. 3, p. 47-74. Disponível em: <http://www.davidferez.net.br/alunos/curso-elearning-de-anestesi/anestesia-inalatoria.pdf>.
- Sulbaek Andersen MP, Nielsen OJ, Wallington TJ, Karpichev B, Sander SP. Medical intelligence article: assessing the impact on global climate from general anesthetic gases. *Anesth Analg*. 2012;114:1081-5.
- Sweeney B, Bingham RM, Amos RJ, Petty AC, Cole PV. Toxicity of bone marrow in dentists exposed to nitrous oxide. *Br Med J*. 1985;291:567-9.
- Swenberg JA. Cell proliferation and chemical carcinogenesis: conferences summary and future directions. *Environ Health Perspect*. 1993;101:153-58.
- Szyfter K, Szulc R, Mikstacki A, Stachecki I, Rydzanicz M, Jałoszyński P. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J Appl Genet*. 2004;45:369-74.
- Szyfter K, Stachecki I, Kostrzevska-Poczekaj M, Szaumkessel M, Szyfter-Harris J, Sobczuński P. Exposure to volatile anaesthetics is not followed by a massive induction of single-strand DNA breaks in operating theatre personnel. *J Appl Genet*. 2015 Dec 21. Epub ahead of print.
- Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*. 2007;22:371-9.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4:825-37.
- Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoresis technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol*. 1991;283:157-64.

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

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

Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res*. 1996;365:147-59.

Wiesner G, Harth M, Szulc R, Jurczyk W, Sobczynski P, Hoerauf KH, et al. A follow-up study on occupational exposure to inhaled anaesthetics in Eastern European surgeons and circulating nurses. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001a;74:16-20.

Wiesner G, Hoerauf K, Schroegendorfer K, Sobczynski P, Harth M, Ruediger HW. High-level, but not low-level, occupational exposure to inhaled anesthetics is associated with genotoxicity in the micronucleus assay. *Anesth Analg*. 2001b;92:118-22.

Wiesner G, Schiewe-Langgartner F, Lindner R, Gruber M. Increased formation of sister chromatid exchanges, but not of micronuclei, in anaesthetists exposed to low levels of sevoflurane. *Anaesthesia*. 2008;63:861-4.

Wolverson A, Nathanson MH. Volatile versus intravenous anaesthetic techniques for ambulatory anaesthesia. *Curr Opin Anaesthesiol*. 1998;11:595-600.

Wrońska-Nofer T, Palus J, Krajewski W, Jajte J, Kucharska M, Stetkiewicz J, et al. DNA damage induced by nitrous oxide: study in medical personnel of operating rooms. *Mutat Res*. 2009;666:39-43.

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.

Young CJ, Apfelbaum JL. Inhalational anesthetics: desflurane and sevoflurane. *J Clin Anesthesia*. 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: Avaliação de danos no material genético em anesthesiologists

Pesquisador: Kátina Meneghetti de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18946213.5.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Anestesiologia

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 417.865

Data da Relatoria: 07/10/2013

Apresentação do Projeto:

Raros são os dados existentes no Brasil em relação ao monitoramento da exposição profissional aos resíduos de gases anestésicos e não há dados na literatura nacional quanto à determinação de concentração de resíduos de gases anestésicos em salas de operação (SO). O presente estudo objetiva determinar as concentrações de resíduos de gases anestésicos em SO e avaliar o efeito desses agentes no material genético de profissionais expostos. O estudo será realizado no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em 60 médicos, sendo 30 expostos ocupacionalmente aos resíduos de gases anestésicos (anesthesiologists), e 30 sem exposição, os quais serão pareados por idade, gênero e estilo de vida. Serão determinados os valores das concentrações ambientais de resíduos de gases anestésicos na SO, utilizando aparelho portátil de espectrofotometria infravermelha. Amostras de sangue venoso e de células esfoliadas orais serão coletadas de todos os profissionais. Os danos no DNA serão detectados em linfócitos pelo teste do cometa e os danos citogenéticos em mucosa oral pelo teste do micronúcleo.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo tem como objetivo avaliar os danos no material genético (teste do cometa e teste do micronúcleo) em anesthesiologists atuantes. Objetivo secundário é o de determinar as concentrações de resíduos de gases anestésicos em salas de operação.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 417.865

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Haverá procedimento de coleta de sangue e células de mucosa oral com mínimo risco aos indivíduos.

Benefícios:

Com os resultados obtidos nesse estudo, obter-se-ão informações das concentrações de resíduos de gases anestésicos em centro cirúrgico com salas sem e com renovação de ar e de seus possíveis efeitos no material genético de profissionais anestesiológicos. Essas avaliações certamente contribuirão para futuras ações preventivas, especialmente na melhoria das condições de trabalho, visando diminuir eventuais danos à saúde dos

profissionais expostos ocupacionalmente, com impacto direto na saúde pública.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é de delineamento simples (estudo observacional tipo caso-controle). O desfecho a ser estudado é o dano genético avaliado por meio do teste de cometa e do micronúcleo. A casuística é de médicos anestesistas e os não anestesistas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE escrito de modo adequado. O grupo de estudo é composto por médicos anestesistas e não anestesistas.

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Estudo adequado sem problemas metodológicos ou éticos.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião do CEP de 07 de outubro de 2013, sem necessidade de envio à CONEP.

Ao Final deste projeto os pesquisadores devem encaminhar ao CEP o respectivo Relatório Final de Atividades.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 417.865

BOTUCATU, 08 de Outubro de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

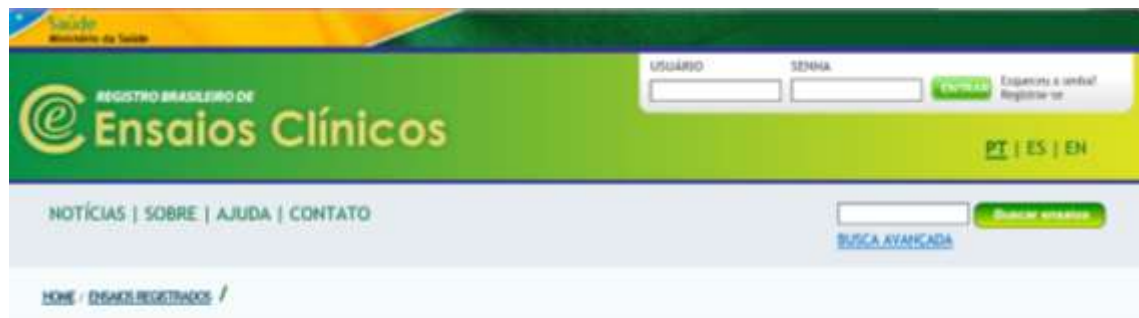
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1508

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

ANEXO B - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos



USUÁRIO SENHA [Esqueceu a senha? Registre-se](#)

PT | ES | EN

NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO

[BUSCA AVANÇADA](#)

HOME / ENSAIOS REGISTRADOS /

RBR-4vrz2m
Avaliação de danos no material genético em anesthesiologistas
 Data de registro: 17 de Fev. de 2014 às 01:52
 Last Update: 25 de Março de 2015 às 11:24



Kátina Meneghetti <katina-meneghetti@gmail.com>

Approved Submission - RBR-4vrz2m

3 mensagens

Rebec <rebec@icict.fiocruz.br>

25 de março de 2015 11:24

Para: katinameneghetti@gmail.com, rebec@icict.fiocruz.br, dtostes@gmail.com

Message sent by the site:
 Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>

Message:

Url do registro (trial url): <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-4vrz2m/>
 Numero de Registro (Register Number): RBR-4vrz2m

Prezado Registrante,

Temos o prazer de informar que seu estudo foi publicado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC).

Agradecemos por seu registro e colaboração e, desde já, nos colocamos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que possam surgir, seja em caso de atualização do registro ou, até mesmo, uma nova submissão.

Por favor, não hesite em contactar-nos.

Cordialmente,

ReBEC Staff - ReBEC/ICICT/LIS
 Av. Brasil 4036 - Maré - sala 807
 Rio de Janeiro RJ CEP: 21040-360
 Tel: +55(21)3882-9227
www.ensaiosclinicos.gov.br

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

O sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “Avaliação de danos no material genético em anesthesiologistas”, que pretende avaliar se os resíduos dos gases anestésicos promovem algum efeito tóxico sobre o DNA - material genético (o componente que determina suas características individuais) presente nas células do sangue. Para checar esses efeitos, serão realizados testes que avaliam a integridade do DNA.

O sr(a) foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa devido a formação e atuação na prática clínica, pois o estudo será realizado em 60 médicos de ambos os sexos, expostos e não expostos ocupacionalmente aos resíduos de gases anestésicos (indivíduos saudáveis, que não apresentam doença maligna, doenças infecciosas ou inflamatórias, os que não fazem uso regular de álcool, tabaco, “drogas ilícitas”, medicamentos ou suplementação vitamínica e que não são expostos à radiação).

Será realizado um questionário contendo dados pessoais (nome, data de nascimento, sexo, peso, altura, etc), estilo de vida (alimentação, prática de exercícios físicos, exposição a substâncias tóxicas, uso de bebida alcoólica, tabaco e drogas ilícitas, etc) e história médica (uso de medicamentos e suplementos vitamínicos, doenças, etc); todas as informações são de caráter confidencial e sua identidade será preservada. O questionário durará cerca de 20 minutos e será aplicado pela própria pesquisadora com agendamento prévio por meio de contato telefônico. Durante a aplicação do questionário não será utilizado qualquer tipo de recurso para armazenamento de imagem ou voz. As informações relatadas pelo(a) sr(a) serão transcritas e armazenadas para o fornecimento de dados complementares durante a análise dos resultados da pesquisa.

Desta forma, solicitamos seu consentimento para que, logo após a entrevista, pela manhã, seja coletada uma amostra de 30 ml de sangue periférico e duas amostras de células esfoliadas de ambos os lados da cavidade oral (bochecha). A coleta será realizada por profissional experiente, e o procedimento causa apenas o desconforto da picada com risco mínimo ou quase inexistente, já que será utilizado material estéril e descartável. A participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução N° 466/12.

A realização desta pesquisa permitirá a melhoria das condições de trabalho no sentido de minimizar os possíveis efeitos tóxicos causados pelos resíduos de gases anestésicos.

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

É garantido total sigilo de todos os seus dados relatados nesta pesquisa.

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

Qualquer dúvida adicional, o(a) Sr(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome: _____

Assinatura: _____

Pesquisadora: Kátina Meneghetti de Souza

Fone: (14) 9793-3860

Data: ____/____/____

Assinatura: _____

E-mail: katinameneghetti@gmail.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**QUESTIONÁRIO****Avaliação de danos no material genético em anesthesiologistas**

Registro hospitalar (se houver): _____

Código do indivíduo no estudo: _____

Data ____/____/____

I – Identificação

01-Nome: _____

02-Sexo: () masculino () feminino

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

04-Data nascimento ____/____/____

05-Idade: _____

06-Peso: _____

07-Altura: _____

08-IMC (índice de massa corpórea): _____

09-Origem (cidade): _____

10-Profissão: _____

II - Informações gerais

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

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

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

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

Alimento	Todos os dias	2 a 3 vezes por semana	1 a 2 vezes por mês	Rara / Nunca
Frutas				
Folhosos				
Legumes				
Leite e Derivados				
Ovos				
Carne Bovina				
Carne de Porco				
Galinha				
Peixe				
Embutidos				
Feijão				
Arroz				
Macarrão				
Pão				
Bolacha				
Doces				
Balas e chicletes				
Frituras				
Salgados assados				
Sanduíches				
Refrigerante				
Suco natural				
Suco artificial				
Café				

14-Qual o consumo de água diário:

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

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

15-Faz exercícios físicos regularmente? () sim () não

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

15.2-Se sim, quantas vezes por semana?_____

16-Fuma? () Sim () Não

16.1-Há quanto tempo?_____

16.2-Quantos cigarros/dia:

- () menos de meio maço () de meio a um maço
() 1 a 2 maços () mais de 2 maços

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

17-Já fumou alguma vez? () Sim () Não

17.1-Quantos cigarros/dia fumava:

- () menos de meio maço () de meio a um maço
() 1 a 2 maços () mais de 2 maços
() apenas experimentou

17.2-Durante quanto tempo fumou?_____

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

18-Fuma ou já fumou alguma substancia utilizando o cachimbo tipo Narguile?

- () sim () não Qual substancia? _____
Com que frequência/quantas vezes fumou? _____

19-Consome bebida alcoólica? () sim () não (se não, vá para questão 21)

20-Se sim, quantas vezes por semana:

- () somente aos finais de semana () somente em eventos sociais
() 1 a 3 dias () 4 ou mais dias

20.1-Se sim, quanto por semana (doses):

- () até 2 doses () de 3 a 4 doses () de 5 a 6 doses
() de 7 a 9 doses () acima de 10 doses

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

20.2-Qual tipo de bebida (cachaça, cerveja, whisky, vinho, etc)?_____

21-Já consumiu bebida alcoólica? () sim () não

22-Há quanto tempo deixou de beber?_____

23-Consome drogas? () sim () não

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

23.2-Há quanto tempo?_____

24-Já consumiu algum tipo de droga? () sim () não

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

24.2-Há quanto tempo?_____

25-Tem contato com substâncias tóxicas? () sim () não

25.1-Se sim, qual (agrotóxicos, gasolina, tinta)?_____

25.2-Há quanto tempo?_____

III - História Médica

26-Passou por algum estresse ultimamente? () sim () não

27-Se sim, qual?_____

28-Foi submetido a raio X,tomografia e escopia recentemente (no último mês)?
() sim () não

28.1-Quando?_____

28.2-Sabe quantas chapas ou tomografias foram feitas?_____

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

29.1-Qual?_____

30-Já teve alguma doença grave? () sim () não

30.1-Se sim, qual?_____

30.2-Há quanto tempo?_____

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

31.1-Se sim, qual?_____

31.2-Há quanto tempo?_____

32-Faz ou fez uso de algum tipo de medicamento, se sim, quais:

() antibiótico () anti-inflamatório () analgésico
() anti-hipertensivo () corticóide () anti-convulsivante
() insulina () hipoglicemiante () relaxantes musculares
() hormônios () anti-histamínicos () tranquilizantes
() fitoterápicos () homeopáticos () inibidores de apetite
() antiácidos () outros – quais: _____

32.1-Frequência/dia:_____

33-Faz ou fez uso de vitamina/antioxidante (complexo vitamínico)? () sim () não

33.1-Se sim, qual (is)?_____

33.2-Frequência/dia:_____

33.3-Há quanto tempo?_____

34-Tomou alguma medicação no último mês? () sim () não

34.1-Se sim, qual (is)?

() antibiótico () anti-inflamatório () analgésico
() anti-hipertensivo () corticóide () anti-convulsivante
() insulina () hipoglicemiante () relaxantes musculares
() hormônios () anti-histamínicos () tranquilizantes
() fitoterápicos () homeopáticos () inibidores de apetite
() antiácidos () outros – quais: _____

34.2-Frequência/dia:_____

34.3-Há quanto tempo parou?_____

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

35.1- Se sim, qual (is)?_____

35.2- Há quanto tempo parou?_____

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

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

37.1- Se sim, qual?_____

37.2-Se sim, quantas: _____

37.3- Há quanto tempo foi a última?_____

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

38.1-Se sim, sabe qual tipo de anestesia (local, geral, raquídea, regional)?_____

38.2-Há quanto tempo?_____

39-Já dosou vitamina B12? Se sim, o resultado estava dentro do padrão de normalidade?

() sim () não

() acima do recomendado (hipervitaminose)

() abaixo do recomendado (hipovitaminose)

40-Realizou exames hematológicos nos últimos 12 meses? Se sim, houve algum resultado fora dos padrões de normalidade?

() sim () não

Anormalidade encontrada: _____

V – Atividade Profissional

41-Qual é a sua especialidade médica?_____

42-Em qual (is) hospital (is) atua?

43-Você é residente? () sim () não

43.1-Se sim, de que ano?

() R1 () R2 () R3 () R4- Dor

44- Atua profissionalmente no centro cirúrgico? ☐ sim ☐ não (se não, vá para a questão 53 mulher e 60 homem)

44.1-Se sim, qual a frequência/semana? _____ horas

44.2-Se sim, há quanto tempo? _____anos, _____meses

45-Tem exposição à radiação (raio-X, tomografia, escopia) ou outra exposição ocupacional?
☐ sim ☐ não

45.1-Se sim, qual a frequência/semana? _____horas

46-Quando iniciou a carreira, qual tipo de anestesia era mais utilizado?
☐ inalatória ☐ venosa

46.1-Quais anestésicos inalatórios eram utilizados? _____

46.2-O sistema aberto tipo Baraka era utilizado com frequência? ☐ sim ☐ não

47-Atualmente realiza mais anestesia inalatória ou venosa? _____

48-Qual a frequência de cada anestesia por semana?

Venosa: _____

Inalatória: _____

49-Quando utiliza anestesia inalatória quais anestésicos são mais utilizados?

☐ isoflurano ☐ desflurano ☐ sevoflurano

49.1-Com que frequência e (%) utiliza conjuntamente o N₂O? _____

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

☐ Baixo_____ (l/min) ☐ Médio_____ (l/min) ☐ Alto_____ (l/min)

OBS: _____

50-Após um dia de trabalho no centro cirúrgico realizando anestесias inalatórias sente algum dos sintomas abaixo? ☐ sim ☐ não

- | | | | |
|--|--|-----------------------------------|--|
| ☐ náusea | ☐ vomito | ☐ fadiga | ☐ sonolência |
| ☐ cansaço extremo | ☐ desânimo | ☐ tontura | ☐ memória fraca |
| ☐ agitação | ☐ irritação | ☐ cefaleia | |
| ☐ dificuldade de concentração | ☐ produtividade baixa | | |
| ☐ dificuldade para dormir | ☐ sintomas depressivos | | |
| ☐ infecções mais frequentes | ☐ irritação das vias aéreas | | |

() outros: _____

50.1- Se sim, qual a frequência semanal?

() diariamente () de 4 a 6 vezes () de 1 a 3 vezes

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

() sim () não Se sim, qual: _____

50.3- Quando as anestésias são em adultos ou crianças os sintomas pioram?

() sim () não Se sim, com qual? _____

50.4- Sente que os sintomas diminuíram com o passar dos anos? () sim () não

51- Tira férias anualmente e fica sem exposição aos anestésicos? () sim () não

51.1 Se sim, por quanto tempo:

() inferior a 15 dias () inferior a 20 dias () 30 dias

52- Tirou férias ou se afastou do centro cirúrgico recentemente? () sim () não

52.1- Se sim, há quanto tempo não está exposto? _____

Se mulher:

53-Tem ciclo menstrual regular? ☐ sim ☐ não

53.1-Se não, qual o motivo (Se estiver em menopausa ou climatério especificar o tempo):

☐ menopausa ☐ climatério

☐ ovários policísticos ☐ cirúrgico

☐ outros: _____

Tempo de início de climatério ou menopausa: _____

54- Faz uso de anticoncepcional? ☐ sim ☐ não

54.1-Se sim, que tipo:

☐ oral ☐ injetável ☐ adesivo transdérmico

☐ implante subcutâneo ☐ outros: _____

54.2-Se sim, há quanto tempo? _____

55-Faz algum tipo de reposição hormonal? ☐ sim ☐ não

55.1-Se sim, que tipo:

☐ oral ☐ injetável ☐ adesivo transdérmico

☐ implante subcutâneo ☐ outros: _____

55.2-Se sim, há quanto tempo? _____

56-Tem filhos? ☐ sim ☐ não

56.1-Se sim, demorou para engravidar? ☐ sim ☐ não

Se sim, precisou de algum tratamento para engravidar? ☐ sim ☐ não

56.2-Se sim, algum apresenta algum tipo de problema? ☐ sim ☐ não

Se sim, qual (is): _____

56.3-Se sim, teve algum problema com a gestação? () sim () não

Se sim, qual (is): _____

56.4-Se não, já tentou engravidar? () sim () não

Se sim, há quanto tempo está tentando engravidar? _____

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

Se sim, qual (is): _____

Há quanto tempo? _____

57-Sabe se já teve algum aborto espontâneo? () sim () não

57.1-Se sim, quantos: _____

Há quanto tempo: _____

58-Seu parceiro tem alguma exposição ocupacional? () sim () não

58.1-Se sim, qual: _____

59-Sabe se você ou seu parceiro tem algum problema de infertilidade? () sim () não

Se homem:

60-Tem filhos? () sim () não

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

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

60.2-Se sim, algum apresenta algum tipo de problema? () sim () não

Se sim, qual (is): _____

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

Se sim, qual (is): _____

60.4-Se não, sua parceira já tentou engravidar? () sim () não

Se sim, há quanto tempo estão tentando engravidar? _____

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

Se sim, qual (is): _____

Há quanto tempo? _____

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

61.1-Se sim, quantos: _____

Há quanto tempo: _____

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

62.1-Se sim, qual: _____

63-Sabe se você ou sua parceira tem algum problema de infertilidade? () sim () não

IV- Coleta da amostra biológica

64-Realizou anestesia inalatória este mês?

() sim () não Quantas vezes: _____

64.1-Se sim, qual anestésico?

() N₂O () isoflurano () desflurano () sevoflurano

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

() Baixo_____ (l/min) () Médio_____ (l/min) () Alto_____ (l/min)

OBS: _____

65-Teve exposição aos resíduos de gases anestésicos no dia de ontem ou nesta madrugada?

() sim () não Se sim, por quantas horas? _____

65.1-Se sim, qual anestésico?

() N₂O () isoflurano () desflurano () sevoflurano

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

() Baixo_____ (l/min) () Médio_____ (l/min) () Alto_____ (l/min)

OBS: _____

66-Dormiu bem esta noite? () sim () não () passou a noite trabalhando

67-Ainda utilizam sistema aberto tipo Baraka? () sim () não

68-Gostaria de acrescentar alguma informação que considere importante?
