

Éllen Regina da Costa Paes

Avaliação de Genotoxicidade e Estresse Oxidativo em Profissionais
Recém-Expostos aos Resíduos de Gases Anestésicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Anestesiologia da Faculdade de
Medicina de Botucatu – UNESP para obtenção
do título de Doutor em Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr José Reinaldo Cerqueira Braz

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marne Carvalho de Vasconcellos

Botucatu, São Paulo

2013

Éllen Regina da Costa Paes

Avaliação de Genotoxicidade e Estresse Oxidativo em Profissionais
Recém-Expostos aos Resíduos de Gases Anestésicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Anestesiologia da Faculdade de
Medicina de Botucatu – UNESP para obtenção
do título de Doutor em Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr José Reinaldo Cerqueira Braz

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marne Carvalho de Vasconcellos

Botucatu, São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Paes, Éllen Regina da Costa.

Avaliação de genotoxicidade e estresse oxidativo em profissionais recém-expostos aos resíduos de gases anestésicos / Éllen Regina da Costa Paes. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Reinaldo Cerqueira Braz

Capes: 40102130

1. Stress oxidativo. 2. Anestésicos. 3. Toxicologia. 4. Pessoal da área médica – Avaliação de risco de saúde. 5. Gases.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Gases anestésicos; Genotoxicidade; Risco ocupacional.

Com amor, aos meus filhos
Cléber Paes Pereira
e Pâmela Paes Pereira

Agradecimentos

Este trabalho é resultado de significativas contribuições que obtive durante minha caminhada profissional e principalmente como cidadã, convivendo com pessoas e instituições que apoiaram a construção deste. Portanto, a presente tese não é resultado apenas de um trabalho individual.

Agradeço a minha família, minha mãe Luiza Francisca da Costa Paes e minha irmã Luciana Maria Melo de Lima e principalmente meu pai Davi da Rocha Paes (que faleceu no meio desta caminhada e a qual ele sonhava que eu concluísse- pai você estará sempre no meu coração) pelo apoio, compreensão e orações.

Meu agradecimento e homenagem carinhosa ao meu orientador Prof. Dr José Reinaldo Cerqueira Braz e a minha co-orientadora Profa Dra Marne Carvalho de Vasconcellos pela paciência e orientação durante a construção desta tese.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima pelo apoio recebido durante minha caminhada na construção desta tese.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Westphal, Coordenador do DINTER.

A PROPESP/UFAM e a FMB/UNESP pela oportunidade.

À Pesquisadora Mariana Gobbo Braz e demais colegas da UNESP pelo apoio.

À equipe do Departamento de Anestesiologia da FMB/UNESP, na pessoa da Neli Aparecida Pavan, pelo apoio.

Às secretárias do DINTER Romy Pinho e Thaís Viana, pelo apoio.

Ao Dr. Vanderson Antonio Barbosa de Araújo, Coordenador da COREME (Comissão de Residência Médica do Hospital Universitário Getúlio Vargas) e sua equipe.

Aos residentes e farmacêuticos do Hospital Universitário Getúlio Vargas/UFAM e aos alunos da Faculdade Ciências Farmacêuticas/UFAM, que contribuíram de forma essencial (doando sangue) para o desenvolvimento desta tese.

Meu carinho e agradecimento pelas valiosas contribuições de Camila Fabbri, Rita Neto, Patricia Danielle Almeida, Tatiana Pedrosa, Ana Carolina Ralph, Gisele, Vitor Renato Silva e Gleyce Barbosa.

Meu agradecimento e carinho especial para Joilson Lima, Milana Reis e Leilane Bentes, sem vocês tudo se tornaria mais difícil.

A todos os meus alunos da FCF (Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UFAM) pelo carinho e torcida.

À direção da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na pessoa da Profa Dra Maria de Meneses Pereira, colegas e demais funcionários pelo apoio.

Aos colegas de turma do doutorado, principalmente Maria Ermelinda Filgueiras e Miharu Matsuura, pelo carinho e companheirismo durante a caminhada.

À Capes pelo incentivo a formação de novos doutores.

Resumo

Profissionais expostos ocupacionalmente a longos períodos de exposição aos resíduos de gases anestésicos apresentam alterações no genoma. Os dados existentes na literatura em relação ao estresse oxidativo desses profissionais são escassos. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a genotoxicidade e o estresse oxidativo em profissionais recém-expostos aos resíduos de gases anestésicos. O estudo foi realizado em 15 médicos residentes da Anestesiologia e Cirurgia, de ambos os sexos, os quais estiveram sob exposição aos resíduos de gases anestésicos isoflurano, sevoflurano e óxido nitroso (N₂O). Como grupo controle, 15 voluntários que não frequentavam o ambiente hospitalar foram avaliados. Coletas de sangue foram realizadas após oito, 16 e 22 meses de exposição no grupo exposto e uma vez no grupo controle. Para avaliação da genotoxicidade, utilizou-se o teste do cometa para detecção de quebras de fitas no DNA. Para avaliação de estresse oxidativo foram determinados o conteúdo total de tióis e as proteínas carboniladas, além das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px). A exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos mostrou-se genotóxica nos três períodos de exposição avaliados em relação ao grupo controle. Quanto às proteínas carboniladas, houve diminuição significativa de seus valores no grupo de residentes após 16 meses de exposição em relação ao grupo controle. O conteúdo total de tióis foi significativamente maior no grupo exposto após 22 meses de exposição, quando comparado ao grupo controle. Em relação ao sistema de defesa antioxidante, não foram detectadas diferenças significativas de SOD e CAT entre os grupos. A GSH-Px aumentou no grupo exposto nos dois últimos períodos de avaliação dos residentes, comparado ao grupo controle. Em conclusão, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, que residentes expostos aos resíduos de gases anestésicos apresentam aumento de danos no DNA e alteração no sistema de defesa antioxidante.

Palavras chaves: Genotoxicidade, estresse oxidativo, risco ocupacional, gases anestésicos.

Abstract

Professionals occupationally exposed for several years to waste anesthetic gases present damages in the genome. Literature data regarding oxidative stress in operating room personnel are scarce. The aim of this study was to evaluate the genotoxicity and oxidative stress in professionals newly exposed to waste anesthetic gases. The study was conducted in 15 residents of Anesthesiology and Surgery, of both sexes, who were exposed to the following waste anesthetic gases: isoflurane, sevoflurane and nitrous oxide (N₂O). As a control group, 15 volunteers who did not attend to the hospital were evaluated. Blood samples were collected after eight, 16 and 22 months of exposure in the medical residents and at once in the control group. For genotoxicity, the comet assay was utilized to detect DNA breaks. For oxidative stress, carbonyl protein and total thiols, besides antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were evaluated. Occupational exposure to waste anesthetic gases shown to be genotoxic in all exposure times compared to the control. A significant decrease of carbonyl proteins after 16 months of exposure was detected in the group of residents, when compared to the control group. The thiols were significantly higher in the exposed group after 22 months of exposure, when compared to the control group. Regarding the antioxidant defense system, no significant differences were found in SOD and CAT between groups. GSH-Px increased in the exposed group after 16 and 22 months compared to the control group. The current study showed for the first time that waste anesthetic gases increased DNA damage and changed antioxidant defense in medical residents exposed up to 2 years.

Keywords: Genotoxicity, oxidative stress, occupational risk, anesthetic gases

Lista de figuras

Figura 1: Etapas da carcinogênese	16
Figura 2: Formação de radicais livres (espécies reativas do oxigênio) e mecanismos antioxidantes biológicos.	24
Figura 3: Defesa antioxidante enzimática exercida pelas enzimas SOD, CAT e GSH-Px.	25
Figura 4: Protocolo do teste cometa e escore dos nucleóides analisados.....	31
Figura 5: Valores de proteínas carboniladas segundo grupos e momentos.....	39
Figura 6: Conteúdo total de tióis-SH segundo grupos e momentos.....	39
Figura 7: Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase segundo grupos e momentos.....	40
Figura 8: Atividade da enzima antioxidante catalase segundo grupos e momentos.....	41
Figura 9: Atividade da enzima glutathione peroxidase segundo grupos e momentos.....	42
Figura 10: Danos no DNA (<i>boxplot</i>) de linfócitos, avaliados pelo teste do cometa, em ambos os grupos avaliados.....	50
Figura 11: Correlação de danos no DNA e valores de enzima antioxidante GSH-Px no grupo de residentes expostos durante o período de 22 meses.....	51
Figura 12: Correlação de danos no DNA e valores de tióis no grupo de residentes expostos durante o período de 22 meses.....	51

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características das populações estudadas	38
Tabela 2 - Distribuição de frequência dos indivíduos segundo sexo nos grupos estudados	39

Lista de abreviaturas e siglas

Abs	Absorbância
AC	Aberrações Cromossômicas
C	Celsius
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2-4- dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	Colaboradores
DP	Desvio padrão
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EUA	Estados Unidos da América
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
g	Grama
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione na forma reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H	Hora
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LMP	Baixo ponto de fusão
l	Litro

M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligrama
MN	Micronúcleo
mM	Micromolar
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
N ₂ O	Óxido nitroso
nm	Nanômetro
nmol	Nanomolar
NIOSH	<i>National Institute of Occupational Safety and Health</i>
OH [•]	Radical hidroxila
O ₂ [•]	Ânion superóxido
PBS	Tampão fosfato alcalino
PC	Proteína carbonilada
pH	Potencial hidrogênico
ppm	Parte por milhão
RL	Radicais livres
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TCI	Troca entre cromátides irmãs
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U	Unidade
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
V	Volt

KH_2PO_4	Potássio fosfato monobásico
Na_2HPO_4	Monoidrogenofosfato de sódio

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Efeitos da Exposição Ocupacional aos Anestésicos	22
1.2 Estresse Oxidativo e Exposição Ocupacional aos Anestésicos.....	24
1.3 Relevância da Avaliação da Exposição Ocupacional aos Anestésicos.....	27
2 OBJETIVO.....	29
3 MÉTODO	30
3.1 Coleta do Material Biológico.....	30
3.2 Técnicas Utilizadas.....	30
3.2.1 Teste do cometa.....	30
3.2.2 Testes bioquímicos.....	32
3.2.2.1 <i>Proteínas carboniladas</i>	32
3.2.2.2 <i>Conteúdo total de tióis</i>	33
3.2.2.3 <i>Glutathione peroxidase</i>	35
3.2.2.4 <i>Catalase</i>	36
3.2.2.5 <i>Superóxido dismutase</i>	37
3.3 Análise Estatística.....	38
4 RESULTADOS.....	39
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	56

1 INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana. Os impactos causados por agentes tóxicos ambientais na saúde, muitas vezes, não podem ser observados e medidos diretamente. A informação obtida nas análises de risco nos permite estimar e comparar esses impactos (Silva & Fonseca, 2003).

Todos os organismos vivos estão em interação com o meio ambiente, sendo o seu genoma exposto às interações que esse meio sofre. Assim, o DNA celular é submetido a uma série de agressões, tanto de natureza endógena quanto exógena. Como consequência principal da exposição aos agentes agressores, tem-se a indução de efeitos tóxicos e mutagênicos que, no entanto, são passíveis de serem minimizados por mecanismos de defesa celular (Sakamoto-Hojo et al., 2003).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar interligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (Salvadori et al., 2003).



Figura 1: Etapas da carcinogênese (adaptado de INCA, 2002)

1.1 Efeitos da Exposição Ocupacional aos Anestésicos

Nas décadas de 1940 e 1950 houve grande evolução na síntese de anestésicos inalatórios a partir de hidrocarbonetos. A halogenação destes compostos, que consiste em substituir átomos de hidrogênio por átomos de flúor ou cloro, resulta na formação de substâncias com propriedades anestésicas (Saraiva, 2003).

A exposição ocupacional aos anestésicos halogenados e ao óxido nitroso (N_2O) em profissionais que atuam no centro cirúrgico (anestesiologistas, cirurgiões, enfermeiros e auxiliares técnicos) e consultórios odontológicos (dentistas e auxiliares técnicos) pode resultar em efeitos adversos à saúde. Embora esses profissionais estejam expostos às concentrações anestésicas muito menores do que os pacientes, essa exposição pode se estender por muitos anos. Os anestésicos atualmente utilizados, embora sejam rapidamente eliminados do organismo, por apresentarem baixa solubilidade no sangue e tecidos, podem ocasionar alterações hematopoiéticas (Sweeney et al., 1985), hepáticas e renais (Cohen et al., 1980; Green et al., 1981; Franco et al., 1991), alterações neurocomportamentais (Lucchini et al., 1996), além de irritabilidade, fadiga e cefaléia (ISSA, 2002).

Vaisman (1967) relatou, pela primeira vez, efeitos adversos dos anestésicos inalatórios relacionados à reprodução humana, com aumento da ocorrência de aborto espontâneo em anestesiologistas. Outros autores também observaram que a contínua exposição aos gases anestésicos é fator de risco ao processo reprodutivo, com redução da fertilidade e aumento de defeitos congênitos (Tannenbaum & Goldberg, 1985; Guirguis et al., 1990; Rowland et al., 1992; Rowland et al., 1995; Boivin, 1997).

Várias análises foram realizadas na tentativa de se estimar a frequência de câncer em profissionais expostos aos anestésicos. Uma delas foi a da *American Society of Anesthesiologists* (ASA, 1974) que realizou estudo retrospectivo em 49.595 indivíduos que trabalhavam em centros cirúrgicos em todos os estados norte americanos. Verificou-se aumento de 1,3 a 2 vezes na frequência de câncer em mulheres expostas quando comparadas ao grupo não exposto.

Para minimizar os riscos à saúde, as autoridades públicas recomendam valores limites aos resíduos de gases de anestésicos inalatórios. Os limites de exposição recomendados pelo *National Institute of Occupational Safety and Health* (NIOSH), dos EUA, são de 25 ppm para o óxido nitroso (N_2O) e de 2 ppm para os anestésicos halogenados. O valor limite para os anestésicos voláteis é reduzido com o emprego concomitante de N_2O (NIOSH, 1977). Já os limites recomendados para os anestésicos

inalatórios na Europa são consideravelmente maiores, de 5 a 50 ppm na média de trabalho de 8 horas diárias (Hoerauf et al., 1996). No entanto, concentrações dentro dos limites estabelecidos (11,8 ppm de N₂O e 0,5 ppm de isoflurano) durante média de 8 horas diárias, aumentou a frequência de troca entre cromátides irmãs (TCI) (Hoerauf et al., 1999a).

No Brasil, não existem valores limites para exposição ocupacional aos gases anestésicos e nem recomendações a respeito de como proceder a monitoração ambiental ou sua periodicidade (Oliveira, 2009).

Embora sem comprovação clínica direta, a exposição crônica às concentrações ambientais de N₂O e de anestésicos halogenados tem sido associada à genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (Corbett, 1976; Baden & Simmon, 1980; Sardas et al., 1992; Wiesner et al., 2001).

A associação entre a exposição aos resíduos de gases anestésicos e a incidência de alterações no genoma tem sido avaliada. Vários autores (Sardas et al., 1998; 2006; Chandrasekhar et al., 2006; Wrońska-Nofer et al., 2009), ao utilizarem o teste do cometa, verificaram aumento significativo de quebras no DNA em linfócitos de profissionais expostos aos resíduos de gases anestésicos.

Vários estudos em profissionais que trabalham em centros cirúrgicos identificaram aumento da frequência de aberrações cromossômicas (AC) (Bonassi et al., 1997; Rozgaj et al., 1999; 2001; 2009; Rozgaj & Kasuba, 2000; Chinelato & Froes, 2002, Chandrasekhar et al., 2006), assim como de micronúcleos (MN) (Chang et al., 1996; Bilban et al., 2005; Lewinska et al., 2005; Chandrasekhar et al., 2006; Rozgaj et al., 2009).

Por outro lado, Wiesner et al. (2001) não observaram aumento significativo da frequência de MNs em profissionais expostos a resíduos de gases anestésicos com baixas concentrações de N₂O (12 ppm) e dos anestésicos inalatórios isoflurano, sevoflurano e desflurano (<0,5 ppm), mas observaram aumento da frequência de MNs em concentrações elevadas de N₂O (170 ppm) e de anestésicos inalatórios (4 ppm). De maneira semelhante, Wiesner et al. (2008), em anestesiológicos expostos a baixas concentrações de resíduos do anestésico halogenado sevoflurano (0,2 ppm), não observaram aumento significativo na frequência de MNs, mas apenas de trocas entre cromátides irmãs (TCI). Por outro lado, Hoerauf et al. (1999b) verificaram, em cirurgiões veterinários que trabalhavam em salas de operação contendo, em média, 25 ppm de N₂O e 2 ppm de isoflurano, que não houve aumento na frequência de MNs, mas sim de TCI em linfócitos de sangue periférico, em relação ao grupo de voluntários

não exposto. De forma semelhante, Eroglu et al. (2006) verificaram aumento na frequência de TCI em anestesiológicos que trabalharam em salas de operação com N_2O e sevoflurano com valores superiores aos do limite recomendado de resíduos dos anestésicos, em relação aos profissionais não expostos. Esses mesmos autores observaram diminuição na frequência de TCI dos anestesiológicos após dois meses de afastamento do trabalho. Por outro lado, outros trabalhos não verificaram aumento significativo na frequência de TCI em profissionais expostos (Husum & Wulf, 1980; Bozkurt et al., 2002; Chinelato & Froes, 2002; Bilban et al., 2005).

1.2 Estresse Oxidativo e Exposição Ocupacional aos Anestésicos

O metabolismo humano produz espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminação do agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (Vasconcelos et al., 2007).

A formação de radicais livres (RL)/ERO e os mecanismos antioxidantes biológicos estão apresentados na Figura 2. As RL/ERO mais importantes são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH^\bullet$) e o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que são altamente reativos. Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes, retardam ou inibem a oxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999). Podem ser de dois tipos principais, os enzimáticos (superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT, glutathione peroxidase-GSH-Px) e os não enzimáticos (carotenóides, tocoferol, ácido ascórbico, selênio, ácido úrico, etc).

O estresse oxidativo é decorrente do desequilíbrio entre a formação de RL ou ERO e o sistema de defesa antioxidante. As ERO interagem com as macromoléculas, isto é, proteínas, lipídios e bases de DNA, modificando sua estrutura ou função, podendo levar às anormalidades celulares (Kehrer, 2000).

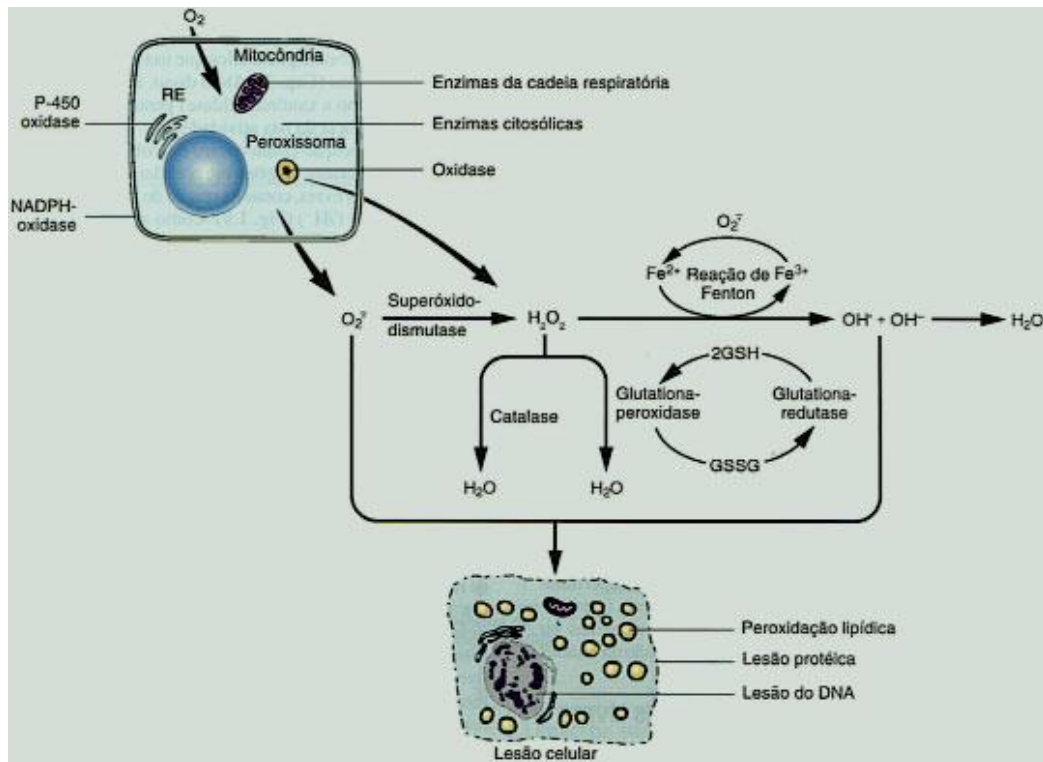


Figura 2: Formação de radicais livres (espécies reativas do oxigênio) e mecanismos antioxidantes biológicos. Adaptado de www.medstudents.com.br

A SOD foi a primeira enzima metabolizadora de ERO a ser descoberta (McCord & Fridovich, 1969). A conversão de $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e O_2 (dismutação) pela SOD é frequentemente chamada de defesa primária contra o estresse oxidativo, porque o ânion superóxido é forte iniciador de reações em cadeia.

Embora o H_2O_2 não seja um verdadeiro ERO, pode reagir com metais redox ativos como ferro e cobre, produzindo novos ERO. Além disso, tem meia vida longa e grande capacidade de se difundir através das membranas celulares (Andrade Junior et al., 2005). A CAT localiza-se predominantemente em peroxissomos, onde catalisa a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 .

A GSH-Px é encontrada principalmente no citosol e nas mitocôndrias e é a principal enzima de remoção do H_2O_2 produzido fora dos peroxissomos. Ela catalisa a redução de H_2O_2 em H_2O utilizando glutathiona, na sua forma reduzida (GSH) como substrato. Quando a GSH é oxidada na reação, haverá a formação de GSSG (glutathiona oxidada).

Assim, o equilíbrio entre a atividade das três principais enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px é de extrema importância para a remoção dos intermediários tóxicos de oxigênio dos sistemas biológicos. A atividade da SOD deve ser

complementada pela CAT e GSH-Px, gerando H_2O e O_2 ou GSSG (Simon-Giavarotti, 2001). A Figura 3 esquematiza a ação das enzimas antioxidantes sobre os RL/ERO.

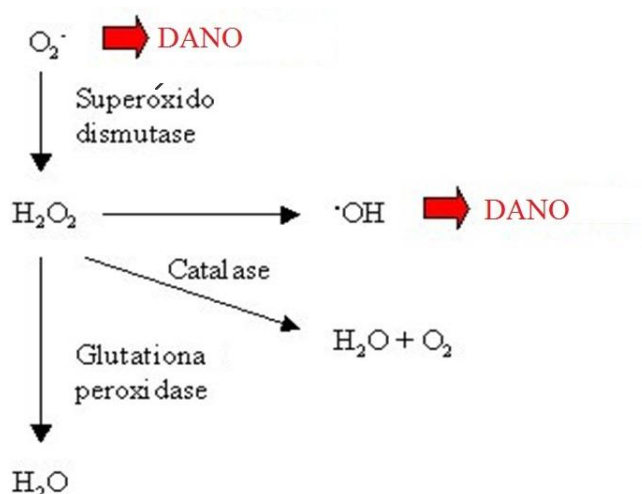


Figura 3: Defesa antioxidante enzimática exercida pelas enzimas SOD, CAT e GSH-Px. Adaptado de www.ebi.ac.uk

As proteínas também podem ser alvos de ataque dos RL/ERO. A oxidação de alguns aminoácidos - como lisina e arginina - resulta na formação de derivados carbonílicos, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína. Desse modo, o conteúdo de carbonila significativo no plasma humano pode ser considerado importante marcador de presença de ERO e de possível estresse oxidativo.

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tenha grande importância nos processos de transformação e morte celular, envelhecimento, doenças crônicas e câncer (Vasconcelos et al., 2007).

Poucos são os trabalhos na literatura que avaliaram o estresse oxidativo em profissionais expostos aos resíduos de gases anestésicos. Recentemente, em enfermeiras expostas a concentrações elevadas de N_2O , verificou-se diminuição da atividade antioxidante e aumento de danos oxidativos no DNA (Wrońska-Nofer et al., 2012). Türkan et al. (2005) verificaram diminuição significativa do sistema de defesa antioxidante plasmática e eritrocitária em profissionais expostos aos resíduos de gases anestésicos por no mínimo três anos em relação ao grupo controle. Diferentemente, Malekiran et al. (2005) observaram em profissionais expostos, que houve aumento da

peroxidação lipídica plasmática mas não da capacidade antioxidante. Baysal et al. (2009), em profissionais expostos a diferentes halogenados e ao N₂O, com atuação de três a 11 anos em centro cirúrgico, verificaram que houve correlação negativa entre danos no DNA e capacidade antioxidante. Apesar de controversa e pouco estudada, a suplementação da dieta com vitaminas C (500 mg/dia) e E (300 mg/dia), por período de 12 semanas, diminuiu os danos no DNA em profissionais que atuam em centro cirúrgico (Sardas et al., 2006).

1.3 Relevância da Avaliação da Exposição Ocupacional aos Anestésicos

O biomonitoramento humano tem sido empregado como instrumento útil na identificação e quantificação de risco com relação às exposições que conferem riscos à saúde. São escassos os dados existentes na literatura que consideram o monitoramento citogenético e a exposição profissional aos gases anestésicos. No Brasil, em especial, há apenas um trabalho referente a este tipo de estudo (Chinelato & Froes, 2002). Adicionalmente, devem-se considerar as diferenças existentes entre os procedimentos anestesiológicos e as condições de trabalho entre os diferentes países. Assim, os profissionais que atuam em centro cirúrgico estão expostos à quantidade variável de resíduos anestésicos por períodos também variáveis.

A totalidade das pesquisas que envolvem a exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos foi realizada em anestesiológicos e outros profissionais que atuam em centros cirúrgicos por períodos de tempo variáveis, mas sempre iguais ou superiores a três anos, tendo a maioria de 10 a 20 anos de atuação profissional. Em duas pesquisas que incluíram também profissionais com atuação recente (um ano) no centro cirúrgico, foram também incluídos profissionais com longo tempo de atuação, sem que houvesse diferenciação dos resultados por ano de atuação (Sardas et al., 1998; Eroglu et al., 2005).

Dessa forma, é importante a realização de estudo para o biomonitoramento em profissionais recém-expostos (residentes) atuantes em centro cirúrgico. Assim, com a hipótese de que a exposição aos resíduos de gases anestésicos determina alterações no material genético e induz estresse oxidativo mesmo em profissionais recentemente expostos (residentes), foi proposto a realização do presente estudo.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade e o estresse oxidativo em residentes de Anestesiologia e Cirurgia, expostos aos resíduos de gases anestésicos.

3 MÉTODO

Após aprovação do protocolo de estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Amazonas - UFAM (0044.0.115.000-10) e obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; apêndice a), o estudo prospectivo foi realizado em 15 médicos residentes da Anestesiologia e Cirurgia (Cirurgia geral, Neurocirurgia e Ortopedia), do sexo feminino e masculino, que tiveram exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos (isoflurano, sevoflurano e N₂O) durante o período de dois anos no centro cirúrgico, e em 15 voluntários (universitários da UFAM) que não frequentavam o ambiente hospitalar.

A todos os participantes foi aplicado questionário (apêndice b) sobre história médica e estilo de vida. Para o grupo exposto também foram feitas questões relativas ao tempo de exposição ocupacional e período de trabalho semanal no centro cirúrgico. Foram excluídos do estudo portadores de qualquer doença e os que faziam uso regular de álcool, tabaco e “drogas ilícitas”.

O centro cirúrgico do Hospital Universitário Getúlio Vargas da UFAM, em Manaus, onde foi realizado o estudo, possui sete salas de operação sem sistema *scavenging* ativo (exaustão e renovação de ar) dos gases anestésicos.

3.1 Coleta do Material Biológico

Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos com EDTA de ambos os grupos. Para o grupo controle, apenas uma coleta foi realizada, enquanto que para o grupo exposto as coletas foram realizadas após oito, 16 e 22 meses do início da exposição aos resíduos de gases anestésicos. Todas as amostras foram codificadas e as análises foram realizadas sem que o avaliador soubesse a que grupo e tempo de exposição pertenciam.

3.2 Técnicas Utilizadas

3.2.1 Teste do cometa

Para o isolamento de linfócitos, foram adicionados 3ml de sangue em tubo Falcon e no mesmo tubo foram adicionados 5ml de solução salina (PBS). Transferiu-

se, lentamente, a mistura para um segundo tubo contendo 3ml de ficol. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, observou-se a formação de três camadas: plasma, linfócitos e hemácias; transferiu-se o halo esbranquiçado contendo os linfócitos para um tubo Falcon. Completou-se o volume para 11ml com PBS e centrifugou-se por 20 minutos a 1000rpm. Observou-se a formação de um *pool* de células no fundo do tubo. Retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 2ml de PBS.

O teste cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações, sempre com proteção da luz. Para o pré-tratamento das lâminas, dissolveu-se a agarose (ponto de fusão normal), que em seguida foi colocada em banho-maria a 60°C. As lâminas foram mergulhadas em agarose e, após secagem, as lâminas foram armazenadas para utilização posterior.

Preparou-se solução de lise-estoque (2,5M NaCl, 10mM tris, 100mM EDTA, NaOH) duas horas antes do uso, que foi armazenada em geladeira. Dissolveu-se a agarose baixo ponto de fusão (LMP) e manteve-se à 37°C. Vinte microlitros de linfócitos foram misturados a 90µl da agarose LMP em tubo tipo *ependorf* e transferiu-se a mistura para lâmina previamente preparada, cobrindo-a com lamínula. As lâminas permaneceram a 4°C para solidificação da agarose; em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de lise (1ml de triton X-100, 10ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH10) por, no mínimo, uma hora em geladeira.

Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão (300mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) recém preparada e gelada. Para o relaxamento da molécula do DNA, as lâminas permaneceram por 20 minutos na cuba antes da corrida de eletroforese, que foi conduzida por 20 minutos, a 25 V e 300 mA. Ao fim da eletroforese, as lâminas foram lavadas com PBS, adicionadas à solução de neutralização (tris 0,4M e HCl, pH 7,5) por 15 minutos, fixadas em etanol a 100% por 10 minutos e armazenadas até o momento da análise. As etapas do ensaio cometa estão demonstradas na Figura 4.

Para a análise, as lâminas foram coradas com *sybr green* (1:500 concentração inicial de 10000 X, 0,06 µl por lâmina). Cinquenta nucleóides foram analisados em microscópio de fluorescência invertido (Leica DMIL LED 6000, Suíça) na objetiva de 400X. A análise foi realizada de acordo com escores, sendo os nucleóides classificados de acordo com a percentagem de DNA na cauda, indicando o grau de quebra do DNA nas seguintes categorias: 0 = sem danos (<5%); 1 = baixo nível de danos (5% – 20%); 2 = médio nível de danos (20% a 40%); 3 = alto nível de danos (40% a 95%); 4 = dano

total (>95%). Para o cálculo do Índice de Dano admite-se a seguinte fórmula: $ID = [(N^{\circ} \text{ de nucleóides classe } 0 \times 0) + (N^{\circ} \text{ de nucleóides classe } 1 \times 1) + (N^{\circ} \text{ de nucleóides classe } 2 \times 2) + (N^{\circ} \text{ de nucleóides classe } 3 \times 3) + (N^{\circ} \text{ de nucleóides classe } 4 \times 4)]$.

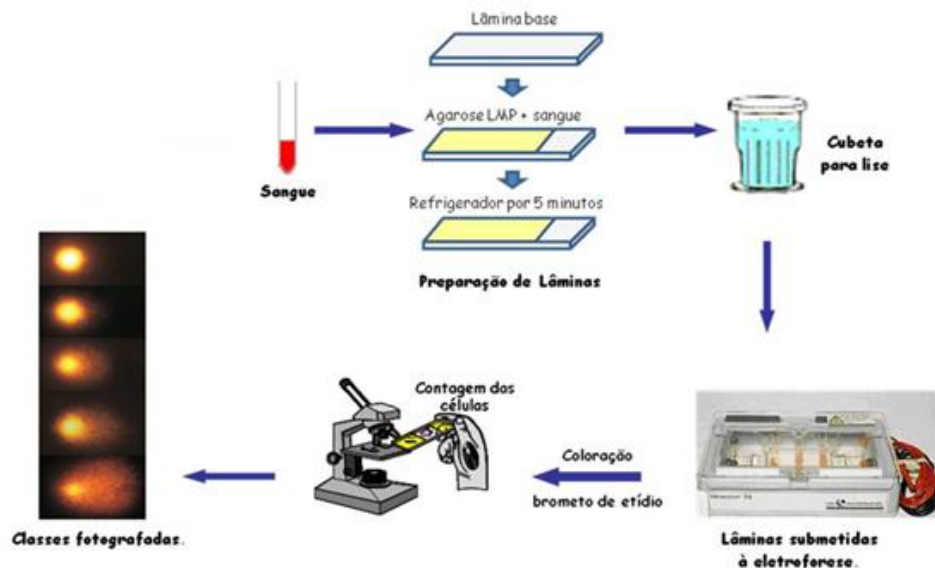


Figura 4: Protocolo do teste cometa e score dos nucleóides analisados (0: sem danos a 4: máximo de danos) - modificado de <http://biorocha.blogspot.com.br>

3.2.2 Testes bioquímicos

Utilizaram-se testes bioquímicos para avaliação do estresse oxidativo e do sistema de defesa antioxidante dos profissionais expostos e controle.

3.2.2.1 Proteínas carboniladas

As dosagens das proteínas foram feitas de acordo com Bradford (1976). Para determinação de proteínas carboniladas, o sangue foi centrifugado por 3000 rpm a 20 minutos em 4°C. Em tubo *ependorf* foram colocados 800µl de 2,4 – dinitrofenilhidrazina (DNPH) e 200µl do plasma para que ocorresse a reação do DNPH com as carbonilas. Para cada amostra foi utilizado outro *ependorf* com plasma, denominado branco ou controle, cuja finalidade foi determinar a proteína total da amostra. Utilizou-se 200µl de plasma e 800µl de HCl (2,5M). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 300 rpm por um minuto, incubados por uma hora em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo agitados a cada 15 minutos. Adicionou-se um ml de

ácido tricloroacético (TCA) a 20% nos tubos contendo amostra e o branco (controle), e os tubos foram agitados com auxílio de vórtex e acondicionados em gelo por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a 500 rpm. Foi descartado o sobrenadante de cada um dos tubos, restando apenas o precipitado branco ou controle. O *pellet* do controle foi diluído em 100µl de água destilada para posterior análise das proteínas. Foram acrescentados, ao *pellet* da amostra, 800µl de TCA a 10%, sendo o tubo agitado em vórtex. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4°C por cinco minutos a 5000 rpm. O *pellet* da amostra foi lavado três vezes com um ml de etanol/acetato de etila (1:1). Em cada lavagem, o *pellet* foi dissolvido com auxílio de uma espátula e os tubos foram agitados em vórtex. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm (etapa repetida duas vezes). Após a última lavagem, adicionou-se 500µl de hidróclorido de guanidina a cada um dos tubos, sendo após agitados e centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm. Transferiu-se 220µl do sobrenadante da amostra e do controle para dois poços de microplaca contendo 96 poços e analisou-se em leitor Elisa (*Beckman Coulter DTX – 800 Multimode detector*, Alemanha). Os resultados das absorbâncias (Abs) foram transformados de nmol/ml em mg/ml.

Para os cálculos, utilizou-se:

$$\text{Proteínas Carboniladas (PC) (nmol/ml)} = \frac{\text{CA}}{0,022^*} \times 2,5$$

* é o coeficiente para dinitrofenilhidrazina em 370 nm

Onde: **CA** = Abs. amostra – Abs. controle

REFERÊNCIA: 0,5 – 4,0 nmol/ml

3.2.2.2 Conteúdo total de tióis

Três tubos *ependorf* foram utilizados respectivamente para teste, padrão e branco. Em cada tubo acrescentou-se 300µl de tampão (0,25mM Tris, 20mM EDTA, 3mg de TRIS e 0,75g de EDTA para 100ml de água miliQ, pH 8,2). Após, foram acrescentados 3,8µl de DTNB (0,1M DTNB diluído em 3ml de etanol a 96%). No tubo

teste, adicionou-se 7,5µl da amostra (plasma), no tubo padrão adicionou-se 7,5µl de GSH (0,5mM GSH - pesou-se 1,5mg do padrão e diluiu-se em 10ml do tampão). No tubo branco adicionou-se 7,5µl de água destilada. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após, foram transferidos para microplaca de 96 poços e o teste foi lido em absorbância em 412nm – Leitor de microplaca com filtro para 405nm (±10) no aparelho Elisa (*Beckman Coulter DTX – 800 Multimode detector*, Alemanha).

Para o cálculo, utilizou-se a fórmula:

$$(500/\text{abs Padrão}) \times \text{abs Amostra} = \text{concentração amostra em } \mu\text{mol/l}.$$

3.2.2.3 *Glutathione peroxidase (GSH-Px)*

A metodologia da GSH-Px foi realizada conforme proposição de Paglia & Valentine (1967), utilizando-se o *kit* Ransel (*Randox*, Reino Unido).

Reconstituiu-se o reagente 1 (glutathione 4mmol/l), glutathione reductase (>0,5U/l), NADPH (0,34mmol/l) com volume apropriado no tampão (tampão fosfato 0,5mol/l; pH 7,2 e EDTA 4,3mmol/l). Preparou-se o hidróxido de cumeno diluindo 10µl em 10ml de água redestilada sob forte agitação. Reconstituiu-se o agente diluente 4 (4x200ml) com 200ml de água redestilada. Diluiu-se 0,05ml da amostra (sangue total) com 1ml de agente diluente (solução 4) seguido de incubação por 5 minutos. Após, acrescentou-se 1ml do reagente de *Drabkin* (Cat. número SC 181 previamente diluído em 480ml de água redestilada).

No teste, utilizou-se o comprimento de onda de 340nm, uma cubeta com 1cm para fluxo de luz, temperatura de 37°C. Nas cubetas macro (amostra diluída) foram acrescentados 0,05ml da amostra diluída, glutathione 2,5ml e hidróxido de cumeno 0,10ml. No reagente branco acrescentaram-se 0,05ml de água destilada, 2,50ml da glutathione e hidróxido de cumeno 0,10ml. Na cubeta semi-micro (amostra diluída) acrescentaram-se 0,02ml da amostra diluída, da glutathione 1ml e hidróxido de cumeno 0,04ml. Foram adicionados, no reagente branco, 0,02ml de água destilada, 1ml de glutathione e 0,04 ml de hidróxido de cumeno.

Após homogeneização, fez-se a leitura da absorbância inicial das amostras e do reagente branco. Após um minuto foi iniciado o tempo da reação. Simultaneamente, após 1 e 2 minutos leu-se e subtraiu-se o valor do reagente branco com o valor da amostra. A determinação ocorre com a diminuição da absorbância no comprimento de

onda de 340nm. O teste foi lido em espectrofotômetro *UV/Visible Spectrophotometers model T70 PG instruments Limited* (Inglaterra).

A concentração de glutathione peroxidase foi calculada pela fórmula:

$$\text{U/I de hemolisado} = 8412 \times \Delta A_{340 \text{ nm/min}}$$

Referências:

4171 – 10881 U/I

27,5 – 73,6 U/g Hb

3.2.2.4 Catalase (CAT)

A metodologia da CAT foi realizada conforme proposto por Aebi (1984). Utilizaram-se as soluções tampão fosfato 50mM, pH 7,0, dissolvido 6,81g de KH_2PO_4 e 8,90g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para 1000ml de água destilada. As soluções foram misturadas nas proporções de 1:1,5. Diluiu-se 30 mM de peróxido de hidrogênio (0,34ml de peróxido de hidrogênio a 30% com tampão fosfato 50mM, pH 7,0 para 100ml). Utilizou-se tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4 (tampão de lavagem).

Após cada coleta de sangue, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o plasma e a camada de leucócitos e preparou-se o concentrado de hemácias, o qual foi lavado por três vezes com solução gelada de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 na proporção de 1:1. Centrifugou-se novamente a 3000 rpm por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O hemolisado foi preparado na proporção 1:2, pela mistura de alíquotas de 0,5ml de concentrado de hemácias e água destilada.

Para a dosagem, preparou-se a amostra na proporção de 1:500, adicionando-se 4,9ml de tampão fosfato 50mM, pH 7,0, em 0,1ml do hemolisado. O aparelho *UV/Visible Spectrophotometers model T70 PG instruments Limited* (Inglaterra) foi zerado com o branco contendo 3,5ml do tampão e 0,5ml da amostra, gerando uma diluição 1:2000. Para a preparação do teste, adicionou-se 0,5ml da amostra em 2,5ml da solução tampão 50 mM, pH 7,0, acrescentando 1ml da solução de peróxido de hidrogênio (30mM). Homogeneizou-se diretamente na cubeta e iniciou-se a contagem do tempo a partir do momento em que a absorbância indicou valor positivo. As

amostras foram lidas em tempo 0 segundo no comprimento de onda de 240nm e no tempo 15 segundos. As amostras foram mensuradas entre 5 a 10 minutos.

Cálculo:

$$2,3/ \Delta t).(a/b).(logA1/A2)$$

Δt = variação do tempo (15 s)

a= fator de diluição final do teste (a = 2000)

b= concentração da hemoglobina da amostra em g/dl

A1= valor da absorbância em tempo 0s

A2= valor da absorbância em tempo 15s

A unidade expressa de catalase é k/ghb/min.

A determinação da concentração de Hb no hemolisado é fundamental para obtenção dos valores finais de CAT. Adicionou-se 100ul da amostra preparada a partir do hemolisado (1:10) e 2ml do reagente de *Drabkin* (bicarbonato de sódio, cianeto de potássio, ferrocianeto de potássio e água destilada). O composto formado (cianometahemoglobina) foi lido em 540nm, onde o coeficiente de extinção milimolar é 11,5 M/cm.

3.2.2.5 Superóxido dismutase (SOD)

Para a detecção da SOD, utilizou-se o *kit Ransod* (Randox, Inglaterra). Como reagente, utilizou-se o substrato misto (xantina, (2,4-iodofenil)-3- (4-nitroferol)-5- cloreto de feniltetrazólio), tampão (CAPS, EDTA), xantina oxidase e o padrão. As amostras foram preparadas, lavando-se as hemácias com tampão (0,01M), havendo formação de um concentrando de hemácias. Em um tubo, as hemácias foram lisadas com 40µl de água destilada gelada. Diluiu-se o hemolisado com tampão fosfato 0,01M pH 7,0 na proporção de 495µl de tampão para 5µl de amostra. Todas as diluições do preparo da amostra geraram um fator de diluição 1:400, que foi utilizado no cálculo final. O teste foi lido no comprimento de onda de 505nm, sendo a 1ª leitura anotada em 30s e a 2ª leitura em 10min. O teste foi lido em espectrofotômetro *UV/Visible Spectrophotometers model T70 PG instruments Limited* (Inglaterra).

Para o cálculo, realizou-se delta para amostra, padrão e branco

$$\text{Delta/min} = A_2 - A_1/10$$

Posteriormente, realizou-se o cálculo de % de inibição:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{100 - (\text{Delta amostra ou padrão/min} \times 100)}{\text{Delta/ min branco}}$$

A curva padrão foi plotada com os valores encontrados e depois comparados à porcentagem de inibição da amostra. O valor encontrado, em U/ml, foi multiplicado por 400 (fator de diluição da amostra).

3.3 Análise Estatística

O tamanho amostral baseou-se em estudos prévios (Chinelato & Froes, 2002; Braz et al., 2009). Utilizou-se o teste t de Student para comparação das características dos grupos, assim como para comparação dos grupos em relação aos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo (dados bioquímicos). A distribuição de frequência dos indivíduos segundo o sexo foi determinada pelo teste do qui-quadrado. Para os dados bioquímicos do grupo exposto foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Para os dados não paramétricos (teste do cometa), utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparação entre grupos e o teste de Friedman para comparação de períodos de exposição (grupo exposto). O teste de Pearson foi utilizado para correlação de dados. Os dados paramétricos estão apresentados como média ($\bar{X}$) $\pm$ desvio padrão (DP) e os não paramétricos em mediana, 25% (1º quartil) e 75% (3º quartil). Estabeleceu-se como nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

As variáveis de caracterização dos grupos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), exceto a variável idade, com o grupo exposto apresentando valores superiores ao do grupo controle (não exposto) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características das populações estudadas, com indicação do valor de p

Variáveis	Grupos		Valor de p
	Exposto	Controle	
Idade (anos)	28 ± 2	23 ± 4	$<0,001$
Altura (m)	$1,74 \pm 0,1$	$1,71 \pm 0,1$	0,2
Peso (kg)	78 ± 14	75 ± 19	0,7
Índice de massa corpórea (kg/m^2)	$25,5 \pm 4$	$25,6 \pm 5$	0,9

A distribuição de frequência de sexo não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 2).

A média de atuação no centro cirúrgico do grupo exposto foi de 30 horas semanais.

Quanto às proteínas carboniladas, houve diminuição significativa de seus valores no grupo de residentes após 16 meses de exposição em relação ao grupo controle (Figura 5). Não se observou diferença entre os três períodos de exposição no grupo de residentes ($p = 0,47$).

Tabela 2 – Distribuição de frequência dos indivíduos segundo o sexo nos grupos estudados

	Sexo		Total
	Feminino	Masculino	
Controle (n)	4	11	15
%	27	73	100
Exposto (n)	1	14	15
%	7	93	100
Total	5	25	30

p = 0,14

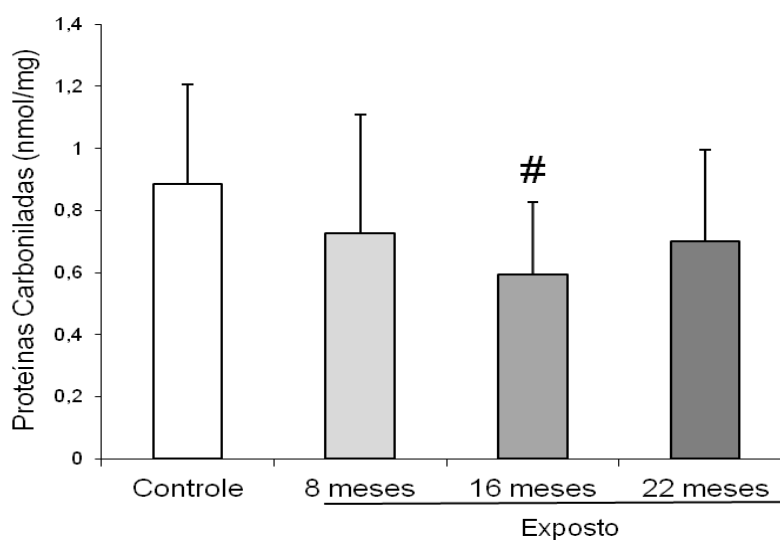


Figura 5: Valores ($X \pm DP$) de proteínas carboniladas segundo grupos e momentos. # p = 0,008 em relação ao grupo controle.

O conteúdo total de tióis foi significativamente maior no grupo exposto após 22 meses de exposição, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). No grupo

exposto, os valores foram significativamente maiores após 22 meses de exposição em relação aos demais períodos de exposição (Figura 6).

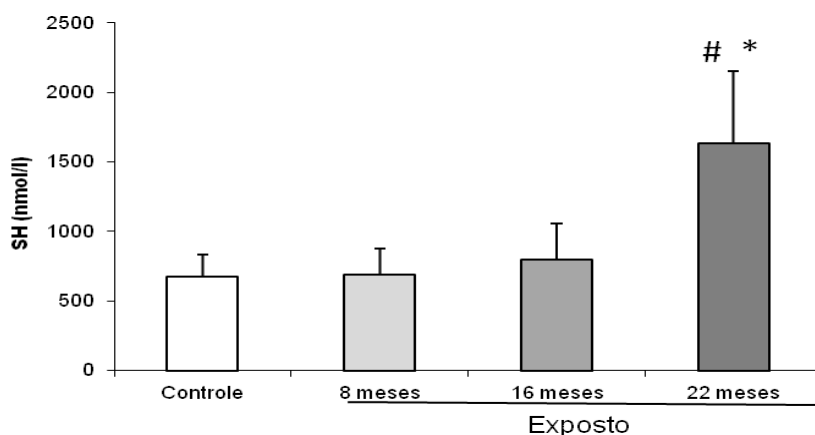


Figura 6: Conteúdo total de tióis-SH ($X \pm DP$) segundo grupos e momentos. [#] $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. * $p < 0,001$ em relação à exposição após 8 e 16 meses.

Em relação às enzimas antioxidantes, não foi detectada diferença significativa de SOD entre grupos e momentos ($p > 0,05$) (Figura 7). Para a CAT, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), mas houve redução significativa de seus valores após exposição de 22 meses em relação aos demais períodos de exposição (Figura 8). A GSH-Px aumentou no grupo exposto após 16 ($p = 0,03$) e 22 ($p < 0,001$) meses da exposição, comparado ao grupo controle. No grupo dos residentes houve, também, elevação significativa de seus valores após 22 meses de exposição em relação aos outros períodos de exposição (Figura 9).

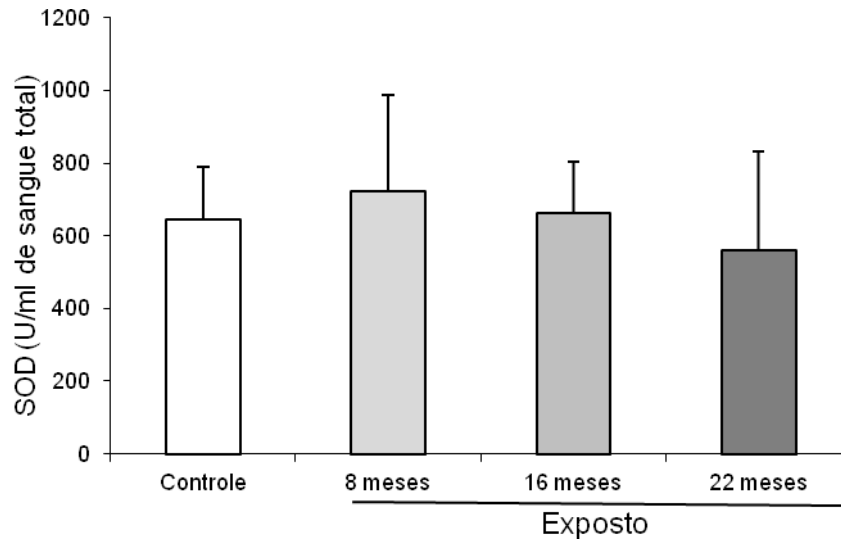


Figura 7: Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase ($X \pm DP$), segundo grupos e momentos. $p > 0,05$.

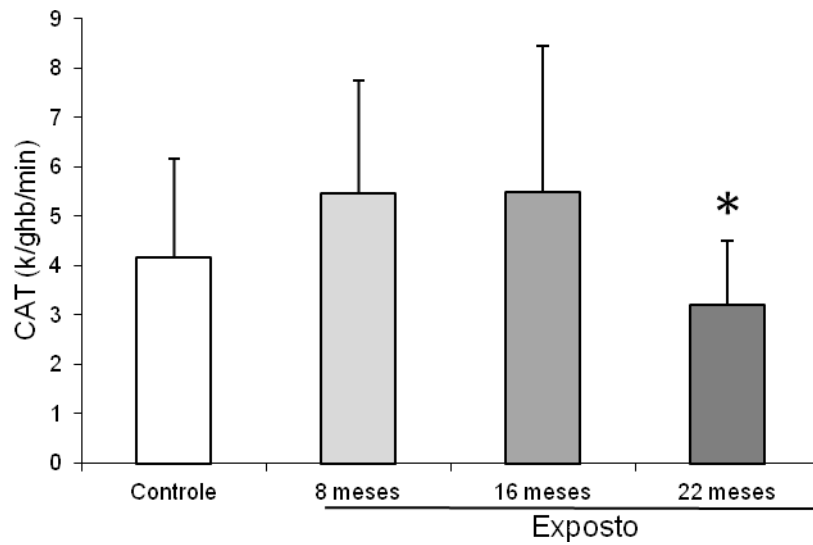


Figura 8: Atividade da enzima antioxidante catalase ($X \pm DP$), segundo grupos e momentos. * $p = 0,012$ em relação à exposição após 8 e 16 meses.

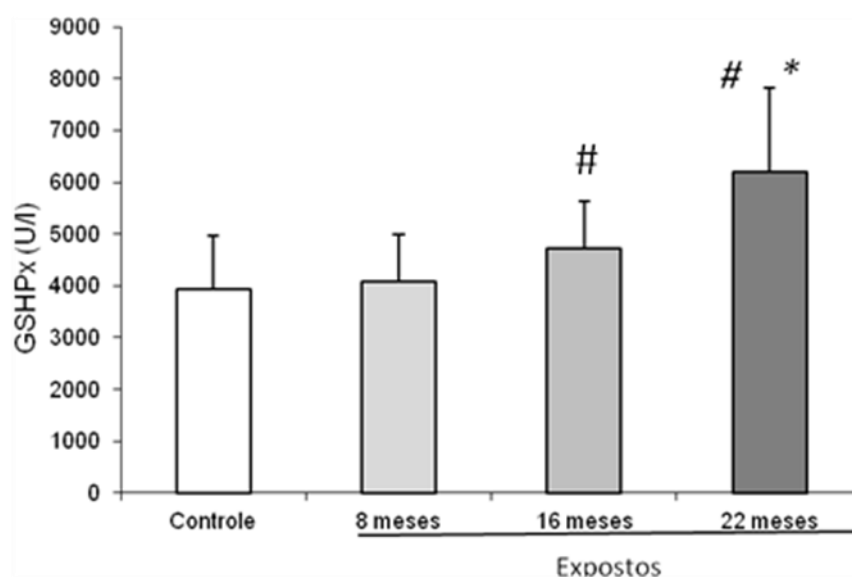


Figura 9: Atividade da enzima glutathione peroxidase ($X \pm DP$), segundo grupos e momentos. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; * $p < 0,001$ em relação à exposição após 8 e 16 meses.

Houve aumento significativo de danos no DNA no grupo exposto, em todos os períodos, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). No grupo dos residentes houve aumento significativo dos danos no DNA no período de exposição de 16 meses em relação ao período de 8 meses ($p < 0,05$) (Figura 10).

Houve correlação negativa entre os danos no DNA e a GSH-Px ($p < 0,05$) e com o conteúdo total de tióis ($p < 0,05$) (Figura 11 e 12, respectivamente). Não houve correlação significativa entre danos no material genético e proteínas carboniladas ($p = 0,6$), CAT ($p = 0,7$) e SOD ($p = 0,2$).

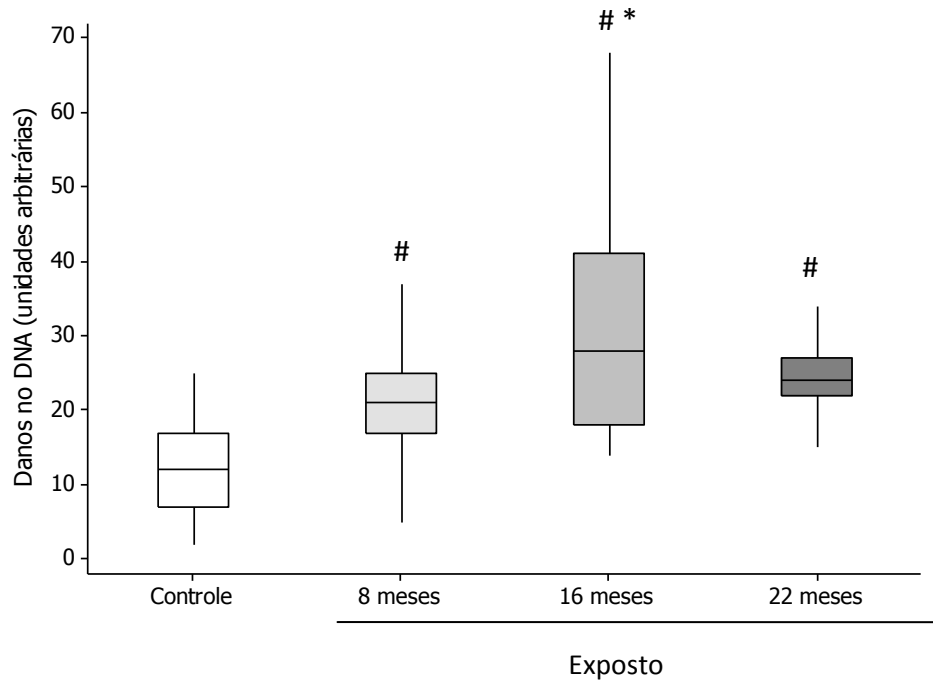


Figura 10: Danos no DNA (*boxplot*) de linfócitos, avaliados pelo teste do cometa, em ambos os grupos avaliados. # $p = 0,001$ em relação ao grupo controle; * $p < 0,01$ em relação à exposição após 8 meses.

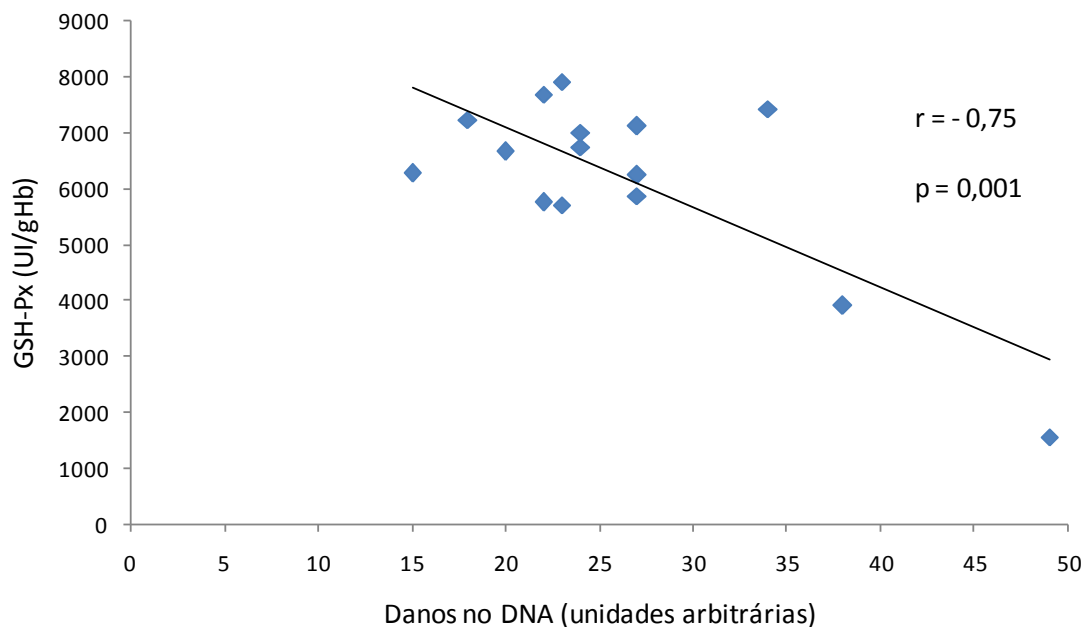


Figura 11: Correlação de danos no DNA e valores de enzima antioxidante GSH-Px no grupo de residentes expostos durante o período de 22 meses.

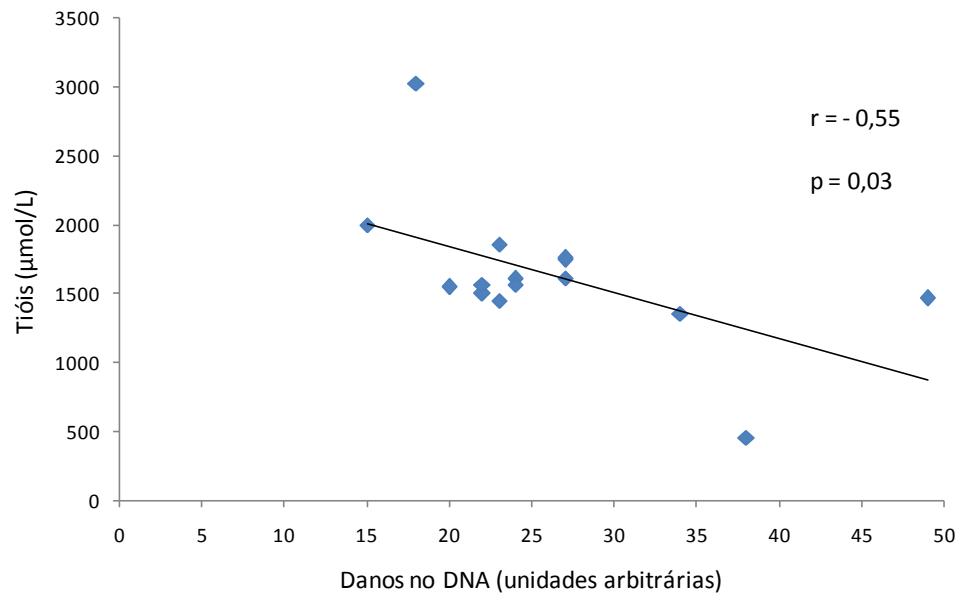


Figura 12: Correlação de danos no DNA e valores de tióis no grupo de residentes expostos durante o período de 22 meses.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que indivíduos recém-expostos aos resíduos de gases anestésicos, por período de oito a 22 meses, apresentam alterações no material genético, em proteínas e no sistema de defesa antioxidante.

Apesar dos grupos estudados terem apresentado diferença significativa em relação à idade, ressaltamos que em ambos os grupos os indivíduos eram adultos jovens (18-32 anos) não fumantes e sem comorbidades associadas. Portanto, essa diferença de idade possivelmente não interferiu em nossos resultados. A idade mais avançada e as doenças, além de uso de tabaco, podem levar à instabilidade genômica e ao estresse oxidativo (Fenech 1998; Piperakis et al., 2009; Massudi et al., 2012; Sundar et al., 2012). Em nosso estudo houve nítido predomínio do sexo masculino. Há controvérsias com relação à influência do sexo no nível de danos no DNA, pelo teste do cometa, em profissionais expostos aos resíduos de gases anestésicos. Assim, aumento de danos no sexo masculino (El-Ebiary et al., 2012), no sexo feminino (Rozgaj et al., 2009) e ausência de influência do sexo (Chandrasekhar et al., 2006) já foram relatados.

Vários estudos na literatura têm demonstrado que profissionais expostos por longos períodos aos anestésicos inalatórios em salas de operação sem renovação de ar apresentam alteração genética (Sardas et al., 1998; Rozgaj et al., 2001; Chandrasekhar et al., 2006; Wrońska-Nofer et al., 2009; El-Ebiary et al., 2012). Nossos dados demonstram que, mesmo em período curto, mas com relevante exposição aos anestésicos, os residentes de anesthesiologia e cirurgia têm aumento de quebras de fitas simples, duplas e sítios álcali-lábeis no DNA. Portanto, a exposição aos resíduos de vários anestésicos (isoflurano, sevoflurano e N₂O) em ambiente cirúrgico sem adequado sistema de renovação de ar é genotóxica, já a partir de poucos meses de exposição. No único estudo nacional encontrado na literatura, observou-se efeito clastogênico (AC), mas não de formação de TCI, em linfócitos de sangue periférico de anesthesiologistas expostos, por pelo menos cinco anos, predominantemente ao halogenado halotano (Chinelato & Fróes, 2002).

Aumento de lesões no DNA, detectadas pelo teste do cometa, foram encontradas em anesthesiologistas, enfermeiros e técnicos expostos ao halotano, isoflurano e N₂O (Sardas et al., 1998). Similarmente, aumento de danos no material genético também foi verificado, no Egito, em anesthesiologistas, cirurgiões, enfermeiras e técnicos expostos ao halotano, isoflurano, sevoflurano e N₂O (El-Ebiary et al., 2012).

Estudo realizado em profissionais croatas expostos em média por 13 anos aos resíduos de isoflurano, sevoflurano e N₂O mostrou que houve aumento na frequência de MN e de AC em linfócitos periféricos de enfermeiros, anesthesiologistas e técnicos (Rozgaj et al., 2001). Chandrasekhar et al. (2006) verificaram que profissionais indianos expostos, em média por 11 anos, aos anestésicos halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O apresentam aumento de danos no DNA (ensaio cometa) e formação de MN e AC.

Entretanto, essas pesquisas não determinaram a concentração dos resíduos de gases anestésicos em salas cirúrgicas, assim como no presente estudo. Wiesner et al. (2001) demonstraram que baixa exposição (< 0,5 ppm de isoflurano, sevoflurano e desflurano e 12 ppm de N₂O) não aumentou a frequência de MN em profissionais, diferentemente do que ocorreu em profissionais expostos a altas concentrações (4 ppm de halotano e isoflurano e 170 ppm de N₂O) por 20 horas semanais, quando houve aumento significativo na formação de MN. Assim, é de grande importância a determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos em salas de operação.

Os mecanismos pelos quais os anestésicos halogenados induzem lesões no DNA não estão totalmente elucidados. Sugere-se que os halogenados possam ser genotóxicos por reagirem diretamente com a molécula de DNA, alquilando a posição N7 das purinas e/ou pela liberação de ERO, que induzem vários tipos de lesões no material genético (Jaloszynski et al., 1999). Chinelato & Froes (2002) sugerem que os anestésicos halogenados podem agir de forma semelhante aos fármacos radiomiméticos, ou seja, podem induzir quebras e AC em diferentes fases do ciclo celular (G0, G1, S, G2). Dessa forma, os anestésicos inalatórios poderiam ser classificados como compostos químicos do tipo S-independentes, podendo induzir aberrações em todas as fases do ciclo.

Raros são os dados presentes na literatura em relação à avaliação de estresse oxidativo em profissionais expostos aos resíduos de anestésicos. Malekirad et al. (2005) avaliaram profissionais expostos principalmente ao halotano e N₂O com alto fluxo de O₂ (4 l/min) e observaram aumento de peroxidação lipídica (TBARS) e diminuição de conteúdo de tióis, sem que houvesse alteração de capacidade antioxidante (FRAP), quando comparado ao grupo não exposto. Anesthesiologistas e enfermeiros expostos por 6 horas diárias, por no mínimo três anos aos anestésicos halogenados (halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano e desflurano) em sistema fechado, em salas sem sistema *scavenging*, mas com ar condicionado, apresentaram

diminuição significativa de enzimas antioxidantes (SOD e GSH-Px) e micronutrientes (cobre e selênio), com exceção de zinco plasmático que se elevou (Türkan et al., 2005).

Semelhante ao nosso estudo, Baysal et al. (2009), em anestesiológicos, cirurgiões e enfermeiros, expostos em média por sete anos aos anestésicos halotano, isoflurano, sevoflurano e desflurano, além de N₂O, observaram aumento de danos no DNA, pelo teste do cometa, e aumento do índice de estresse oxidativo, mas com diminuição da capacidade antioxidante plasmática.

Técnicos em anestesia expostos aos resíduos de gases anestésicos apresentaram, pela metodologia do teste do cometa, elevação no nível de danos no DNA, quando comparados ao grupo controle não exposto (Sardas et al., 2006). Após suplementação da dieta com vitaminas C (500 mg/dia) e E (300 mg/dia), por período de 12 semanas, houve redução significativa dos danos nos indivíduos expostos, mas ainda com níveis aumentados em relação ao controle.

Recentemente, em enfermeiras expostas por cinco a 27 anos aos resíduos de N₂O e de halogenados isoflurano e sevoflurano, verificaram-se aumento de danos oxidativos em purinas no DNA e de peroxidação lipídica, com diminuição da atividade de glutathione peroxidase e sem que houvesse alteração significativa de alfa-tocoferol em relação ao grupo controle (Wrońska-Nofer et al., 2012). Considerando-se que apenas as concentrações de N₂O estavam acima do limite recomendado (> 180 mg/m³), mas não as dos halogenados, os autores atribuíram apenas a exposição ao N₂O às alterações observadas. Correlação positiva entre concentração de N₂O e quebras de fita e danos oxidativos no DNA foi observada pelos autores.

Na presente pesquisa, também se encontrou aumento de danos no DNA em relação ao grupo controle. Porém, diferentemente do encontrado por Malekírad et al. (2005), observou-se aumento do conteúdo total de tióis no grupo exposto após 22 meses de exposição, mas com diminuição de proteínas carboniladas após 16 meses de exposição, em relação ao controle, mostrando que os resíduos de gases anestésicos levaram a alterações protéicas.

A monooxigenase citocromo P450, isoforma 2E1 (CYP2E1), é a enzima mais importante (fase I) para a metabolização dos anestésicos halogenados: halotano (20%), desflurano (9%), sevoflurano (~5%), enflurano (2%) e isoflurano (0,2%). Durante o metabolismo dos anestésicos, a CYP2E1 é capaz de produzir ERO, como O₂^{•-} e H₂O₂ (Bezerra et al., 2010). Assim, uma vez produzidos, os RL/ERO reagem com os componentes celulares formando *crosslinks* de proteínas e enzimas, auto-oxidação

lipídica e danos em ácidos nucleicos, levando às quebras e/ou degradação de anéis de purinas e pirimidinas. Tais lesões podem causar lesões celulares, mutagenicidade e carcinogenicidade (Baden & Rice, 2000).

A redução mediada pela transferência de um único elétron de N_2O em nitrogênio leva a produção de ERO ($O_2^{\bullet}$) (Nair et al., 1995). Além disso, o N_2O também pode oxidar o átomo de cobalto da cobalamina (vitamina B12), reduzindo a atividade de metionina sintetase, enzima fundamental para formação de mielina e síntese de ácidos nucleicos, além de aumentar as concentrações plasmáticas de folato e homocisteína, podendo determinar alterações mutagênicas (Ermens et al., 1991; Rozgaj et al., 2001). Estudo realizado por Krajewski et al. (2007) observaram diminuição de cobalamina e aumento de homocisteína plasmática em enfermeiras expostas ocupacionalmente a elevadas concentrações de N_2O .

A maioria dos trabalhos na literatura mostra redução do sistema de defesa antioxidante em indivíduos expostos ocupacionalmente aos anestésicos (Türkan et al., 2005; Baysal et al., 2009; Wrońska-Nofer et al., 2012). Entretanto, observou-se aumento de GSH-Px após 16 e 22 meses de exposição, quando comparado ao grupo não exposto. Por outro lado, no grupo dos residentes, houve consumo de CAT no último período de exposição avaliado. Assim, podemos notar que tanto a GSH-Px quanto a CAT, mas não a SOD, estão diretamente envolvidas no metabolismo de H_2O_2 , levando à alteração do sistema de defesa antioxidante. Possivelmente, diferentemente do resultado encontrado por alguns autores (Türkan et al., 2005; Wrońska-Nofer et al., 2012) que observaram diminuição de GSH-Px plasmática e/ou eritrocitária, o aumento encontrado no presente estudo pode estar associado a maior atividade dessa enzima e ao maior consumo de CAT, frente aos danos em ácido nucleico e de proteínas, como o aumento de tióis. Dessa forma, os danos gerados em macromoléculas parecem estimular o sistema de defesa do organismo, como a exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos. Ressalte-se que, diferentemente das pesquisas realizadas, foram avaliados indivíduos jovens, sem comorbidades, e recém-expostos aos anestésicos e, que, portanto apresentam maior possibilidade de adequada resposta do sistema antioxidante.

Certamente, a exposição ocupacional aos anestésicos inalatórios depende dos métodos e da organização do ambiente de trabalho, como a utilização ou não de gases anestésicos e das concentrações empregadas, do tipo de sistema respiratório empregado (fechado, semifechado ou aberto), de menores ($\leq 1l/min$) ou maiores fluxos de gases frescos que propiciam, respectivamente, menor ou maior escape de gases

anestésicos, do sistema de *scavenging* ativo de ambiente, da presença direta do profissional junto ao paciente e/ou ao circuito respiratório, de máscaras faciais mal adaptadas, do uso de tubos traqueais sem balonetes, da realização de “lavagem” do circuito respiratório com fluxos elevados de gases, da forma e dos cuidados durante o enchimento dos vaporizadores com os anestésicos halogenados, do uso frequente de sistemas respiratórios pediátricos, da amostragem *sidestream* dos analisadores de gases e do escape de gases no circuito respiratório de baixa pressão, como reservatório de absorvedores de CO₂, dos anéis de vedação e das mangueiras (ASA, 2004).

Entretanto, mesmo com a utilização de sistemas de *scavenging* ativos 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 anestésias pediátricas (Chang et al., 1997).

Segundo a Portaria nº 485 do Ministério do Trabalho - Norma Regulamentadora nº 32 (Brasil, 2005), todos os equipamentos utilizados para a administração dos gases ou vapores anestésicos devem ser submetidos à manutenção corretiva e preventiva, dando-se especial atenção aos pontos de vazamento para o ambiente de trabalho, buscando sua eliminação. A manutenção consiste, no mínimo, na verificação dos cilindros de gases, conectores, conexões, mangueiras, balões, traqueias, válvulas, aparelhos de anestesia e máscaras faciais para ventilação pulmonar. Além disso, os locais onde são utilizados gases ou vapores anestésicos devem ter sistemas de ventilação e exaustão com o objetivo de manter concentração ambiental sob controle, conforme previsto na legislação vigente.

Segundo Xelegati et al. (2006), os profissionais de saúde demonstram insuficiente conhecimento sobre os fatores de risco ocupacional aos quais estão submetidos. Para que essa situação seja minimizada, esse tema deveria ser incluído no currículo dos cursos de graduação e especialização, ocasião em que medidas de segurança apropriadas à diminuição dos riscos ocupacionais devem ser apresentadas e discutidas, bem como os efeitos adversos à saúde dos trabalhadores.

Considerando-se que os resíduos de gases anestésicos podem induzir lesões no material genético e induzir estresse oxidativo, os resultados do presente estudo indicam a necessidade de que seja minimizada a exposição e assegurada melhores condições de trabalho para os médicos residentes. Assim, a medida mais importante para se diminuir a concentração residual de gases anestésicos residuais é implantar sistema ativo de exaustão e de renovação de ar das salas de operação. Além disso,

deve-se aumentar a disponibilidade de oferecimento de melhores e mais modernos aparelhos de anestesia com manutenção e revisão regular dos mesmos, bem como dos sistemas de ventilação e exaustão. O uso de baixo fluxo de gases frescos e a utilização de anestesia venosa total devem ser estimulados para redução dos riscos de exposição ocupacional.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou, pela primeira vez, que residentes das áreas de Anestesiologia e Cirurgia, expostos aos resíduos de gases anestésicos, apresentam aumento de danos no DNA e alteração no sistema de defesa antioxidante.

7 REFERÊNCIAS

Aebi, H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984;105:121-6.

American Society of Anesthesiologists (ASA) Committee on Occupational Health of Operating Room Personnel – Waste Anesthetic Gases. Information for management in anesthetizing areas and the Postanesthesia Care Unit, 2004.

American Society of Anesthesiologists (ASA) Occupational disease among operating room personnel: a national study. Report of an Ad Hoc Committee on the Effect of Trace Anesthetics on the Health of Operating Room Personnel, *Anesthesiology* 1974;41:321-40.

Andrade Junior DR; Souza RB; Santos SA, et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol* 2005;31:60-8.

Baden JM, Rice SA. Metabolism and toxicity of inhaled anesthetics, In: RD Miller (Ed.), *Anesthesia*, Churchill Livingstone; Philadelphia, 2000, pp. 147-73.

Baden JM, Simmon VF. Mutagenic effects of inhalational anesthetics. *Mutat Res* 1980; 75:169-89.

Baysal Z, Cengiz M, Ozgonul A, et al. Oxidative status and DNA damage in operating room personnel. *Clin Biochem* 2009;42:189-93.

Bezerra FJ, do Vale NB, Macedo BO, et al. Evaluation of antioxidant parameters in rats treated with sevoflurane. *Rev Bras Anesthesiol* 2010;60:93-7.

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.

Boivin JF. Risk of spontaneous abortion in women occupationally exposed to anaesthetic gases: a meta-analysis. *Occup Environ Med* 1997;54:541-8.

Bonassi S, Forni A, Bigatti P, et al. Chromosome aberrations in hospital workers: evidence from surveillance studies in Italy (1963-1993). *Am J Ind Med* 1997;31:353-60.

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

Bradford MM. Um ensaio de ligação do corante para a proteína. *Ana Biochem*,1976; 72:248-54.

Brasil, Ministério do Trabalho e Emprego — Portaria MTE n.º 485 - NR 32 - Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde, de 11 de novembro de 2005.

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

Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Sailaja N, et al. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis* 2006;21:249-54.

Chang WP, Kau CW, Hseu SS. Exposure of anesthesiologists to nitrous oxide during pediatric anesthesia. *Ind Health* 1997;35:112-8.

Chang WP, Lee S, Tu J, Hseu S. Increased micronucleus formation in nurses with occupational nitrous oxide exposure in operating theaters. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:93-7.

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

Cohen EN, Gift HC, Brown BW, et al. Occupational disease in dentistry and chronic exposure to trace anesthetic gases. *J Am Dent Assoc* 1980;101:21-31.

Corbett TH. Cancer and congenital anomalies associated with anesthetics. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 271:58-66.

Defesa enzimática, disponível em: www.ebi.ac.uk, 2004. Acesso 18/02/2013.

El-Ebiary A, Abuelfadl A, Sarhan N, et al. Assessment of genotoxicity risk in operation room personnel by the alkaline comet assay. *Hum Exp Toxicol* 2012 doi: 10.1177/0960327111426584.

Ermens AA, Refsum H, Ruprecht J, et al. Monitoring cobalamin inactivation during nitrous oxide anesthesia by determination of homocysteine and folate in plasma and urine. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49:385-93.

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

Etapas da carcinogênese, Instituto Nacional de Câncer - INCA, Fisiopatologia do câncer, disponível em www.inca.gov.br, 2002. Acesso 15/02/2013.

Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci* 1998;854:23-36.

Franco G, Marraccini P, Santagostino G, et al. Behaviour of urinary d-glucaric acid excretion in surgical patients and anaesthesiology staff acutely exposed to isoflurane and nitrous oxide. *Med Lav* 1991;82:527-32.

Green CJ. Anaesthetic gases and health risks to laboratory personnel: a review. *Lab Anim* 1981:397-403.

Guirguis SS, Pelmeur PL, Roy ML, et al. Health effects associated with exposure to anaesthetic gases in Ontario hospital personnel *Br J Ind Med* 1990;47:490-7.

Halliwell B; Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1999.

Hoerauf K, Lierz M, Wiesner G, et al. Genetic damage in operating room personnel exposed to isoflurane and nitrous oxide. *Occup Environ Med* 1999b;56:433-7.

Hoerauf KH, Koller C, Jakob W, et al. 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 et al. Waste anaesthetic gases induce sister chromatid exchanges in lymphocytes of operating room personnel. *Br J Anaesth* 1999a;82:764-6.

Husum B, Wulf HC. Sister chromatid exchanges in lymphocytes in operating room personnel. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980;24:22-4.

International Section on the Prevention of Occupational Risks in Health Services (ISSA, 2002) Safety in the use of anesthetic gases ISSA Prevention Series n° 2042 (E). Consensus paper from the basic German and French documentation working document for occupational safety and health specialists.

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

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

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

Lewińska D, Stepnik M, Krajewski W, et al. 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, et al. Neurotoxicity in operating room personnel working with gaseous and nongaseous anesthesia. *Int Arch Occup Environ Health* 1996;68:188-92.

Malekiran AA, Ranjbar A, Rahzani K, et al. Oxidative stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases. *Hum Exp Toxicol* 2005;24:597-601.

Massudi H, Grant R, Braidy N, et al. Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS one* 2012;7:e42357.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.

Nair CP, De AK, Darad R, et al. Possible involvement of superoxide radical in biochemical lesions induced by nitrous oxide. *Indian J Exp Biol* 1995;33:275-7.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Criteria for a recommended standard: occupational exposure to waste anesthetic gases and vapors. Cincinnati OH, US Department of Health, Education, and Welfare, 1977.

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

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterizations of erythrocyte glutathione peroxidase. *Lab Clin Med* 1967;70:158-69.

Piperakis SM, Kontogianni K, Karanastasi G, et al. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations. *Cell Biol Toxicol* 2009;25:65-71.

Radicals livres obtido em www.medstudents.com.br. Acesso em 18/02/2013.

Rowland AS, Baird DD, Shore DL, et al. Nitrous oxide and spontaneous abortion in female dental assistants. *Am J Epidemiol* 1995;141:531-8.

Rowland AS, Baird DD, Weinberg CR, et al. Reduced fertility among women employed as dental assistants exposed to high levels of nitrous oxide. *N Engl J Med* 1992;327:993-7.

Rozgaj R, Kasuba V, Brozović G, et al. 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.

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, Perić M. Chromosome aberrations in operating room personnel. *Am J Ind Med* 1999;35:642-6.

Rozgaj R, Kasuba V. Chromosome aberrations and micronucleus frequency in anaesthesiology personnel. *Arh Hig Rada Toksikol* 2000;51:361-8.

Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Cardoso RS, et al. Utilização de genômica funcional e proteômica em mutagênese. Em: Ribeiro LT, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora Ulbra, 2003. p 309-33.

Salvadori DM, Ribeiro LC, Fenech M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. Em: Ribeiro LC, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora Ulbra, 2003. p 201-23.

Saraiva RA. Desflurano: propriedades físico-químicas, farmacologia e uso clínico. *Rev Bras Anesthesiol* 2003;53:214-26.

Sardas S, Aygün N, Gamli M, 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.

Sardaş S, Cuhruk H, Karakaya AE, et al. Sister-chromatid exchanges in operating room personnel. *Mutat Res* 1992;279:117-20.

Sardas S, Izdes S, Ozcagli E, et al. The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;80:154-9.

Silva J, Fonseca MB. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. Em: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 70-84.

Simon-Giavarotti KA. Estudo do estresse oxidativo hepático induzido por lindano em um modelo de hipertireoidismo experimental. Tese de doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001, 159 p.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988;175:184-91.

Sundar IK, Yao H, Rahman I. Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. Antioxid Redox Signal 2012;6. [Epub ahead of print].

Sweeney B, Bingham RM, Amos RJ, et al. Toxicity of bone marrow in dentists exposed to nitrous oxide. Br Med J 1985;291:567-9.

Tannenbaum TN, Goldberg RJ. Exposure to anesthetic gases and reproductive outcome. A review of the epidemiologic literature. J Occup Med 1985;27:659-68.

Teste do cometa, 2011. Disponível em: <http://biorocha.blogspot.com.br>. Acesso em 18/02/2013.

Türkan H, Aydin A, Sayal A. Effect of volatile anesthetics on oxidative stress due to occupational exposure. World J Surg 2005;29:540-2.

Vaisman AI. Working conditions in the operating room and their effect on the health of anesthetists. Eksp Khir Anesteziol, 1967;12:44-9.

Vasconcelos SM, Goulart MO, Moura JB, et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Quím. Nova 2007;30:1323-38.

Wiesner G, Hoerauf K, Schroegendorfer K, et al. High-level, but not low-level, occupational exposure to inhaled anesthetics is associated with genotoxicity in the micronucleus assay. *Anesth Analg* 2001;92:118-22.

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

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

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

Xelegati R, Robazzi ML, Marziale MH, et al. Riscos ocupacionais químicos identificados por enfermeiros que trabalham em ambiente hospitalar. *Rev Latinoam Enfermagem* 2006;14:214-9.

APÊNDICE

a) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

FACULDADE DE MEDICINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr(a). para participar do Projeto de Pesquisa “Avaliação de Genotoxicidade e Estresse Oxidativo em Profissionais Recém-Expostos aos Resíduos de Gases Anestésicos”, que será realizado na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pretende avaliar o risco de exposição a anestésicos inalatórios, utilizando o sangue de pessoas saudáveis. O(s) pesquisador(es) Ellen Paes, José Reinaldo Cerqueira Braz e Marne Vasconcellos, responsáveis pelo projeto, pedem autorização para coletar seu sangue (dez mililitros), para realizar esta avaliação. O Sr.(a) foi escolhido porque esta exposto aos gases anestésicos. Se o (a) Sr(a) autorizar esta coleta, seu sangue será utilizado como sangue de pessoa exposta a gases anestésicos. O que não for usado, não será guardado, sendo descartado conforme legislação vigente no Brasil. A coleta do sangue será feita em uma veia do braço, podendo causar um leve incomodo no momento da coleta. Se depois de autorizar a coleta, o (a) Sr(a) não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do sangue, independente do motivo. O (a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não terá nenhuma forma de compensação financeira. A sua participação é importante para o melhor conhecimento da exposição aos gases anestésicos e de como pode ocorrer a prevenção a genotoxicidade causada pela exposição a esses gases. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo permanente. Para qualquer outra informação, o (a) Sr.(a) poderá entrar em contato com o (a) pesquisador(a) pelo telefone (92) 3305-5000/ 81545421 ou pelo e-mail: ellenpaes@ufam.edu.br

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o (a) pesquisador (a) desenvolverá no projeto e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ter nenhum tipo de compensação financeira e que posso sair do projeto quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

 Assinatura do participante

 Data

 Pesquisadora Responsável

 Data

b) Questionário

QUESTIONÁRIO

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-Come frutas? () sim () não

13-Se sim, com que frequência?

14-Come verduras? () sim () não

15- Se sim, com que frequência? _____

16-Come carboidratos? () sim () não

17-Se sim, com que frequência? _____

18-Come frituras? () sim () não

19-Se sim, com que frequência? _____

20-Faz exercícios regularmente? () sim () não

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

22-Se sim, quantas vezes por semana? _____

23-Fuma? () sim () não

24-Se sim, há quanto tempo? _____

25-Quantos cigarros/dia? _____

26-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, etc)? _____

- 27-Já fumou? () sim () não
- 28-Há quanto tempo deixou de fumar? _____
- 29-Quantos cigarros/dia fumava? _____
- 30-Durante quanto tempo fumou? _____
- 31-Tipo: _____
- 32-Consome bebida alcoólica? () sim () não
- 33-Se sim, quanto por semana (copos)? _____
- 34-Tipo de bebida (cachaça, cerveja, uísque, vinho, etc)? _____
- 35-Já consumiu bebida alcoólica? () sim () não
- 36-Há quanto tempo deixou de beber? _____
- 37-Consome drogas? () sim () não
- 38-Se sim, qual? _____
- 39-Há quanto tempo? _____
- 40-Tem contato com substâncias tóxicas? () sim () não
- 41-Se sim, qual (produtos de limpeza, agrotóxicos, gasolina, tinta)? _____
- 42-Há quanto tempo? _____
- 43-Foi submetido a raio X recentemente (dentário ou antes da cirurgia)?
() sim () não
- 44-Quando? _____
- 45-Sabe quantas chapas de RX foram feitas? _____
- 46- Já fez tratamento com quimioterápico ou radioterapia? () sim () não
- 47-Se sim, qual? _____
- 48-Há quanto tempo? _____
- 49-Tem alguma doença (asma, hipertensão, diabetes, hepatite, lúpus, artrite, câncer)?
() sim () não
- 50-Qual? _____
- 51-Já teve alguma doença grave? () sim () não
- 52-Se sim, qual? _____
- 53-Há quanto tempo? _____
- 54-Passou por algum estresse ultimamente? () sim () não
- 55-Se sim, qual? _____

III - História Médica

- 56-É alérgico a algum tipo de medicamento? () sim () não
- 57-Se sim, qual? _____
- 58-Faz uso regular de algum tipo de medicamento (antibiótico, anti-inflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, corticóide, anti-convulsivante, insulina, hipoglicemiante)?
() sim () não
- 59-Se sim, qual (is)? _____

60-Frequência/dia:_____

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

62-Se sim, qual (is)?_____

63-Frequência/dia:_____

64-Há quanto tempo?_____

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

66-Se sim, qual (is)?_____

67-Frequência/dia:_____

68-Há quanto tempo parou?_____

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

70- Se sim, qual (is)?_____

71- Há quanto tempo parou?_____

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

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

74-Se sim, quantas?_____

75-Há quanto tempo foi a última?_____

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

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

78-Há quanto tempo?_____

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

IV – Atividade Profissional

80-Qual é a sua especialidade médica?_____

81-Você é residente? () sim () não

82-Se sim, de que ano?

() R1 () R2 () R3 () R4 () R5

83-Atua profissionalmente no centro cirúrgico? () sim () não

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

85-Se sim, há quanto tempo? _____ anos, _____ meses

86-Tem exposição profissional à radiação (raio-x, tomografia, ressonância)? () sim () não

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

c) Proteínas carboniladas

Valores das proteínas carboniladas nos grupos controle e exposto

Proteínas Carboniladas (nmol/mg)					
Controle		Exposto	8 meses	16 meses	22 meses
1	0,6	1	0,3	0,9	0,8
2	1,2	2	1,1	0,2	0,4
3	0,9	3	1,6	0,5	0,3
4	0,5	4	1,2	0,6	1,2
5	1,6	5	0,3	0,7	0,9
6	0,9	6	0,7	0,5	0,6
7	0,5	7	0,4	1,0	0,7
8	1,1	8	0,4	0,4	0,2
9	1,1	9	0,2	0,9	1,2
10	0,6	10	0,7	0,4	0,7
11	0,8	11	0,7	0,5	0,5
12	1,2	12	0,9	0,5	1,0
13	0,5	13	0,8	0,5	0,8
14	0,9	14	0,7	0,9	0,6
15	0,9	15	0,9	0,4	0,6
MÉDIA	0,8		0,7	0,6	0,7
DP	0,3		0,4	0,2	0,3

d) Conteúdo total de tióis

Valores de tióis nos grupos controle e exposto

Conteúdo total de tióis ($\mu\text{mol/l}$)					
Controle		Exposto	8 meses	16 meses	22 meses
1	656,9	1	518,9	679,6	1465,4
2	791,8	2	770,5	840,3	1546,6
3	766,8	3	735,5	762,2	1356,8
4	560,5	4	490,3	893,8	1612,2
5	877,6	5	1020,3	766,4	1498,6
6	624,6	6	957,5	1253,0	1605,3
7	757,2	7	693,9	724,4	1447,8
8	788,1	8	679,6	724,8	1855,9
9	896,6	9	933,9	1169,9	3029,1
10	843,5	10	470,4	722,1	1560,9
11	462,6	11	864,3	136,2	1747,0
12	618,2	12	453,8	763,6	1563,2
13	481,9	13	580,8	734,0	2000,0
14	610,8	14	490,3	620,5	1757,6
15	354,6	15	631,6	457,5	457,5
MÉDIA	672,8		686,1	749,9	1633,6
DP	162,2		190,4	259,8	515,4

e) Enzima antioxidante catalase

Valores de catalase nos grupos controle e exposto

Catalase (k/gHb/min)					
Controle	Resultado	Exposto	8 meses	16 meses	22 meses
1	3,4	1	2,9	3,7	1,8
2	2,5	2	1,6	2,5	3,0
3	2,5	3	5,2	7,2	1,5
4	1,4	4	4,0	4,4	3,0
5	7,5	5	7,4	5,6	1,8
6	8,8	6	4,4	10,3	4,3
7	4,4	7	5,1	6,1	6,2
8	2,1	8	8,1	12,5	4,3
9	5,2	9	3,2	6,7	2,5
10	4,7	10	4,9	3,3	2,4
11	3,9	11	10,6	4,8	3,9
12	2,9	12	4,4	2,7	2,5
13	4,8	13	7,3	2,7	2,5
14	2,9	14	6,3	7,0	3,3
15	5,2	15	6,2	2,3	4,8
MÉDIA	4,2		5,5	5,5	3,2
DP	2,0		2,3	2,9	1,3

f) Enzima antioxidante superóxido dismutase

Valores de superóxido dismutase nos grupos controle e exposto

Superóxido dismutase (U/ml)					
Controle	Resultado	Exposto	8 meses	16 meses	22 meses
1	740	1	1240	768	688
2	872	2	592	504	532
3	648	3	880	504	1188
4	424	4	1080	808	552
5	328	5	868	612	404
6	596	6	664	500	456
7	688	7	648	809	288
8	620	8	672	534	268
9	756	9	428	748	956
10	872	10	528	508	252
11	632	11	1168	788	324
12	660	12	508	880	540
13	500	13	488	612	452
14	644	14	608	532	872
15	676	15	452	812	632
MÉDIA	643,7		721,6	661,3	560,3
DP	146,6		264,6	142,8	270,9

g) Enzima antioxidante glutatona peroxidase

Valores de glutatona peroxidase nos grupos controle e exposto

Glutatona peroxidase (U/l)					
Controle	Resultado	Exposto	8 meses	16 meses	22 meses
1	2695,2	1	4996,7	5195,3	1559,6
2	3134,3	2	5874,9	4330,5	6662,3
3	5208,7	3	3179,7	4285,0	7419,4
4	3543,1	4	3696,5	3967,1	6238,3
5	2907,2	5	5405,5	4285,0	7676,8
6	5405,5	6	2952,6	6677,4	6738,0
7	5505,2	7	4572,7	5042,1	5708,4
8	5507,2	8	3755,1	3982,2	7919,1
9	3194,8	9	4118,5	5314,7	7222,5
10	4133,6	10	2952,6	5223,8	5753,8
11	3088,9	11	4042,8	3951,9	7116,5
12	3361,4	12	3770,3	3785,4	6995,4
13	2013,2	13	4572,7	5193,6	6268,6
14	3785,4	14	4481,9	6132,3	5874,9
15	4466,7	15	2876,9	3361,4	3906,5
MÉDIA	3863,4		4083,3	4715,2	6204,0
DP	1123,3		910,9	923,4	1625,5

h) Danos no DNA no grupo controle

Danos no DNA avaliados no grupo controle (sem exposição aos resíduos de gases anestésicos)

Escore					
Controle	0	1	2	3	4
1	38	12	0	0	0
2	46	4	0	0	0
3	43	5	2	0	0
4	25	15	10	0	0
5	42	8	0	0	0
6	34	10	6	0	0
7	47	3	0	0	0
8	35	13	2	0	0
9	41	9	0	0	0
10	45	3	2	0	0
11	36	14	0	0	0
12	40	6	4	0	0
13	48	2	0	0	0
14	37	10	3	0	0
15	32	11	7	0	0

i) Danos no DNA após oito meses de exposição

Danos no DNA avaliados no grupo exposto (residentes) após oito meses de exposição aos resíduos de gases anestésicos

Residentes	Escore				
	0	1	2	3	4
1	26	13	9	2	0
2	24	14	4	8	0
3	35	10	5	0	0
4	40	4	5	1	0
5	33	15	5	0	0
6	40	9	4	0	0
7	40	5	3	2	0
8	46	3	1	0	0
9	41	3	2	2	2
10	30	8	3	7	2
11	29	30	1	1	0
12	32	15	3	0	0
13	45	4	0	0	1
14	45	1	0	4	0
15	35	11	7	0	0

j) Danos no DNA após 16 meses de exposição

Danos no DNA avaliados no grupo exposto (residentes) após 16 meses de exposição aos resíduos de gases anestésicos

Residentes	Escore				
	0	1	2	3	4
1	25	5	9	8	3
2	20	7	10	11	2
3	34	10	4	2	0
4	43	6	3	2	2
5	8	6	26	10	0
6	35	4	8	3	0
7	39	6	2	2	0
8	41	5	2	1	1
9	40	3	1	1	5
10	33	5	3	6	3
11	32	8	8	2	0
12	25	5	9	8	3
13	20	7	10	11	2
14	34	10	4	2	0
15	38	5	3	2	2

k) Danos no DNA após 22 meses de exposição

Danos no DNA avaliados no grupo exposto (residentes) após 22 meses de exposição aos resíduos de gases anestésicos

Residentes	Escore				
	0	1	2	3	4
1	3	41	5	9	8
2	2	39	6	2	2
3	0	35	5	4	3
4	2	39	3	4	2
5	0	40	2	2	4
6	0	38	7	5	2
7	0	34	12	5	1
8	1	36	9	2	1
9	5	34	4	2	2
10	3	38	6	2	2
11	0	42	7	2	4
12	3	41	5	1	2
13	2	39	6	9	8
14	0	35	5	2	2
15	31	9	3	5	2