UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Lorena Mendes de Carvalho Lucio

Determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos e avaliação genômica e de estresse oxidativo em profissionais recém-expostos

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

Orientador: Prof. Dr Leandro Gobbo Braz

Co-orientadora: Profª Drª Mariana Gobbo Braz

Botucatu
2016

Lorena Mendes de Carvalho Lucio

Determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos e avaliação genômica e de estresse oxidativo em profissionais recém-expostos

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

Orientador: Prof. Dr Leandro Gobbo Braz

Co-orientadora: Profª Drª Mariana 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

Lucio, Lorena Mendes de Carvalho.
Determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos e avaliação genômica e de estresse oxidativo em profissionais recém-expostos / Lorena Mendes de Carvalho Lucio. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Leandro Gobbo Braz
Coorientador: Mariana Gobbo Braz
Capes: 40102130

1. Anestésicos. 2. Exposição ocupacional. 3. Stress oxidativo. 4. Poluição - Aspectos ambientais. 5. Residentes (Medicina). 6. Genômica.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Instabilidade genômica; Médicos residentes; Poluição ambiental; Testes de genotoxicidade.

Lorena Mendes de Carvalho Lucio

DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE RESÍDUOS DE GASES ANESTÉSICOS E AVALIAÇÃO GENÔMICA E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PROFISSIONAIS RECÉM-EXPOSTOS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora

Presidente e Orientador: Prof. Assistente Dr Leandro Gobbo Braz
Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Profª Adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira
Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

_____
Prof. Adjunto Paulo do Nascimento Junior
Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

_____
Prof. Dr Jose Eduardo Bagnara Orosz
Pontifícia Univerdade Católica de Campinas, PUCC

_____
Profª Adjunta Maria Angela Tardelli
Disciplina de Anestesiologia, Dor e Medicina Intensiva do Departamento de Cirurgia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP

Botucatu, 25 de agosto de 2016, às 8h30min

Dedicatória

"Amo os grandes rios, pois são profundos como a alma do homem. Na superfície são muito vivazes e claros, mas nas profundezas são tranqüilos e escuros como os sofrimentos dos homens. Amo ainda mais uma coisa de nossos grandes rios: a eternidade. Sim, rio é uma palavra mágica para conjugar a eternidade." *A Terceira Margem do Rio, João Guimarães Rosa*

Dedico este trabalho ao meu avô José Luiz Mendes de Carvalho que, desde as minhas primeiras memórias, motiva-me a perseguir as mais profundas águas da sabedoria, num nado incansável e persistente por suas infinitas margens. A meu maior incentivador, eterna gratidão, do lado de cá do rio.

"Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara" *Ensaio Sobre a Cegueira, José Saramago*

Aos meus pais Maria Ester Ibiapina Mendes de Carvalho e Reynaldo Mendes de Carvalho Junior que, como meus primeiros professores, ensinaram-me, por meio de seus olhos, a reparar na beleza da vida e a crer que tudo é possível perante Deus, pelo Amor, Dedicação e Bondade.

"Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia." *Grande Sertão: Veredas, João Guimarães Rosa*

Ao meu amado esposo, Carlos Eduardo Pinheiro Lucio Filho, cujos passos estão sempre ao lado dos meus nesta travessia que é viver. Meu amor, minha paixão, meu companheiro, por dividir comigo meus maiores sonhos e unir nossas forças para lutar por eles.

"Cada qual sabe amar a seu modo; o modo pouco importa; o essencial é que saiba amar." *Ressureição, Machado de Assis*

Aos meus sogros e segundos pais, Maria Célia Lima Lucio e Carlos Eduardo Pinheiro Lucio, por me acolherem em seu seio familiar com amor, amizade e simplicidade. Aos meus irmãos, Ana Isabel Ibiapina Mendes de Carvalho e Reynaldo Mendes de Carvalho Filho, por seu modo de amar próprio que nos mantém unidos sempre.

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador

Professor Doutor Leandro Gobbo Braz

Dedico especialmente esta obra ao meu querido mestre, por conduzir-me nesta jornada de aprendiz com respeito, paciência, amizade e excelência. Minha infinita gratidão, por ser uma bússola de serenidade, inteligência e confiança dignas do exemplo de ser humano e profissional que é.

Agradecimentos especiais

À minha co-orientadora

Doutora Mariana Gobbo Braz

Presença de quilate maior nesta trajetória, imprime sua marca de busca inesgotável pela perfeição em toda e qualquer empreitada. Ora destacada como amiga e “irmã” mais experiente, ora como mestra inspiradora de profundo zelo e amor pela ciência.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminho, por sua infinita bondade e misericórdia e por ter me dado força e saúde para enfrentar este e tantos outros desafios da vida.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, pelo apoio, amor e carinho em todos os momentos da minha vida, por compreenderem as ausências e os sacrifícios tantas vezes impostos pela necessidade de estudar, como também por me incentivarem a sempre alcançar meus sonhos.

Aos meus amigos, por estarem sempre próximos para compartilhar as conquistas e alegrias e me ajudarem lealmente a superar as dificuldades inerentes à vida.

A todos os professores do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP que me passaram, em seus inestimáveis ensinamentos e experiências, o amor pela Anestesiologia e pelos meus colegas e pacientes, e a quem agradeço na pessoa da Professora Titular Yara Marcondes Machado Castiglia (na época supervisora da Residência Médica de Anestesiologia e importante mentora que moldou minha caminhada pelo seu exemplo de disciplina, excelsitude, dedicação e honestidade).

Ao Professor Titular e Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz, meu tutor científico e orientador no projeto de pesquisa durante a residência médica, por engrandecer minha visão sobre "fazer ciência" com nobreza, responsabilidade, humildade, dedicação e excelência, e por ser para mim o exemplo de pesquisador que eu busco seguir.

Aos professores da Pós-Graduação em Anestesiologia da FMB-UNESP, a quem agradeço na pessoa da querida professora Titular Eliana Marisa Ganem (Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia), pela

disponibilidade, dedicação e esforços constantes em organizar uma Pós-Graduação pautada no compromisso da excelência e seriedade, de que me orgulho imensamente por ter feito parte na condição de aluna durante esses 3,5 anos.

À professora Drª Lídia Raquel de Carvalho do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), que, de maneira dedicada e paciente, deu sua contribuição essencial a este projeto por meio das análises estatísticas realizadas com extrema primazia.

A todos os médicos assistentes da área de Anestesiologia da FMB-UNESP, que me incentivaram durante a residência médica e depois como amigos e colegas de profissão, a buscar sempre o melhor da Anestesiologia, por meio do estudo e da dedicação à profissão e ao ensino.

Aos meus queridos colegas de residência médica, por terem me apoiado durante a realização dessa árdua tarefa, por muitas vezes trabalharem por mim, quando eu estava empenhada neste projeto, ou por simplesmente me escutarem, quando eu precisei de um ombro amigo.

A todos os médicos residentes que participaram desta pesquisa, de forma tão humilde, despretensiosa e humana, por terem se doado ao projeto em prol da ciência, pelo tempo que dispenderam para isto (muitas vezes abrindo mão de raros momentos de descanso) e por acreditarem que os jovens podem fazer a diferença para o mundo.

Aos meus pacientes, que me ensinaram a ser uma profissional e pesquisadora mais humana, por meio do respeito diante da fragilidade do próximo.

A toda a equipe do Laboratório GENOTOX, especialmente Kátina Meneghetti de Souza (colega querida pela ajuda fundamental nesta trajetória, como pesquisadora pela contribuição direta neste trabalho, e pela amizade e compartilhamento de experiências mútuas a qualquer hora), Flávia Ribeiro Nogueira (também uma pessoa de extrema disposição e pesquisadora amiga que ajudou imensamente no decorrer do trabalho) e Vickeline Namba (pela ajuda técnica no laboratório).

Aos alunos de iniciação científica que fizeram parte desse projeto, Giulia Carolina Cuoco Di Renzo, Maurício Martins Chaoul, Daniel Abdalla Added Filho, Clara d'Afonseca Canário, Ludimila Oliveira Resende, Nayara Micarelli de Arruda e Marajane Bruno de Souza pela contribuição fundamental ao acreditarem no projeto e trabalharem com afinco e seriedade no decorrer de sua realização.

Às mestrandas Aline Garcia Aun e Nayara Micarelli de Arruda, e à médica residente Renata Togeiro Bastos Godoy de Faria por engrandecerem este trabalho por meio do esforço e dedicação para apresentá-lo em eventos científicos, conquistando importantes premiações obtidas em 2015 e 2016: "Micronucleus frequency and oxidative stress assessment in medical residents exposed to waste anesthesic gases" considerado um dos cinco melhores trabalhos (sessão oral) do Simpósio de Mutagênese e Oncologia Genética, Departamento de Genética, FMRP-USP, Departamento de Biologia, FFCLRP-USP e Mutagen-Brasil; Melhor Tema Livre "Aumento de danos citogenéticos em profissionais recentemente expostos a altas concentrações residuais de gases anestésicos" apresentado no 12º COPA, SAESP; e 2º Melhor Trabalho de Graduação (sessão oral) "Danos no material genético em médicos residentes expostos aos anestésicos inalatórios" do XVI Workshop de Genética (IBB, UNESP - Botucatu).

À Maria Regina Moretto, da equipe do Laboratório de Métodos Imunoenzimáticos da UNIPEX, FMB-UNESP, por dispor do seu tempo e paciência para me ensinar o método ELISA e sua aplicabilidade à mensuração de 4-hidroxinonenal e proteínas carboniladas, e à Silvia Regina de Toledo Estevan, do Laboratório de Cromatografia da UNIPEX, FMB-UNESP, pela ajuda na realização do método cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para mensuração plasmática de malonaldeído.

A todos os funcionários da UNIPEX da FMB-UNESP e do Hospital das Clínicas da FMB-UNESP que contribuíram para a realização deste trabalho.

À professora Dra Camila Renata Corrêa, do Programa de Pós-Graduação em Patologia da FMB-UNESP, pela oportunidade de bolsa de estudo, concedida pelo Programa Geral de Cooperação Internacional (PGCI/CAPES), para realização de

Doutorado-sanduíche na Tufts University, em Boston-MA, Estados Unidos, pela fundamental tutoria em técnicas de laboratório em fevereiro de 2014 e pelo incentivo para a realização deste trabalho.

À professora adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira (Departamento de Clínica Médica da FMB-UNESP), minha "mãe em Boston", por ter sido uma pessoa absolutamente maravilhosa, tornando-se uma querida e agradável companhia e, ao mesmo tempo, uma pesquisadora e professora engajada e corajosa sempre me inspirando a buscar dar meu melhor na ciência e na vida, e me incentivando desde então.

Aos meus orientadores no exterior, os professores Chung-Yen Oliver Chen e Jeffrey B. Blumberg, do Antioxidants Research Laboratory (ARL), Tufts University, Boston-EUA, por me acolherem na sua instituição como bolsista durante o período do Programa de Doutorado-Sanduíche, acreditarem no meu potencial (ainda que com minha pequena experiência de bancada na época), por me ensinarem com paciência e respeito sua invejável experiência sobre estresse oxidativo, discutirem comigo os resultados obtidos ajudando aprimorá-los a cada dia e inserindo-me em projetos científicos de colaboração e, enfim, por me ajudarem a acreditar no valor da ciência quando bem feita, por meio dessa experiência que modificou minha vida.

A todos os parceiros e colegas de laboratório no ARL, da Tufts University, Boston-EUA, pela amizade, boa convivência, respeito e pelos ensinamentos constantes.

Aos amigos brasileiros que fiz em Boston, com quem pude partilhar novas experiências e criar amizades que levarei por toda a vida. Em especial às amigas queridas Rosangela Akemi Hoshi, Lidyane do Valle Camelo e Bruna Paola Murino Rafacho, que se fizeram presentes em todos os momentos, ajudaram-me a superar desafios e dificuldades próprios de um novo país e me aceitarem como sou.

À secretária Tatiane de Fátima Pineiz Biondo, pela primazia que imprime às suas tarefas por meio de dedicação, bom-humor e disposição constante em ajudar, seja por meio de assuntos da Pós-Graduação, seja escutando e dando apoio emocional sempre que necessário.

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da FMB-UNESP, Joana Jacirene Costa Teixeira, Sônia Maria Martins e Silva, Neli Aparecida Pavan e André Renato Passaroni, sempre a exercerem suas atividades com afinco e gentileza, prestando ajuda tantas vezes quanto necessário no decorrer da minha jornada como médica residente e aluna da Pós-Graduação.

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.

Ao prof. José Airton Ferreira de Sousa, licenciado em língua e literatura Portuguesa e língua e literatura Francesa e especialista em estrutura da língua Portuguesa, e à Profª Maria do Socorro Rios Magalhães, Doutora em Letras pela PUCRS e professora adjunta da Universidade Estadual do Piauí, pelas cuidadosas correções de Português e pelo tempo e disponibilidade em corrigir a tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de 6 meses para realização de Doutorado-Sanduíche no exterior, Tufts University, Boston, Estados Unidos (CAPES/PGCI, processo número: 14527-13-8).

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2013/21130-0) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (processo nº 472453/2013-0), pela concessão de auxílios financeiros que viabilizaram a execução deste trabalho.

A todos os colegas anestesiologistas da Coopanest - PI (a quem agradeço na pessoa do Presidente Argemiro Ferreira de Andrade Neto), por partilharem da luta diária pelo engrandecimento da Anestesiologia Piauiense, e entre os quais tenho o privilégio de conviver com grandes parceiros profissionais e amigos pessoais com quem aprendo diariamente inestimáveis lições de vida e experiências que me fazem buscar ser uma anestesiologista e pessoa melhor.

Aos amigos anestesiologistas do Hospital Getúlio Vargas, Hospital Prontomed,

Hospital de Urgências de Teresina, Hospital Flávio Santos e Hospital Santa Maria, pelo companheirismo, pela amizade no cotidiano, e por me ajudarem e me incentivarem, ao longo da trajetória profissional e da Pós-Graduação, muitas vezes cobrindo-me em plantões e turnos de trabalho, para permitir que eu executasse este projeto.

À Dra Edilene de Jesus Bezerra Batista Rocha, coordenadora do Serviço de Anestesiologia do Hospital Getúlio Vargas, amiga, que não mediu esforços para prestar-me apoio no decorrer desta jornada, fundamental à execução deste trabalho.

À Sociedade de Anestesiologia do Estado do Piauí (SAEPI), da qual tenho imenso orgulho de participar; e aos queridos amigos Tiago Teixeira da Rocha Santiago, Leonardo Machado Martins, André Caldas B. Gadelha Lima e Luiz Mamede Demes de Castro, membros da direção da SAEPI, pelo compromisso constante em elevar a Anestesiologia do Piauí diante da sociedade e das entidades médicas locais e nacionais, constituindo exemplos de grandes homens e profissionais e motivo de importante incentivo para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Coopanest - PI e da SAEPI, por executarem seu trabalho com amor e dedicação e estarem sempre dispostos a ajudar no decorrer desta jornada.

"Quem elegeu a busca não pode recusar a travessia"

João Guimarães Rosa

Resumo

Lucio LMC. **Determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos e avaliação genômica e de estresse oxidativo em profissionais recém-expostos** [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2016. 82 f.

O presente estudo objetivou determinar as concentrações dos resíduos de gases anestésicos (RGA) em salas de operação (SO) e o impacto dessa exposição ocupacional em relação aos danos genômicos e estresse oxidativo em profissionais recém-expostos. O estudo foi conduzido no Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. As concentrações de isoflurano, sevoflurano e óxido nitroso (N_2O) foram medidas nas SO por espectrofotometria infravermelha, com equipamento portátil. Sessenta e três médicos residentes, ao final de três anos do Programa de Residência Médica, foram alocados em dois grupos: exposto (Anestesiologia e Cirurgia, n=32) e controle (Clínica Médica, n=31). Amostras de sangue periférico e células bucais foram coletadas e protegidas da luz. Avaliaram-se danos no material genético (teste do cometa - danos basais, purinas e pirimidinas oxidadas em linfócitos; 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina no plasma), micronúcleo (MN) em células bucais, proteínas carboniladas, marcadores de lipoperoxidação (malonaldeído e 4-hidroxinonenal) e capacidade antioxidante plasmática (*ferric reducing antioxidant power*, *oxygen radical absorbance capacity* e *total antioxidant performance)*. As concentrações médias dos RGA foram superiores aos limites internacionalmente recomendados (2,7 vezes: isoflurano; 4,9 vezes: sevoflurano; 7,2 vezes: N_2O). Os grupos não diferiram quanto aos dados demográficos ($p>0,05$). Detectou-se aumento significativo de danos basais no DNA ($p=0,01$) e maior frequência de MN em células bucais (2,3 vezes; $p=0,07$) no grupo exposto em relação ao grupo controle, mas não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos em relação a todos os marcadores de estresse oxidativo. Em conclusão, o estudo mostra que médicos residentes expostos a altas concentrações de RGA apresentam aumento significativo de danos sistêmicos no DNA e frequência aumentada de instabilidade genômica (MN bucais), mas não de estresse oxidativo. Portanto, este estudo mostra que jovens profissionais já apresentam alterações genômicas, o que reforça a importância do biomonitoramento e da diminuição da exposição aos RGA.

Palavras-chave: exposição ocupacional, poluição ambiental, médicos residentes, testes de genotoxicidade, instabilidade genômica, estresse oxidativo.

Abstract

Lucio LMC. **Concentration of waste anesthetic gases in operating rooms and assessment of genetic damage and oxidative stress in medical residents** [thesis]. Botucatu: Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista; 2016. 82 p.

This study determined the waste anesthetic gases (WAG) in operating rooms (OR) and evaluated the impact of the occupational exposure in genetic damage and oxidative stress in medical residents. The study was performed at “Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP”. The concentrations of isoflurane, sevoflurane and nitrous oxide (N_2O) were measured in ORs. Sixty-three medical residents completing their three-year Medical Residency Program were recruited for the study and were assigned to two groups: exposed group (n=32) of Anesthesiology and Surgery areas and control group (n=31) of Internal Medicine area. Blood and buccal cells were concomitantly collected from both groups and protected from light to measure genetic instability by buccal micronucleus (MN), basal and oxidized DNA damage (comet assay and 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine), biomarkers of protein and lipid oxidation, and three different assays for plasma antioxidant activity. Mean WAG concentrations were above international thresholds (2.7-fold: isoflurane; 4.9-fold: sevoflurane; 7.2-fold: N_2O). There was no significant difference between groups regarding demographic data. Basal DNA damage (p=0.01) and buccal MN frequency (by 2.3-fold; p=0.07) were increased in the exposed group compared to the control group. Results showed no significant difference for oxidative stress biomarkers between groups. In conclusion, this study shows that medical residents exposed to high WAG concentrations have increased systemic DNA damage and genomic instability (buccal MN), but not oxidative stress. Thus, these young professionals already have genetic damage in the beginning of their career. Our results reinforce the importance of the biomonitoring and also the adequate measures to decrease ambient air pollution in the OR.

Keywords: occupational exposure, environmental pollution, medical residencies, genotoxicity test, genomic instability, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1. **Fórmula estrutural e peso molecular (PM) dos anestésicos inalatórios.** Fonte: figura adaptada de Urban e Bleckwenn, 2002.……..……21

Figura 2. **Aparelho ou estação de anestesia, sob visão posterior (A) e anterior (B).** Elementos do aparelho em A: (1) conexão de saída de gases anestésicos e de vácuo às tubulações externas; (2 e 3) divisão das canulações por cor; (4) cilindros de gases – N_2O à esquerda e O_2 à direita – acoplados à máquina; (5) válvulas de medida de fluxo; (6) sistema de vácuo; (7) tubulação de exaustão de gases. Elementos do aparelho em B: (8) fluxômetros; (9) peça de conexão com vaporizador; (10) vaporizador de anestésico inalatório; (11) *flushing*; (12) traqueia, sistema de ventilação e balão que se conectam ao paciente durante ventilação mecânica; (13) válvula de limite de pressão ajustável; (14) recipiente absorvedor de CO_2 com cal sodada; (15) sistema de monitorização do paciente. Fonte: figura adaptada de Briggs e Maycock, 2013.....25

Figura 3. **Esquema representando as etapas críticas do teste do cometa alcalino.** Fonte: figura adaptada de Tice et al., 2000.…….....29

Figura 4. **A) Nucleoide com padrão de migração de DNA, detectado pelo teste do cometa**, fonte: Tice et al., 2000; **B) Danos no DNA, avaliados pelo teste do cometa, variando de zero (nenhum dano) a 4 (maior dano)**, fonte: Collins et al., 2008…….....30

Figura 5. **Fotomicrografia de célula binucleada (linfócito) contendo um micronúcleo.** Fonte: Bonassi et al., 2007…….....….31

Figura 6. **Diagrama representando corte de mucosa bucal, com suas camadas, diferentes tipos celulares e alterações detectadas pelo teste de micronúcleo bucal**. MN: micronúcleo; *NBUD: nuclear buds* (protrusões nucleares). Fonte: figura adaptada de Thomas et al., 2009.....32

Figura 7. **A) Representação do equilíbrio entre fatores pró-oxidantes (em vermelho) e antioxidantes (em verde). B) Esquema mostrando ativadores (pró-oxidantes, à esquerda com setas vermelhas) e inibidores (antioxidantes, à direita com barras verdes) das espécies reativas de oxigênio (ERO), representadas na figura pela sigla *ROS*. SOD: superóxido dismutase.** Fonte: figura adaptada de Reuter et al., 2010.....34

Figura 8. **Biomarcadores de dano oxidativo em macromoléculas**. O estresse oxidativo gera danos em macromoléculas, por exemplo no DNA, nos lipídios e nas proteínas. A presença de estresse oxidativo em macromoléculas pode ser detectada pelos subprodutos resultantes de oxidação. MDA: malonaldeído; 4-HNE: 4-hidroxinonenal; 8-OH-dG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina. Fonte: figura adaptada de Lee et al., 2015.....35

Figura 9. **Fórmula do *time-weighted average* (*TWA)***, sendo c: concentração; t: tempo; n: número de amostras; ∗: multiplicação. Fonte: Schiewe-Langgartner et al., 2005…….....39

Figura 10. **Danos basais no DNA avaliados pelo teste do cometa em linfócitos periféricos dos grupos controle e exposto.** *p = 0,01…….....……..……51

Figura 11. **Frequência de micronúcleos em 2.000 células bucais analisadas nos grupos controle e exposto.** MN = micronúcleo. p = 0,07.....52

Lista de Tabelas

Tabela 1. **Concentrações (ppm) dos resíduos de gases halogenados e de óxido nitroso (N_2O) em salas de operação (SO) do centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (médias e valores mínimos e máximos)**.....50

Tabela 2. **Dados demográficos (média ± desvio padrão ou número absoluto)**.....50

Tabela 3. **Parâmetros de marcadores de estresse oxidativo (X ± DP ou mediana e quartis) em proteínas, lipídios e DNA**.....53

Tabela 4. **Parâmetros de avaliação de capacidade antioxidante no plasma (mediana e quartis ou X ± DP)**.....53

Sumário

Dedicatória..... **iii**
Agradecimentos especiais..... **iv**
Agradecimentos..... **vi**
Epígrafe..... **xii**
Resumo..... **xiii**
Abstract..... **xiv**
Lista de Figuras..... **xv**
Lista de Tabelas..... **xvii**
1 INTRODUÇÃO..... **20**
1.1 Histórico..... **20**
1.2 Aspectos farmacológicos..... **21**
1.3 Resíduos de gases anestésicos (RGA) **23**
1.4 Riscos ambientais dos RGA..... **25**
1.5 Saúde ocupacional e exposição aos RGA..... **26**
1.6 Limites de exposição ocupacional aos RGA..... **27**
1.7 Potencial genotóxico e mutagênico dos RGA..... **28**
1.8 Estresse oxidativo e RGA..... **33**
1.9 Justificativa do estudo..... **35**
2 OBJETIVO..... **37**
3 MÉTODO..... **38**
3.1 Ética e registro..... **38**
3.2 Casuística..... **38**
3.3 Mensuração das concentrações de RGA nas SO..... **39**
3.4 Coleta de amostras biológicas..... **39**
3.5 Avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade..... **41**
3.5.1 Danos basais no DNA (teste do cometa) **41**
3.5.2 Teste do MN bucal..... **42**
3.6 Avaliação de estresse oxidativo..... **43**
3.6.1 Danos oxidativos no DNA..... **43**
3.6.1.1 Teste do cometa com utilização de enzimas..... **43**
3.6.1.2 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG)..... **44**
3.6.2 Peroxidação lipídica e oxidação proteica..... **44**
3.6.2.1 4-Hidroxinonenal (4-HNE)..... **45**
3.6.2.2 Malonaldeído (MDA) **45**
3.6.2.3 Proteínas carboniladas..... **45**
3.6.3 Testes de capacidade de defesa antioxidante..... **46**
3.6.3.1 *Ferric Reducing Antioxidant Power* (*FRAP*) **46**
3.6.3.2 *Aqueous Oxygen Radical Absorbent Capacity Assay* (*ORAC*) **47**
3.6.3.3 *Total Antioxidant Performance* (*TAP*)..... **47**

3.7 Análise estatística..... **48**
4 RESULTADOS..... **50**
5 DISCUSSÃO..... **54**
6 CONCLUSÃO..... **61**
7 REFERÊNCIAS..... **62**
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa..... **72**
ANEXO B - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos..... **73**
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) **74**
APÊNDICE B - Questionário..... **77**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Os anestésicos inalatórios são fármacos de uso amplo e rotineiro em anestesia geral. A demonstração pública inédita do dietil éter como anestésico inalatório por William Morton, em 1846, no *Massachusetts General Hospital*, em Boston, nos Estados Unidos, possibilitou a realização de procedimento cirúrgico livre de dor, dando lugar a uma das mais significativas descobertas científicas da medicina (Whalen et al., 2005).

A prática da Anestesiologia assistiu, desde então, a profunda evolução nesse campo, à medida em que outros anestésicos foram se consagrando, tais como óxido nitroso (N_2O), clorofórmio e tricloroetileno. Entretanto, a elevada toxicidade e o risco de explosão dentro do ambiente cirúrgico relacionados a esses agentes descontinuaram seu uso e fomentaram a procura por anestésicos mais seguros (Campagna et al., 2003). Na década de 1950, sintetizou-se o primeiro composto derivado do íon fluoreto, o fluoroxeno, que chegou a ser testado clinicamente, mas logo foi descartado por ser extremamente tóxico. O halotano é um hidrocarbono halogenado sintetizado em 1957, cuja reduzida flamabilidade em relação aos agentes então disponíveis consolidou-o como o principal anestésico inalatório da época, perdurando até hoje (Moppett, 2012). Seguiu-se, em 1960, o metoxiflurano, que teve seu uso limitado devido à elevada nefrotoxicidade (Reichle e Conzen, 2003). Nessa mesma época, relatos de raros casos de hepatite fatal relacionados ao halotano impulsionaram a busca por agentes inalatórios novos e mais seguros sintetizados na década de 1960, tais como enflurano em 1963 e seu isômero isoflurano em 1965, além do sevoflurano e do desflurano (popularizados em meados da década de 1990) (Urban e Bleckwenn, 2002; Torri, 2010). O xenônio, reconhecido por ser um gás inerte e inodoro, apresenta rápida absorção e eliminação pulmonar, nenhum metabolismo hepático e renal e mínimos efeitos cardiovasculares. Entretanto, seu uso é ainda restrito, pelo alto custo e limitada disponibilidade (Campagna et al., 2003). Assim, o anestésico inalatório ideal ainda não existe, sendo importante tópico de investigação (Whalen et al., 2005; Torri, 2010). Na figura 1 podem-se visualizar todas as estruturas químicas dos anestésicos inalatórios que já foram ou ainda são empregados na prática clínica.

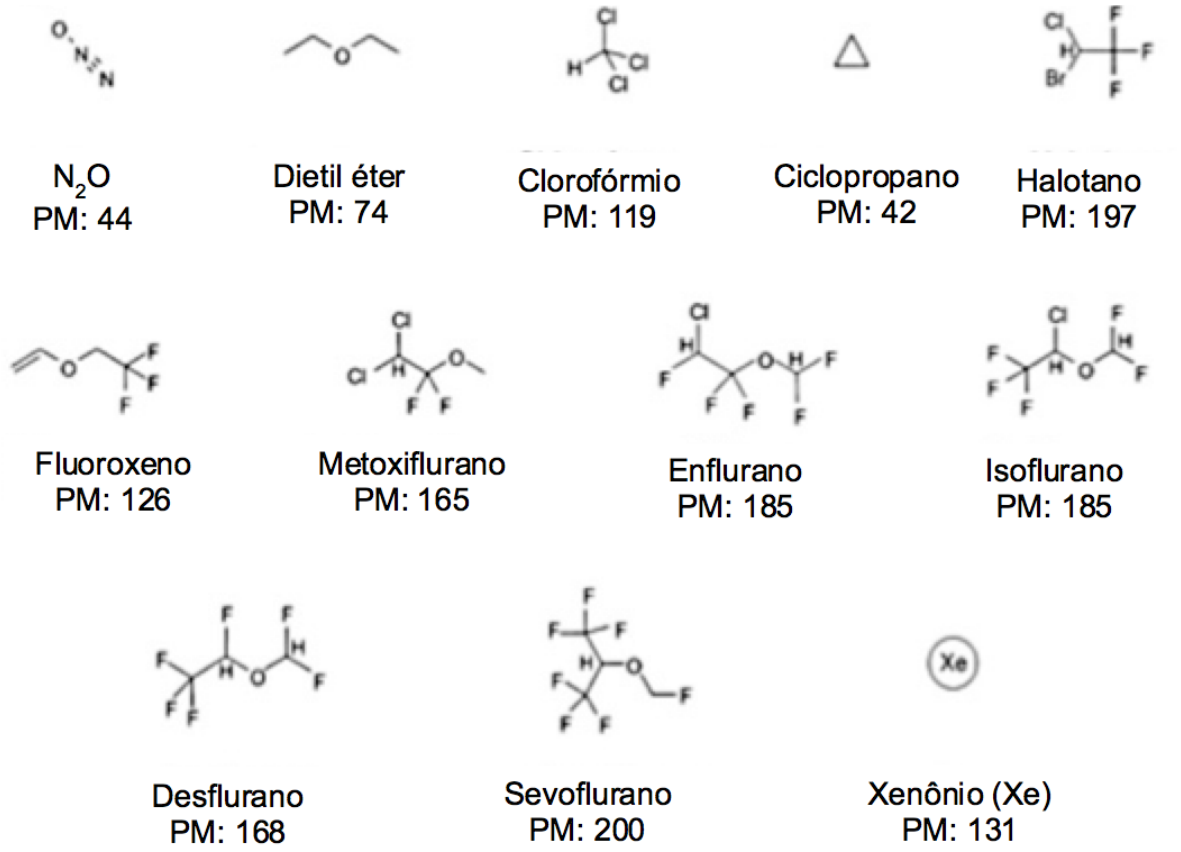


Figura 1 - Fórmula estrutural e peso molecular (PM) dos anestésicos inalatórios. Fonte: figura adaptada de Urban e Bleckwenn, 2002.

1.2 Aspectos farmacológicos

O mecanismo de ação dos anestésicos inalatórios é motivo de extensa pesquisa, sendo mais recentemente focado nos alvos moleculares, especificamente em canais iônicos localizados na membrana das células neuronais (Rudolph e Antkowiak, 2004). Tais canais incluem receptores para neurotransmissores (por exemplo ácido gama-aminobutírico tipo A, glicina, receptores colinérgicos nicotínicos, serotonina e glutamato), além de canais de cálcio, sódio e potássio (Kopp Lugli et al., 2009). A interação dos anestésicos inalatórios com esses sítios iônicos determina ação inibitória sobre o sistema nervoso central. Apesar desse entendimento global, os complexos mecanismos subjacentes à perda da consciência e amnésia, tão essenciais à indução e manutenção da anestesia geral, ainda não são plenamente compreendidos. Por outro lado, a imobilidade é fruto da ação desses fármacos na medula espinhal (Hemmings et al., 2005).

No escopo farmacológico, a potência e a dosagem dos anestésicos inalatórios são expressas em unidades de concentração alveolar mínima (CAM), definida como a concentração alveolar do agente necessária para impedir a mobilidade à incisão cirúrgica em 50% dos pacientes (Harper, 2004). Além da CAM, outro fator determinante para a absorção do anestésico é sua solubilidade no sangue, representada pelo coeficiente de partição sangue-gás, o qual se define pela razão das concentrações do anestésico no sangue e na forma gasosa, quando essas duas formas se encontram em equilíbrio (Harper, 2004).

Os efeitos adversos dos agentes halogenados devem-se a subprodutos do metabolismo e/ou degradação (Kharasch, 2008). Em pacientes, destacam-se os efeitos renais, cardiovasculares, neurológicos, respiratórios e hepáticos. Quanto aos efeitos renais, sobressaem-se a formação intrarrenal de íons fluoreto inorgânicos pelo metoxiflurano e o potencial para formação de composto A (fluorometil-2,2-difluoro-1-[trifluorometil]vinil-éter) a partir do sevoflurano, como produto da interação entre sevoflurano e absorvedores de dióxido de carbono presentes na estação de anestesia (Reichle e Conzen, 2003; Kharasch et al., 2005). Apesar de ter levado a danos renais em estudos animais (Kharasch et al., 2005), a formação de composto A no período perioperatório em pacientes anestesiados com sevoflurano já foi extensamente avaliada e não mostrou efeitos clinicamente relevantes em seres humanos (Kharasch, 2008). Entre os efeitos cardiovasculares, arritmias cardíacas devido à sensibilização miocárdica pelas catecolaminas são vistas em maior frequência com o halotano, seguido do enflurano (Stachnik, 2006). No tocante à neurotoxicidade, sobressaem-se alterações neurodegenerativas principalmente em pacientes idosos (Hudson e Hemmings, 2011), além de aumento da pressão intracraniana sobretudo com halotano (Steen e Michenfelder, 1979). No sistema respiratório, os anestésicos inalatórios causam depressão respiratória dose-dependente, irritação das vias aéreas a depender da pungência (sendo o desflurano o mais pungente), e broncodilatação (Torri, 2010). Além disso, destaca-se hepatotoxicidade imunomediada relacionada principalmente ao halotano, pela produção de metabólito oxidativo (cloreto de trifluoroacetila) (Moppett, 2012). Outros efeitos observados são: hipertermia maligna (potencialmente por qualquer anestésico inalatório, mais comum, porém, com halotano), agitação na recuperação anestésica (observada em 12% a 30% das crianças e mais frequente com

desflurano e sevoflurano) e náuseas e vômitos pós-operatórios (Stachnik, 2006; Silva et al., 2008).

O N_2O, descoberto como anestésico em 1844, firmou-se na história da Anestesiologia como um gás de vasta popularidade para procedimentos cirúrgico-anestésicos e odontológicos, por seu destacado perfil de segurança (Yasny e White, 2012). Em concentrações subanestésicas, possui propriedades analgésicas, o que se pode correlacionar à provável ação em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Sanders et al., 2008). Outra propriedade que favorece seu uso é a ação aditiva, quando administrado com outros anestésicos inalatórios, uma vez que sua rápida absorção (relacionada à CAM de 104% e ao baixo coeficiente de partição sangue-gás) deixa o alvéolo livre para acomodar maior pressão parcial do segundo anestésico. Essa característica permite uma pressão diferencial alvéolo-sangue favorável, como também a migração do outro agente para a corrente sanguínea (efeito do segundo gás) (Moppett, 2012). Dessa forma, apesar de ter baixa potência anestésica quando em uso isolado, sua aplicabilidade clínica como coadjuvante permite o uso de outros anestésicos em menor concentração e acelera a indução e a recuperação anestésicas (De Hert, 2015).

Apesar das vantagens supracitadas, o N_2O oxida o íon cobalto presente na cobalamina (vitamina B12), levando à inibição da metionina sintetase com produção reduzida de metionina e tetrahidrofolato, e seus subprodutos timidina e ácidos nucleicos (incluindo o ácido desoxirribonucleico - DNA) (Takács, 2001). Tais alterações estão relacionadas à anemia megaloblástica, agranulocitose, degeneração combinada subaguda da medula espinhal e distúrbios neurocomportamentais em indivíduos sob exposição crônica e/ou elevadas concentrações de N_2O (Sanders et al., 2008).

1.3 Resíduos de gases anestésicos (RGA)

RGA são pequenas quantidades de anestésicos inalatórios presentes principalmente no ar ambiente das salas de operação (SO) e da recuperação pós-anestésica (SRPA). Anestésicos halogenados, entre os quais halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano e desflurano, e N_2O são os principais constituintes dos RGA, por enquadrarem o rol de anestésicos de uso clínico mais frequente (National Institute for Occupational Safety and Health, 2007).

A poluição do ambiente cirúrgico com RGA deve-se essencialmente a três causas: técnicas anestésicas, estação de anestesia e SO com ou sem sistema de exaustão de gases (Yasny e White, 2012). Quanto às técnicas anestésicas, podem-se enumerar como principais fatores: 1) indução e/ou manutenção da anestesia geral com anestésicos inalatórios, principalmente na indução anestésica em pacientes pediátricos utilizando-se máscara facial; 2) falha no desligamento tanto da válvula que controla o fluxo (fluxômetro) de gás quanto do vaporizador (quando a SO está sem paciente); 3) escoamento de líquido anestésico no preenchimento do vaporizador; 4) realização de *flushing* (lavagem do circuito com alto fluxo de oxigênio) ao fim do procedimento cirúrgico para acelerar a recuperação da anestesia inalatória (prática comum e extremamente danosa); 5) problemas com acoplamento da máscara facial, seja por material impróprio para uso, tamanho inadequado ou ainda por dificuldades relacionadas à via aérea do paciente; 6) vazamento de gás decorrido de insuflação insuficiente do balonete do tubo orotraqueal (TOT) ou de máscara laríngea, ou ainda pelo uso de TOT sem balonete; 7) utilização de fluxo de gases frescos (FGF) intermediário (2 - 4 l/min) e principalmente alto fluxo (> 4 l/min) (Baker, 1994); 8) utilização de capnógrafo do tipo *sidestream* sem retorno dos gases ao aparelho de anestesia; e 9) utilização de sistema respiratório de Mapleson, principalmente em anestesia pediátrica (Baker, 1994; Hoerauf et al., 1996; Hoerauf et al., 1999a; Oliveira, 2009).

Em relação à estação de anestesia (figura 2), inúmeros componentes podem ser motivo de escape de anestésicos para o ar ambiente. Eventuais vazamentos podem ser provenientes de válvulas e conexões do circuito respiratório, defeitos em peças e balões reservatórios (Yasny e White, 2012; Briggs e Maycock, 2013).

As SO podem ou não ter sistema de exaustão de gases. Quando há sistema de exaustão, ele pode ser total (quando há sucção central que retira o ar da SO por meio de pressão negativa, levando toda a corrente de ar com gás anestésico para o exterior, sem recirculação do ar) ou parcial (quando há sucção central que retira o ar da SO por meio de pressão negativa, que leva parcialmente o ar com gás anestésico para o exterior, havendo recirculação do ar). Já nas SO sem sistema de exaustão, há simplesmente a circulação natural da corrente de ar oriunda de aparelhos de ar condicionado não centrais (Briggs e Maycock, 2013).

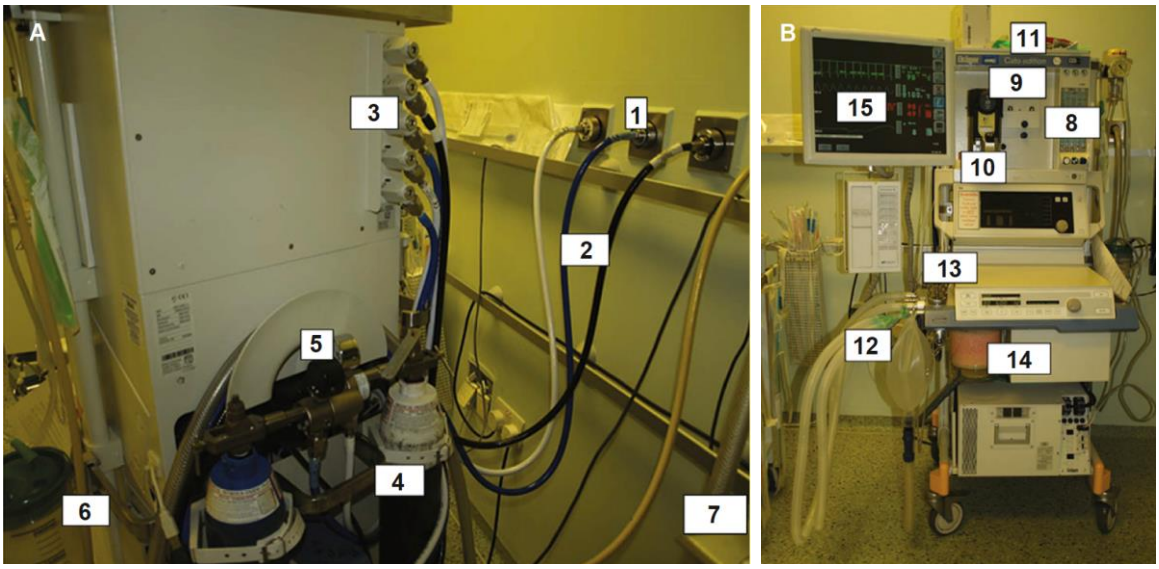


Figura 2 - Aparelho ou estação de anestesia, sob visão posterior (A) e anterior (B). Elementos do aparelho em A: (1) conexão de saída de gases anestésicos e de vácuo às tubulações externas; (2 e 3) divisão das canulações por cor; (4) cilindros de gases – N_2O à esquerda e O_2 à direita – acoplados à máquina; (5) válvulas de medida de fluxo; (6) sistema de vácuo; (7) tubulação de exaustão de gases. Elementos do aparelho em B: (8) fluxômetros; (9) peça de conexão com vaporizador; (10) vaporizador de anestésico inalatório; (11) *flushing*; (12) traqueia, sistema de ventilação e balão que se conectam ao paciente durante ventilação mecânica; (13) válvula de limite de pressão ajustável; (14) recipiente absorvedor de CO_2 com cal sodada; (15) sistema de monitorização do paciente. Fonte: figura adaptada de Briggs e Maycock, 2013.

1.4 Riscos ambientais dos RGA

Os RGA eliminados das SO para o meio externo chegam à atmosfera inalterados e causam impacto ambiental. Os danos ambientais causados pelos gases anestésicos dependem do seu peso molecular, da proporção de átomos halogenados e da sua meia-vida na atmosfera. Como dados da meia-vida atmosférica aproximada dos gases anestésicos têm-se: N_2O – 114 anos, desflurano – 10 anos, halotano – 7 anos, sevoflurano – 5 anos e isoflurano – 3 anos (Ishizawa, 2011). Todos os anestésicos inalatórios em uso contêm compostos halogenados que se assemelham aos clorofluorocarbonos e, portanto, apresentam efeitos deletérios na camada de ozônio. O N_2O, além de ser um dos gases depletores da camada de ozônio, apreende a radiação térmica emanada da superfície terrestre e contribui para o fenômeno de aquecimento global conhecido como “efeito estufa” (Ishizawa, 2011).

1.5 Saúde ocupacional e exposição aos RGA

A possibilidade de riscos à saúde relacionados à exposição aos anestésicos inalatórios tem sido muito discutida nas últimas décadas (Byhahn et al., 2001; Eroglu et al., 2006; Steege et al., 2014). Diversos profissionais (médicos e veterinários anestesiologistas e cirurgiões, enfermeiros e profissionais da saúde afins, além de estudantes) atuantes em SO e/ou SRPA são os principais expostos aos RGA (NIOSH, 2007).

O primeiro estudo que chamou a atenção da comunidade científica para os riscos associados à exposição aos RGA foi conduzido por Vaisman, na União Soviética, em 1967. Sua pesquisa envolveu 198 homens e 110 mulheres anestesiologistas expostos principalmente a dietil éter, N_2O e halotano, e demonstrou não apenas sintomas como fadiga, cefaleia e irritabilidade, mas também evidenciou, pela primeira vez, efeito adverso no sistema reprodutivo. Foram, então, relatados 18 casos de aborto espontâneo de um total de 31 gestações em anestesiologistas expostas a RGA (Vaisman, 1967). Tal achado suscitou grande preocupação quanto à segurança dos profissionais expostos. Em 1974, a *American Society of Anesthesiologists* (*ASA*) publicou, nos Estados Unidos, o estudo intitulado *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* (Cohen et al., 1974). Comparou-se, por meio de questionário, um grupo de 49.585 profissionais expostos aos RGA a um grupo constituído de 23.911 indivíduos sem exposição. Observou-se nas mulheres expostas risco aumentado de aborto espontâneo, anomalias congênitas, câncer e doenças hepáticas e renais. Já os anestesiologistas do sexo masculino incorreram em risco aumentado de doenças hepáticas e filhos com anormalidades congênitas (Cohen et al., 1974).

Posteriormente, tais estudos foram revistos por outros autores, verificando-se inúmeros erros metodológicos e vieses (por exemplo, viés de respondedor na análise dos questionários e fatores confundidores, tais como estresse psicológico e longas jornadas de trabalho). Isso veio a enfraquecer, sobretudo, a evidência da associação causal entre exposição aos anestésicos inalatórios e desfechos reprodutivos negativos (aborto espontâneo e anormalidades congênitas) (McGregor et al., 1999; Byhahn et al., 2001).

1.6 Limites de exposição ocupacional aos RGA

Diante do exposto, houve necessidade de recomendações formais para reduzir a exposição ocupacional aos RGA, com destaque para o *National Institute for Occupational Safety and Health* (*NIOSH*), em 1977 (NIOSH, 1977), que sugeriu a adoção de limites de exposição aos RGA em quaisquer ambientes passíveis de administração desses agentes. Determinaram-se, assim, como limites de exposição ocupacional: 2 partes por milhão (ppm) – *ceiling* – aos agentes halogenados e de 25 ppm – *time-weighted average* (*TWA*) – ao N_2O durante seu tempo de administração. Além disso, recomendou-se a implementação de sistemas de exaustão efetivos (*scavengers*) que permitem uma eficiente renovação do ar nas SO (NIOSH, 1977). Instituíram-se, assim, nos Estados Unidos, protocolos e condutas técnicas em anestesia para evitar o vazamento de gás anestésico para a SO, tais como cuidados com máscara facial, vaporizadores, fluxômetros e testes para identificar vazamentos em sistemas de alta e de baixa pressão. A vigilância ao estado de saúde dos médicos expostos, com exames físicos e laboratoriais seriados, conforme a necessidade, também foi abordada, bem como a necessidade de monitorizar o ar ambiente para determinar as concentrações dos RGA, com documentação por meio de relatórios e inspeções seriadas (NIOSH, 1977).

Após a regulamentação dessas medidas de segurança adotadas em relação à exposição ocupacional aos RGA, outros países também implementaram legislação própria. O *British Government Health Services Advisory Committee*, por exemplo, estabeleceu valores limites em *TWA* de 8 h de 100 ppm para N_2O, 50 ppm para enflurano e isoflurano e 10 ppm para halotano, por serem esses valores muito inferiores aos que causam efeitos adversos relatados em estudos experimentais (Health and Safety Executive, 1996). Outros exemplos de nações com legislação própria são França, Suíça, Alemanha (ISSA International Section on the Prevention of Occupational Risks in Health Services, 1997), além de Áustria, Holanda, Itália, Suécia, Noruega, Dinamarca e Polônia (Wiesner et al., 2001a; Panni e Corn, 2003).

No Brasil, a exposição ocupacional aos RGA ainda é assunto pouco explorado e carece de regulamentação pela legislação trabalhista. Os limites máximos de gases anestésicos seguros ao trabalhador são ausentes, assim como recomendações sobre monitorização e fiscalização. A Norma Regulamentadora NR 15 (sobre atividades e operações insalubres) traz referência ao N_2O, a ser limitado em “doses asfixiantes”. Por sua vez, a NR 32 (norma de segurança e saúde no

trabalho em estabelecimentos de assistência à saúde), apesar de endereçar o tema mais diretamente citando os direitos da trabalhadora gestante exposta aos RGA, o faz de forma pouco clara e insuficiente (Oliveira, 2009).

Vale destacar o pioneirismo de trabalho nacional, realizado em nossa Instituição (com o intuito de mimetizar a exposição ocupacional dos anestesiologistas), o qual comparou as concentrações de halotano no ar e no sangue de animais expostos à poluição da sala de experimentação com e sem o sistema Venturi (Vane et al., 1990). Os autores mostraram a eficiência deste sistema antipoluição na exaustão de RGA. A maioria dos anestesiologistas de centros cirúrgicos brasileiros utiliza os mais variados tipos de anestésicos inalatórios (de halotano até desflurano) sem utilizar protocolos de conduta para redução de vazamentos e de poluição em SO, as quais não possuem sistema de exaustão para eliminação de RGA. Some-se a isso a quantidade reduzida de estudos que abordam a exposição ocupacional aos RGA no Brasil, o que dificulta a percepção desse impacto na população e nos profissionais de saúde (Chinelato e Froes, 2002; Araujo et al., 2013; Costa Paes et al., 2014; Chaoul et al., 2015). Nesse contexto, ressalta-se a novidade e a importância de se mensurarem as concentrações dos RGA em SO de hospitais brasileiros que não contam com sistemas apropriados de exaustão de gases, realidade que representa a grande maioria dos centros cirúrgicos nacionais.

A preocupação com a exposição ocupacional, quanto às limitações das concentrações de RGA, é tema pertinente, devido aos potenciais riscos à saúde dos profissionais expostos. É fato bem documentado que tal exposição, mesmo que por breve período, pode se refletir em sinais e sintomas como cefaleia, irritabilidade, fadiga, náusea, tontura, dificuldade de julgamento e coordenação (NIOSH, 2007). Alterações mais sérias em indivíduos expostos, incluindo danos renais e hepáticos e condições neurodegenerativas (como doença de Parkinson e alterações proprioceptivas) também já foram relatadas (Vouriot et al., 2005; Mastrangelo et al., 2013; Casale et al., 2014).

1.7 Potencial genotóxico e mutagênico dos RGA

Um dos importantes focos de várias pesquisas é em relação ao potencial de genotoxicidade e mutagenicidade dos anestésicos inalatórios avaliados em animais

(Brozovic et al., 2010; Rocha et al., 2015), pacientes (Karabiyik et al., 2001; Alleva, 2003; Braz et al., 2011; Braz et al., 2015; Nogueira et al., 2016) e profissionais ocupacionalmente expostos (Hoerauf et al., 1999b; Wiesner et al., 2008; Rozgaj et al., 2009; Musak et al., 2013). De fato, biomarcadores genéticos têm sido muito empregados para monitorizar a exposição humana a agentes genotóxicos e/ou mutagênicos com potencial de efeito carcinogênico (Norppa, 2004). Dentre os principais marcadores de genotoxicidade e mutagenicidade, figuram o teste do cometa, micronúcleo (MN), aberrações cromossômicas (AC) e trocas entre cromátides-irmãs (TCI).

O teste do cometa é um método sensível e de baixo custo para mensurar danos no DNA, tendo se consolidado como importante ferramenta para avaliar genotoxicidade, em estudos de risco ocupacional (Collins et al., 2008). O teste se baseia na colocação de células eucarióticas em lâminas com agarose em solução de lise e posteriormente submetidas à eletroforese em meio alcalino (pH > 13), onde ocorre a migração de fragmentos de material genético (resultantes de quebras de fitas simples e/ou duplas de DNA, além de sítios álcali-lábeis), os quais podem assemelhar-se a “cometas” (figura 3). Quanto maior a quantidade de danos no DNA, maior a cauda do “cometa” – figura 4 (Singh et al., 1988; Tice et al., 1991; Tice et al., 2000).

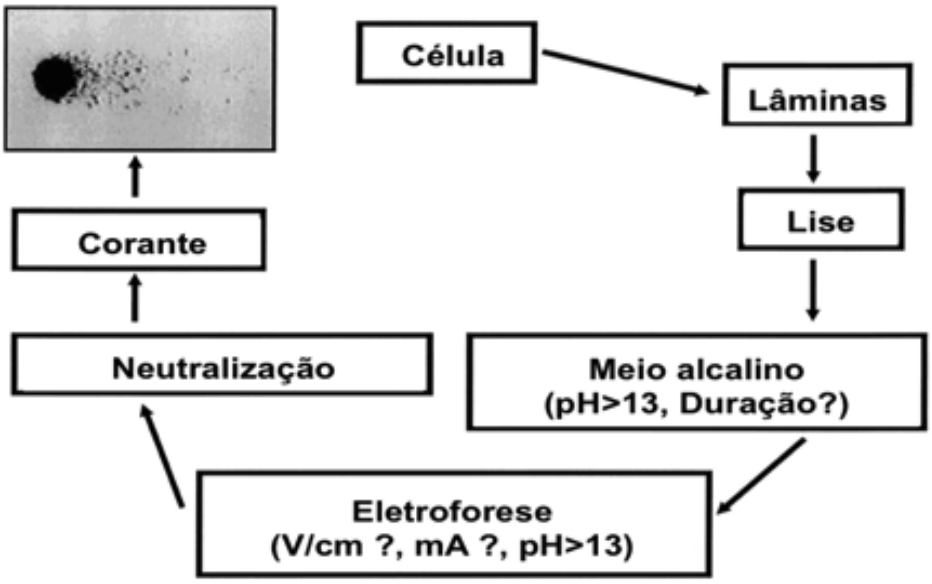


Figura 3 - Esquema representando as etapas críticas do teste do cometa alcalino. Fonte: figura adaptada de Tice et al., 2000.

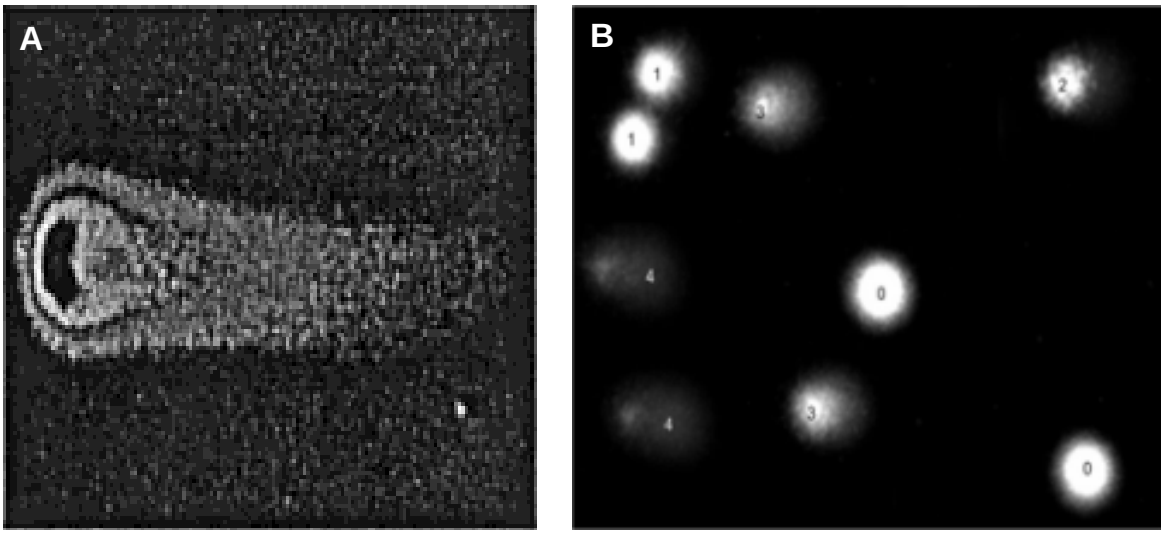


Figura 4 - A) Nucleoide com padrão de migração de DNA, detectado pelo teste do cometa, fonte: Tice et al., 2000; **B) Danos no DNA, avaliados pelo teste do cometa, variando de zero (nenhum dano) a 4 (maior dano)**, fonte: Collins et al., 2008.

Existem evidências da interação entre radicais livres derivados de oxigênio ou nitrogênio com bases de DNA, resultando em danos que produzem bases oxidadas, sítios abásicos e/ou quebras em fitas de DNA (Martien e Abbadie, 2007; Cadet et al., 2010). O teste do cometa, tradicionalmente usado para avaliar danos basais no DNA, também pode ser modificado com a utilização de enzimas endonuclease III (endo III) e formamidopirimidina glicosilase (FPG) para avaliar danos oxidativos no DNA em pirimidinas e purinas, respectivamente (Collins et al., 1993; Cadet et al., 2003). Esse enfoque foi encontrado em apenas um estudo na literatura, que avaliou danos oxidativos no DNA em enfermeiras expostas cronicamente a RGA, mostrando aumento de purinas oxidadas (FPG) (Wrońska-Nofer et al., 2012). Entretanto, não constam, até o momento, registros de estudos avaliando danos oxidativos em pirimidinas em indivíduos expostos aos RGA.

Os MN são corpúsculos extranucleares formados a partir de fragmentos de cromossomo ou de cromossomos inteiros que foram excluídos do núcleo principal da “célula filha” durante a divisão celular – figura 5 (Bonassi et al., 2007). Sua ocorrência representa instabilidade genética e comprometimento na viabilidade celular causados por defeitos genéticos ou exposição exógena a agentes genotóxicos/mutagênicos (Fenech, 2000; Iarmarcovai et al., 2008; Thomas et al., 2009). A associação entre MN detectados em linfócitos periféricos e câncer tem

suporte teórico. Um estudo do tipo coorte realizado pelo projeto internacional *HUman MicroNucleus (HUMN)* de 1980 a 2002, envolvendo 10 países e 6.718 indivíduos, relacionou a frequência de MN em linfócitos periféricos a aumento de risco de câncer em uma população considerada saudável. O projeto *HUMN* encontrou correlação positiva entre número de MN e aumento do risco relativo de neoplasias malignas principalmente dos sistemas urogenital e gastrintestinal (Bonassi et al., 2007).

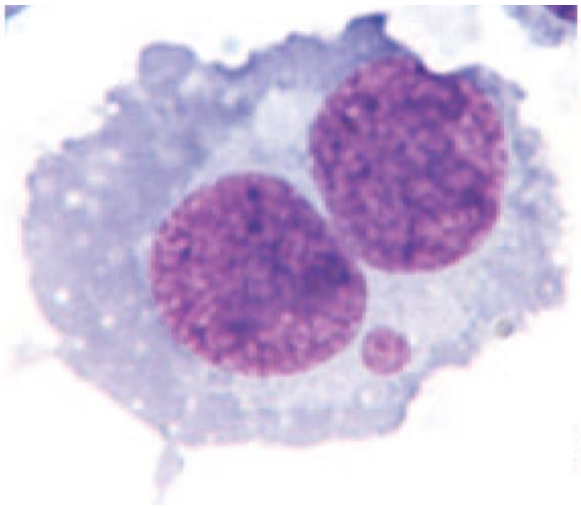


Figura 5 - Fotomicrografia de célula binucleada (linfócito) contendo um micronúcleo. Fonte: Bonassi et al., 2007.

O uso de MN em células bucais (avaliado pelo teste *Buccal Micronucleus Cytome)* é bem consolidado e validado internacionalmente, tendo sido amplamente difundido na última década por estudos de biomonitoramento humano para avaliar exposição a agentes genotóxicos e/ou carcinógenos, além de doenças neoplásicas ou degenerativas. Suas vantagens incluem: 1) coleta minimamente invasiva de células da mucosa bucal; 2) elevada sensibilidade; 3) especificidade em detectar os efeitos da exposição a agentes genotóxicos inalados ou ingeridos; 4) facilidade de armazenamento de amostras em temperatura ambiente sem necessidade de cultivo celular; e 5) baixo custo (Ceppi et al., 2010; Bonassi et al., 2011). O teste do MN bucal também permite avaliar alterações nucleares e diferentes estágios de diferenciação e morte celular (figura 6) (Bolognesi et al., 2015). A frequência de MN

nas células exfoliadas bucais tem ainda correlação positiva com aquela encontrada em linfócitos, mostrando que efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos observados na corrente sanguínea, assim como seus potenciais riscos (a exemplo da associação com câncer), são detectados na mucosa oral (Ceppi et al., 2010). Ademais, as células exfoliadas da mucosa oral representam a primeira barreira biológica de contato com os anestésicos inalatórios e somente um único trabalho, publicado até o momento, realizou o teste de MN bucal em profissionais de saúde expostos aos RGA (Chandrasekhar et al., 2006).

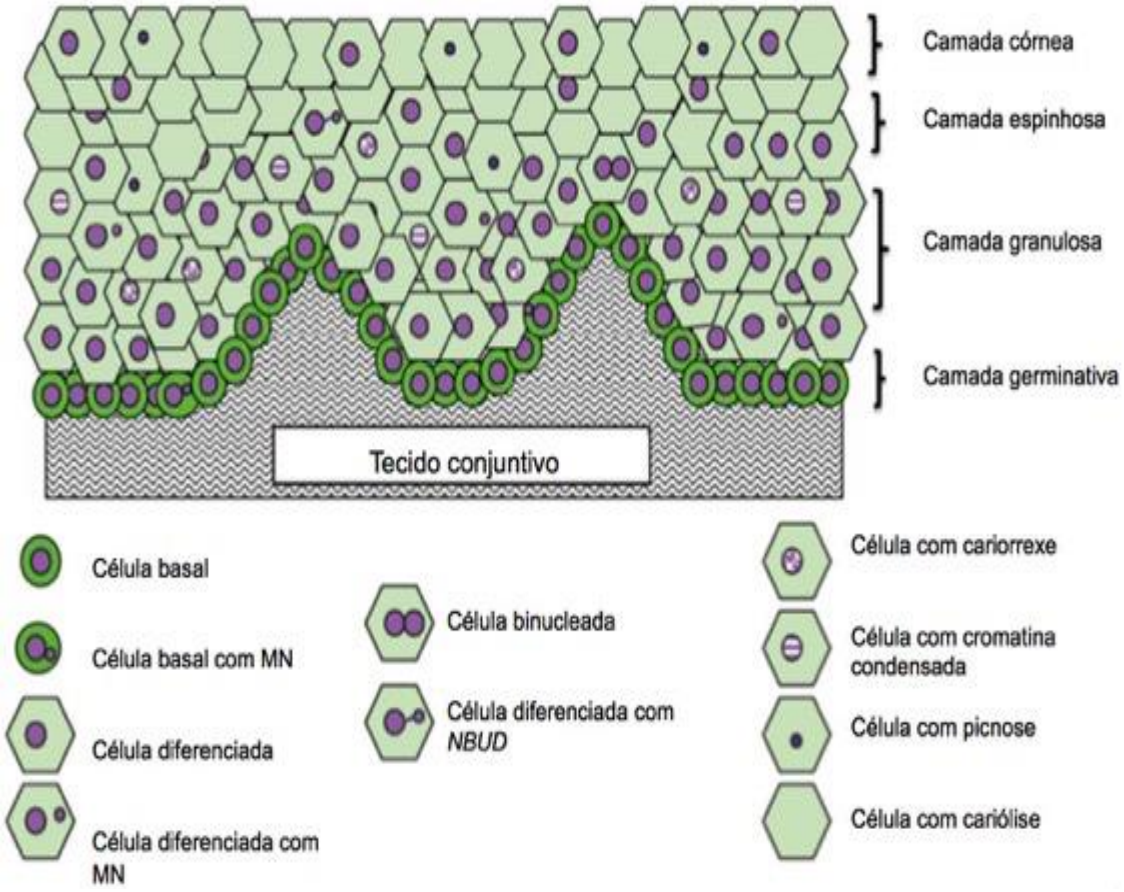


Figura 6 - Diagrama representando corte de mucosa bucal, com suas camadas, diferentes tipos celulares e alterações detectadas pelo teste de micronúcleo bucal. MN: micronúcleo; *NBUD: nuclear buds* (protrusões nucleares). Fonte: figura adaptada de Thomas et al., 2009.

Apesar da ampla investigação do risco genotóxico e mutagênico de anestésicos inalatórios, estudos envolvendo a exposição ocupacional crônica aos RGA têm mostrado resultados conflitantes. Os resultados, ora positivos (Chandrasekhar et al., 2006; Wrońska-Nofer et al., 2012) ora negativos (Bozkurt et al., 2002; Szyfter et al., 2016), denotam que o tópico se mantém aberto à necessidade de mais pesquisas. Ademais, na literatura ao nosso alcance, há apenas um estudo, realizado em Manaus-AM, por nosso grupo de pesquisa, que avaliou os danos basais no DNA de médicos expostos aos RGA durante a Residência Médica (Costa Paes et al., 2014). Isso não só justifica a presente pesquisa, como também reflete a importância da busca em detectar alterações precoces no material genético de indivíduos expostos por período relativamente curto, como médicos residentes atuantes em SO.

1.8 Estresse oxidativo e RGA

Por definição, estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes (Ferreira e Matsubara, 1997; Reuter et al., 2010) (figura 7). Radicais livres são moléculas instáveis com elétrons não pareados, sendo, então, extremamente reativos. Quando esses radicais livres e demais moléculas surgem em decorrência de reações oxidativas nos sistemas biológicos passam a ser denominados de ERO (Halliwell e Gutteridge, 1989), podendo dar início a uma cascata de reações com macromoléculas biológicas (Betteridge, 2000). Importantes exemplos dessas reações são lipoperoxidação, dano proteico e danos oxidativos em ácidos nucleicos. A primeira envolve o ataque de radicais livres/ERO a membranas e lipoproteínas e está implicada no desenvolvimento de inúmeras doenças, tais como aterosclerose, câncer e doenças degenerativas e inflamatórias (Gasparovic et al., 2013). Já o dano proteico ocorre pela formação de grupos proteicos chamados carbonila, que podem induzir proteólise nas bases do DNA (dano oxidativo no DNA), com sua quebra em fitas simples e duplas (como, por exemplo, a conversão de guanidina em 8-hidroxiguanidina). Em última análise, os radicais livres podem ser tóxicos em tecidos ou órgãos, com consequente lesão celular, necrose e apoptose (Halliwell, 1994). É bem estabelecida a relação entre estresse oxidativo e envelhecimento, inflamação e mutagênese (Ferguson, 2010; Smith et al., 2016).

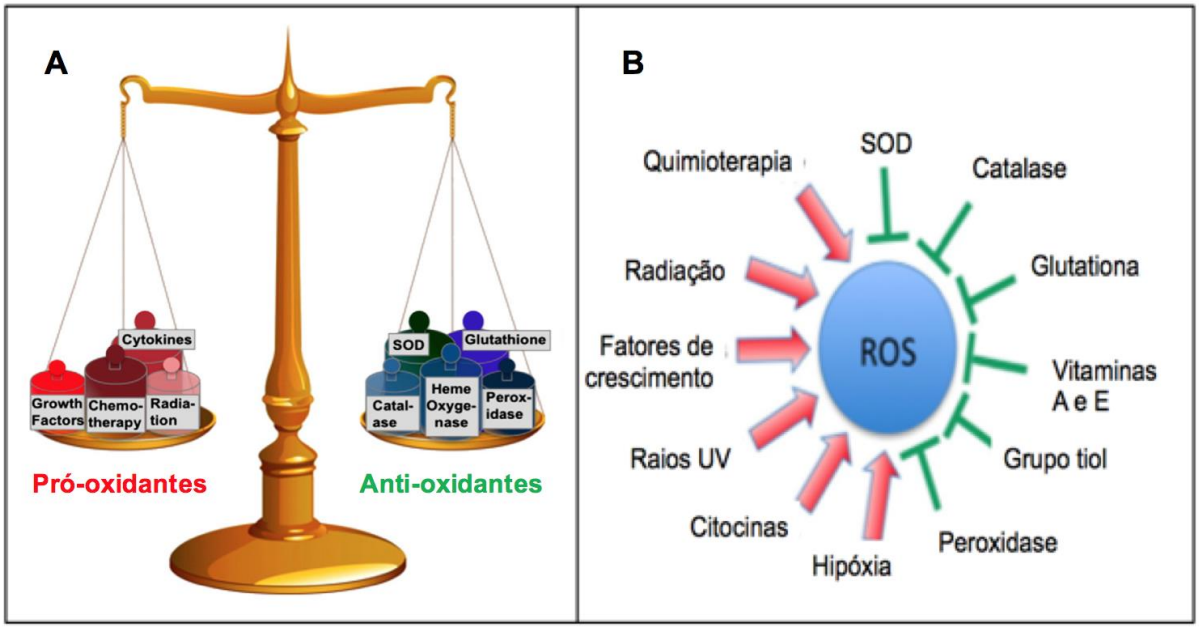


Figura 7 - A) Representação do equilíbrio entre fatores pró-oxidantes (em vermelho) e antioxidantes (em verde). B) Esquema mostrando ativadores (pró-oxidantes, à esquerda com setas vermelhas) e inibidores (antioxidantes, à direita com barras verdes) das espécies reativas de oxigênio (ERO), representadas na figura pela sigla *ROS*. SOD: superóxido dismutase. Fonte: figura adaptada de Reuter et al., 2010.

O estresse oxidativo tem sido objeto de estudo, por meio da utilização de diversos biomarcadores (figura 8). É bem conhecido o uso de subprodutos de oxidação proteica (proteínas carboniladas, S-glutationilação e nitrotirosina), oxidação do DNA (ex. 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina ou 8-OH-dG, fosforilação de resíduos de histona e aumento de migração de DNA pelo teste do cometa) e peroxidação lipídica (malonaldeído ou MDA e 4-hidroxinonenal ou 4-HNE) para determinar a avaliação de estresse oxidativo (Lee et al., 2015). Sob outra óptica, pode-se avaliar o estresse oxidativo pela redução das defesas antioxidantes, seja por meio da mensuração de agentes antioxidantes enzimáticos (ex. superóxido dismutase ou SOD, glutationa peroxidase ou GPX, catalases e outras) ou não enzimáticos (ex. ácido ascórbico ou vitamina C, α-tocoferol ou vitamina E, albumina, ácido úrico, entre outros), seja por testes que quantificam a capacidade antioxidante (Niki, 2010). Entre os testes de mensuração da capacidade antioxidante plasmática, figuram os testes *Ferric Reducing Antioxidant Power* (*FRAP*) e *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (*ORAC*), que quantificam a capacidade de redução de uma amostra no

compartimento hidrofílico do plasma e o *Total Antioxidant Performance* (*TAP*), que avalia tanto a interface hidrofílica quanto a lipofílica de uma amostra (Aldini et al., 2001). Esses testes são sensíveis e podem ser aplicados em diversos fluidos biológicos, células e tecidos (McKay et al., 2010).

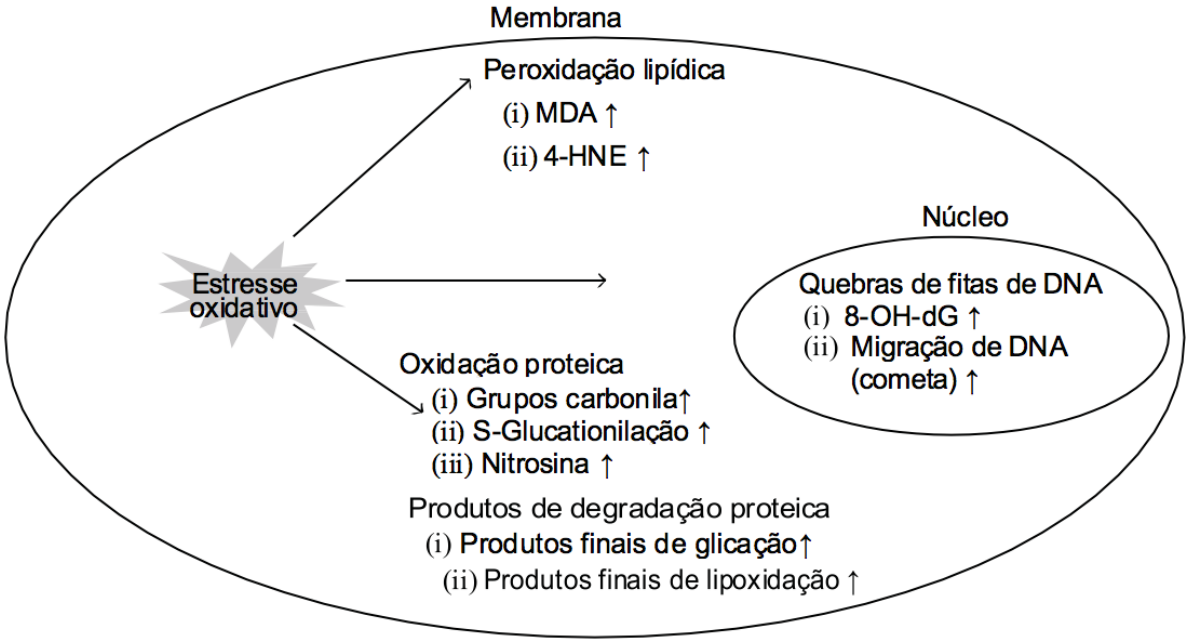


Figura 8 - Biomarcadores de dano oxidativo em macromoléculas. O estresse oxidativo gera danos em macromoléculas, por exemplo, no DNA, nos lipídios e nas proteínas. A presença de estresse oxidativo em macromoléculas pode ser detectada pelos subprodutos resultantes de oxidação. MDA: malonaldeído; 4-HNE: 4-hidroxinonenal; 8-OH-dG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina. Fonte: figura adaptada de Lee et al., 2015.

Possível relação entre exposição ocupacional aos RGA e estresse oxidativo vem sendo estudada a partir da última década, mas ainda é um campo relativamente pouco explorado (Malekirad et al., 2005; Türkan et al., 2005; Baysal et al., 2009; Izdes et al., 2010; Wrońska-Nofer et al., 2012; Cerit et al., 2014).

1.9 Justificativa do estudo

Na literatura ao nosso alcance não existem, até o presente momento, dados sobre a determinação das concentrações de RGA em SO de qualquer hospital

brasileiro e seus possíveis efeitos deletérios em indivíduos expostos. Haja vista a ausência de legislação própria em nosso país, quanto à regulamentação da exposição ocupacional aos anestésicos inalatórios, é relevante que se avaliem os possíveis riscos a que estão sujeitos os profissionais expostos, para conscientização e futura implantação de normas de segurança que sejam adequadas.

Diante dos mais variados riscos supracitados de exposição ocupacional aos RGA, depara-se com a preocupante escassez de estudos brasileiros envolvendo o tema (Chinelato e Froes, 2002; Araujo et al., 2013), especialmente em jovens profissionais em início de carreira (Costa Paes et al., 2014; Chaoul et al., 2015).

Ressalte-se que vários estudos na literatura têm mostrado que a exposição ocupacional prolongada/crônica aos RGA pode induzir danos no genoma e levar ao estresse oxidativo. No entanto, são desconhecidos os possíveis efeitos no genoma e no estado *redox* em profissionais recém-expostos aos RGA. Dessa forma, é relevante avaliar o impacto dessa exposição em jovens profissionais que atuam em centro cirúrgico.

2 OBJETIVO

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi determinar as concentrações de RGA em SO e avaliar o impacto dessa exposição ocupacional em relação aos danos genômicos e estresse oxidativo em profissionais recém-expostos.

3 MÉTODO

3.1 Ética e Registro

O estudo foi conduzido no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2016 no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMB-UNESP (protocolo número 4440-2012; Anexo A) e registro do estudo no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (RBR-78m24n; Anexo B). O estudo seguiu as recomendações do *STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology (STROBE) Statement* (von Elm et al., 2007).

3.2 Casuística

O estudo envolveu a participação de 63 médicos residentes, no final de três anos de residência médica, de ambos os sexos, os quais atuavam no HC, FMB-UNESP e foram alocados em dois grupos de acordo com a exposição ocupacional ou não aos RGA. O grupo controle constituiu-se de 31 residentes sem exposição ocupacional (Clínica Médica) enquanto o grupo exposto compôs-se de 32 residentes das especialidades de Anestesiologia e Cirurgia (Otorrinolaringologia, Oftalmologia, Neurocirurgia e Cirurgia Pediátrica) ocupacionalmente expostos aos RGA (isoflurano, sevoflurano e N_2O), com exposição mínima de 20 h/semana.

Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice A) e responderam a um questionário detalhado (Apêndice B) com dados demográficos, histórico médico e estilo de vida. Os médicos residentes do grupo controle foram pareados por idade, sexo e índice de massa corporal (IMC) com os do grupo exposto.

Foram excluídos do estudo os portadores de neoplasia e de doenças infecciosas e/ou inflamatórias, os obesos, as gestantes e os usuários de tabaco, “drogas ilícitas”, medicamentos e/ou suplementação vitamínica e os que faziam uso abusivo de álcool (National Institutes of Health, 2016).

3.3 Mensuração das concentrações de RGA nas SO

O HC (FMB – UNESP) dispõe de 13 SO de tamanhos variados (23,5 m^2 - 40,2 m^2). Dessas, sete possuem um aparelho de ar-condicionado em cada sala (ou seja, não há sistema de exaustão de gases) e seis possuem ar condicionado central com sistema de exaustão de gases. Nestas últimas, a circulação de ar é feita somente com 25% de ar novo (ambiente externo), perfazendo 6 a 8 trocas de ar/h.

As concentrações dos anestésicos halogenados (isoflurano e sevoflurano) e N_2O foram sempre aferidas no ar, próximo à área de respiração do grupo exposto nas SO, por meio de espectrofotometria infravermelha, utilizando-se o aparelho *InfraRan 4-gas anesthetic specific vapor analyzer* (*Wilks Enterprise, East Norwalk*, EUA). O equipamento foi calibrado antes de cada mensuração de anestésico inalatório, conforme instruções do fabricante. As concentrações de N_2O e de halogenados foram medidas com aspiração de fluxo de ar de 10 l/min, no equipamento, durante cirurgias realizadas em pacientes de todas as faixas etárias sob anestesia geral inalatória.

Após tabulação dos dados, foram realizados cálculos para se obterem médias e valores mínimo e máximo para cada concentração residual, de acordo com o tipo de SO (com ou sem exaustão), além da média de todas as salas. Para o N_2O calculou-se o *TWA* (durante administração anestésica) conforme fórmula específica (Schiewe-Langgartner et al., 2005) mostrada abaixo (figura 9):

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

Figura 9 - Fórmula do *time-weighted average* (*TWA)*, sendo c: concentração; t: tempo; n: número de amostras; $*$: multiplicação. Fonte: Schiewe-Langgartner et al., 2005

3.4 Coleta de amostras biológicas

Para se evitar possível viés, todas as amostras foram coletadas, concomitantemente, de ambos os grupos antes do período de férias. Procedeu-se à coleta tanto de amostras de sangue periférico quanto de amostras de células bucais de todos os participantes da pesquisa.

O sangue venoso (15 ml) foi coletado em tubos contendo anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), os quais foram revestidos com papel alumínio. Uma parte do sangue foi destinada para o isolamento de linfócitos e o restante do material foi centrifugado a 4°C, por 10 min, a 1.500 rpm, para obtenção de plasma.

Os linfócitos foram isolados utilizando-se o método de gradiente *Ficoll-Paque*®, conforme protocolo anteriormente descrito (Braz e Fávero Salvadori, 2007), como segue: amostras de sangue total (2 ml) foram homogeneizadas em 2 ml de tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline - 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 4ºC), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspenso. 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 gradualmente até serem armazenados em -80ºC para avaliação posterior de danos basais e oxidativos no DNA, pelo teste do cometa. Alíquotas de plasma foram armazenadas em criotubos a -80ºC para posterior avaliação de marcadores de estresse oxidativo.

Para a coleta de células bucais, todos os indivíduos foram orientados a realizar previamente uma antissepsia com água para eliminar resíduos. As células exfoliadas do epitélio bucal foram obtidas por meio de raspagem da mucosa jugal bilateralmente, por três vezes, com o auxílio de uma espátula de madeira, a qual foi acondicionada em tubo de 15 ml contendo solução salina gelada (*PBS*) para transporte até o laboratório, onde o material foi imediatamente processado.

Todas as amostras foram codificadas e analisadas em teste encoberto, sendo processadas sob luz amarela, para se evitar tanto a indução de estresse oxidativo quanto de danos adicionais ao material genético. Ressalte-se que todo o procedimento das amostras, assim como as metodologias relacionadas aos danos no material genético foram realizados no Laboratório GENOTOX (UNIPEX, FMB-UNESP). As metodologias de estresse oxidativo foram realizadas no *Antioxidants Research Laboratory*, na *Jean Mayer Human Nutrition Research Center on Aging*, na *Tufts University* em Boston (EUA).

Todas as amostras foram realizadas ou em duplicata ou em triplicata e em todas as metodologias sempre se utilizaram amostras de ambos os grupos.

3.5 Avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade

3.5.1 Danos basais no DNA (teste do cometa)

O descongelamento dos linfócitos foi realizado de modo gradual (do *freezer* -80ºC para o -20ºC, seguido de geladeira a 4ºC e depois banho-maria a 37ºC) para melhor preservação celular. Os linfócitos foram transferidos para um tubo de 15 ml com 1 ml de *RPMI*, homogeneizados por inversão e, enfim, centrifugados (2.000 rpm por 4 min, a 4ºC). O sobrenadante (1 ml) foi desprezado e acrescido em 1 ml de *RPMI*, seguido de homogeneização e centrifugação. Por último, 1,5 ml do sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso e utilizado para o teste do cometa, pelo qual se avaliaram danos basais no DNA, conforme prévia descrição (Singh et al., 1988; Tice et al., 1991).

Alíquotas de 10 μl de linfócitos foram misturadas vagarosamente com 120 μl de agarose em baixo ponto de fusão (0,5%) e mantidas em banho-maria a 37ºC. Essa mistura foi pipetada sobre as lâminas previamente cobertas com uma camada de agarose em ponto de fusão normal (1,5%), as quais foram cobertas por lamínula e colocadas a 4ºC, por 5 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 gelada (recém-preparada com EDTA 1 mM, NaOH 300 mM; pH > 13) por 20 min, a 4ºC. Após o tempo de desespiralização do DNA, a corrida eletroforética foi conduzida a 25 V e 0,3 A, por 20 min, a 4ºC. Após a eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (Tris 0,4 M; pH 7,5) por 15 min, sendo então mergulhadas em álcool absoluto (etanol) para fixação. Após a secagem, as lâminas foram armazenadas em laminários a 4ºC até serem analisadas.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com 80 μl de *SYBR Gold*, cobertas com lamínula e 100 nucleoides (50 nucleoides/lâmina) foram analisados em

microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instruments*, Reino Unido), em aumento de 400x. Os parâmetros de análise de dados no DNA foram o *tail moment - TM* (u.a.) e o *tail intensity - TI* (%). Como os resultados de ambos os parâmetros foram semelhantes, optou-se por mostrar somente o *TM*.

3.5.2 Teste do MN bucal

Os tubos contendo solução salina e células da mucosa bucal foram centrifugados (1.000 rpm, por 5 min, a 4ºC), o sobrenadante foi retirado e adicionou-se solução fixadora (5 ml de metanol/ácido acético na proporção 3:1), sendo os tubos novamente centrifugados (1.000 rpm por 5 min a 4ºC). Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, as amostras foram gotejadas a uma distância de 15 cm em lâminas previamente limpas, com secagem por 24 h segundo protocolo previamente descrito (Thomas et al., 2009), com pequenas modificações.

Depois de secas, as lâminas foram transferidas para cubeta com ácido clorídrico (HCl - 5 M) a 37ºC por 20 min para induzir a reação de hidrólise, o que favorece a coloração do núcleo pelo *Feulgen* (reativo de *Schiff*). As lâminas foram então lavadas três vezes com água destilada e posteriormente transferidas para outra cubeta com o reativo de *Schiff*. As lâminas permaneceram na cubeta contendo *Feulgen* por 90 min. Nesse intervalo (a cada 30 min), a cubeta era agitada, em movimentos circulares por 1 a 2 min. Decorrido esse tempo, retirou-se o corante *Feulgen* e nessa mesma cubeta adicionou-se água destilada, na qual as lâminas permaneceram por 10 min. Em seguida, a água destilada foi descartada e as lâminas ficaram secando, por pelo menos 12 h. Após, realizou-se a contra-coloração (diferencia o núcleo do citoplasma) com *Fast Green* gelado e as lâminas foram colocadas em bandeja para secagem até serem posteriormente analisadas.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio *Olympus BX43* (Japão) com ampliação de 400x. Para se avaliar o MN (pequena massa nuclear, com tamanho 1/3 do núcleo principal e sem ligação entre MN e núcleo), foram analisadas 2.000 células diferenciadas por indivíduo, conforme critérios de identificação e quantificação previamente recomendados (Tolbert et al., 1992; Thomas et al., 2009).

3.6 Avaliação de estresse oxidativo

Utilizou-se um *pool* de amostra controle plasmática (*QC*) para controle de qualidade, a partir do qual se calculou o coeficiente de variação (CV) intraensaio e interensaio. Admitiram-se valores de CV ≤ 5%. Para as curvas-padrão, admitiram-se valores de R^2 ≥ 0,993.

3.6.1 Avaliação de danos oxidativos no DNA

3.6.1.1 Teste do cometa com utilização de enzimas

Na análise de danos oxidativos no DNA foram utilizadas as enzimas endo III e FPG, para avaliação de pirimidinas e purinas oxidadas respectivamente, seguindo protocolos previamente descritos (Collins et al., 1996; Braz et al., 2012).

Dez μl de linfócitos foram adicionados a 120 μl de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5%, a 37°C. A seguir, essa mistura foi colocada sobre lâminas pré-revestidas com agarose a 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e acondicionadas a 4°C, durante 5 min, para permitir a solidificação da agarose. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada recém-preparada por, pelo menos, 2 h. Após a etapa de lise, as lâminas foram lavadas em *PBS* e colocadas em tampão *Flare 1x* (Hepes 40 mM, KCl 0,1M, albumina de soro bovino 0,2 mg/ml e EDTA 0,5 mM; pH 8), durante 5 min (3 vezes). Posteriormente, 50 μl de endo III e 50 μl de FPG foram adicionadas às lâminas, as quais foram cobertas com lamínulas e incubadas por 30 min, a 37°C, em câmara úmida. Na sequência, as lâminas foram colocadas a 4°C, por 15 min, para solidificação da agarose, as lamínulas foram cuidadosamente removidas sendo as lâminas transferidas para cuba de eletroforese, a qual foi preenchida com tampão alcalino gelado e recém-preparado por 40 min, tendo sido a eletroforese conduzida por 30 min, a 25 V e 300 mA. Antes da fixação com etanol, as lâminas foram neutralizadas durante 15 min e depois armazenadas a 4°C até o momento da análise.

Imediatamente após a coloração com *SYBR Gold*, as lâminas foram cobertas com lamínula e 100 nucleoides (50 nucleoides/lâmina) por tipo de dano oxidativo foram então analisados em microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instruments*, Reino Unido) com

aumento de 400x. Os parâmetros de análise de dados oxidativos no DNA foram o *tail moment* - *TM* (u.a.) e o *tail intensity* - *TI* (%). Como os resultados de ambos os parâmetros foram semelhantes, optou-se por mostrar somente o *TM*.

3.6.1.2 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG)

Para a mensuração de 8-OH-dG no plasma, utilizou-se cromatografia líquida de alta performance (*HPLC*) acoplada à espectrometria de massa (*LC-MS/MS*), conforme protocolo adaptado (Hu et al., 2004). Amostras de plasma previamente estocadas a -80°C foram descongeladas e transferidas para tubos de vidro para centrifugação, seguida pela adição de 40 μl de $^{15}N_7$-8-hidroxi-dG a 1 ng/ml. Após serem cuidadosamente homogeneizadas em *vortex*, a mistura resultante foi diluída com 4 ml de ácido fórmico a 20 mM. A seguir, a solução foi submetida à extração de fase sólida usando um cartucho *Oasis HLB*, o qual foi ativado com 4 ml de metanol e 4 ml de ácido fórmico. Após adicionar-se o restante da mistura, os cartuchos foram lavados com 8 ml de ácido fórmico. Eluiu-se a 8-OH-dG com 6 ml de metanol a 100%. O eluente foi seco em nitrogênio líquido e reconstituído com 50 μl de solução tampão (acetonitrila a 5% e ácido fórmico aquoso a 1%) e, em seguida, agitado, sonicado e filtrado. Após, injetaram-se 20 μl do eluente no aparelho de *LC-MS/MS AB SCIEX™ API 5500* (EUA), operando em modo íon positivo. A instrumentação de *LC-MS/MS* incluiu: *Agilent UHPLC* (EUA) em conjunto com *turbospray AB SCIEX™ API 5500 MS* (EUA) e *Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2,1 x 50 mm 1,8 micron* (EUA). A fase móvel A (MPA) utilizada foi na base de ácido fórmico a 0,1% em H_2O-Milli-Q, enquanto a fase móvel B (MPB) se constituiu de ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila. A 8-OH-dG foi eluída em modo isocrático (em que a composição da fase móvel é mantida constante durante toda a eluição), utilizando-se MPA a 95% e MPB a 5% durante 3 min, com a coluna de *HPLC* à temperatura de 35°C e razão de fluxo de 0,35 ml/min. Os resultados de 8-OH-dG foram expressos em pg/ml.

3.6.2 Peroxidação lipídica e oxidação proteica

Como marcadores de peroxidação lipídica plasmática foram analisados o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e o malonaldeído (MDA). A oxidação proteica foi avaliada

pela concentração plasmática de proteínas carboniladas.

3.6.2.1 4-Hidroxinonenal (4-HNE)

O 4-HNE foi avaliado utilizando-se o ensaio imunoenzimático (*ELISA*), com *kit* comercialmente disponível, seguindo-se as instruções do fabricante (*OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA Kit, Cell Biolabs Inc.*, EUA). Os resultados de 4-HNE foram expressos em μg/ml.

3.6.2.2 Malonaldeído (MDA)

A detecção de MDA foi realizada por *HPLC* e conduzida, segundo protocolo previamente descrito (Nielsen et al., 1997), com algumas modificações. Resumidamente, alíquotas de 100 μl de plasma e de *QC* foram adicionadas a 700 μl de ácido ortofosfórico (1%) em tubo de vidro, sendo as amostras agitadas por 10 seg. A seguir, as amostras foram misturadas com 200 μl de ácido tiobarbitúrico (TBA, 42 mM) e novamente agitadas. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100°C por 60 min. Após 10 min de resfriamento em gelo, as amostras foram agitadas e 200 μl foram transferidos para outro tubo contendo 200 μl de solução NaOH:metanol (1:12 vol.) a 2 M. As amostras foram então agitadas por 10 seg e centrifugadas. O sobrenadante (300 μl) foi transferido para outro tubo de vidro e 50 μl foi injetado no sistema de *HPLC*. A fase móvel constituiu-se de tampão fosfato (KH_2PO_4) e metanol (60:40 vol.), com fluxo de 0,5 ml/min, utilizando-se coluna do tipo C18 em fase reversa (5 μm, 150 x 4,6 mm) e detector ultravioleta a 532 nm. A peroxidação lipídica foi monitorada com curva-padrão, utilizando-se o tetraetoxipropano (TEP) a 97%. Os resultados de MDA foram expressos em μmol/l.

3.6.2.3 Proteínas carboniladas

O aparecimento de grupos carbonilas (como grupos aldeídos e cetonas) em proteínas decorre de várias reações oxidativas, quando proteínas carboniladas tendem a ser mais hidrofóbicas e resistentes à proteólise. As amostras plasmáticas foram analisadas quanto às proteínas carboniladas por ensaio imunoenzimático (*ELISA*), com *kit* comercialmente disponível, seguindo-se o manual de instruções do fabricante (*OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit*, *Cell Biolabs Inc,* EUA). A determinação da quantidade total de proteínas nas amostras necessárias ao

prosseguimento do método foi realizada com o *kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific,* EUA*).* Os resultados de proteínas carboniladas foram expressos em nmol/mg.

3.6.3 Testes de capacidade de defesa antioxidante

3.6.3.1 *Ferric Reducing Antioxidant Power* (*FRAP*)

Para a realização do *FRAP*, utilizou-se protocolo original previamente descrito (Benzie e Strain, 1996) com pequenas alterações (McKay et al., 2010). O método mede a capacidade do plasma em reduzir o ferro. Em baixo pH, o complexo Fe^{3+}-tripiridiltriazina (TPTZ) é reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}) pela presença de agentes redutores (antioxidantes) no plasma, gerando uma coloração lilás (Benzie e Strain, 1996).

Para o preparo da curva padrão, utilizou-se uma solução padrão de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico ou *trolox* (análogo hidrossolúvel da vitamina E) diluída em metanol. A curva padrão foi preparada diariamente com concentrações de 1.000 μM, 500 μM, 250 μM, 125 μM, 62,5 μM e 31,25 μM. Diluíram-se 50 μl de amostra de plasma em H_2O destilada (1:4). Adicionaram-se, em temperatura ambiente, 30 μl de cada amostra, da curva padrão e de um *blank* (somente H_2O destilada) em cubetas não sensíveis a raios ultravioleta (UV). A cada cubeta adicionaram-se 90 μl de H_2O destilada e, a seguir, 900 μl de solução coquetel (tampão de acetato a 300 mM, em pH de 3,6; TPTZ a 10 mM com HCl a 40 mM; e $FeCl_3.6H_2O$ a 20 mM, numa proporção de 10:1:1) e incubou-se por 60 min em temperatura ambiente. Procedeu-se, então, à leitura das cubetas em aparelho de espectrofotometria (Modelo Shimadzu UV-1601, Japão), com base em absorvância (ABS) padrão de 593 nm.

O valor do *FRAP* (μmol/l) foi calculado com base na equação (y = ax + b) da curva padrão linear de *trolox*, onde y = ABS média das duplicatas e x = valor do *FRAP* e “a” e “b” são pontos predeterminados da curva padrão.

3.6.3.2 *Aqueous Oxygen Radical Absorbent Capacity Assay* (*ORAC*)

O teste *Aqueous Oxygen Radical Absorbent Capacity Assay* (*ORAC*) se baseia no método original (Cao e Prior, 1999) com poucas modificações (Huang et al., 2002). O princípio do teste *ORAC* consiste na formação do radical peroxil pela reação entre o indutor de radicais hidrofílico dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) – *AAPH* com o oxigênio atmosférico, levando ao declínio da fluorescência de um *probe* de fluoresceína (Prior et al., 2005). A inibição de ERO por antioxidantes plasmáticos, refletida pela proteção contra a perda de fluorescência de fluoresceína no teste *ORAC,* é uma medida da capacidade antioxidante do plasma (Cao e Prior, 1999).

Para o preparo da curva padrão, utilizou-se a solução padrão de *trolox* diluído com tampão *O-buffer* tratado com ácido perclórico (*PCA O-buffer*) com concentrações de 100 μM, 50 μM, 40 μM, 30 μM, 20 μM, 10 μM e 5 μM. Amostras de plasma foram desproteinizadas com *PCA* a 0,5 M, centrifugadas (13.000 rpm, 15 min) e o sobrenadante foi separado em alíquotas de 75 μl. As amostras de plasma-*PCA* foram diluídas em solução *O-buffer* (1:20). Preparou-se a microplaca preta de 96 alvéolos (*Greiner, Áustria*). A seguir, acrescentaram-se a cada alvéolo 100 μl de solução de fluoresceína (200 nM). Adicionaram-se 0,575 g de *AAPH* em um tubo *falcon*, o qual foi mantido em recipiente com gelo. A seguir, acrescentaram-se 6,65 ml de *O-Buffer* pré-incubado a 37°C ao *AAPH* (0,32 M), sendo essa solução inserida na leitora *Optima FLUOstar* (Alemanha) e injetada automaticamente nos alvéolos. Os parâmetros de leitura foram 485 nm_{ex} e 520 nm_{em}. Os resultados foram expressos em μmol/l baseado nos valores de fluorescência das amostras de plasma-*PCA,* em relação à curva padrão de *trolox*.

3.6.3.3 *Total Antioxidant Performance* (*TAP*)

O *TAP* foi conduzido de acordo com metodologia previamente descrita (Aldini et al., 2001) e validada (Beretta et al., 2006). O método se baseia na oxidação de um análogo lipofílico (*probe*) - o ácido *BODIPY* [ác.4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ndecanoico] por um indutor de radical lipoperoxil (LOO*) de compartimento lipofílico - o *MeO-AMVN* [2,2'-azobis(4-methoxi-2,4-dimetil-valero-nitrilo)]. O *BODIPY*, quando submetido à oxidação, gera um produto

de fluorescência verde, o qual é detectado por um contador de emissão de luz fluorescente (Beretta et al., 2006).

Alíquotas de 100 μl de plasma e de 100 μl do controle fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine - PC*) foram adicionadas a 300 μl de *PBS* em tubo de vidro. Em seguida, 100 μl de *BODIPY* foram adicionados em cada tubo, seguidos por agitação. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C, por 10 min. Posteriormente, adicionou-se *PBS* (485 μl) em cada tubo de amostra e, em seguida, foram adicionados, vagarosamente, 15 μl do iniciador de radicais *MeO-AMVN* em cada tubo, com seringa de vidro de 1 ml, sob homogeneização contínua em agitador magnético. Duzentos μl de cada amostra, em triplicata, foram pipetados, assim como o controle *PC*, em placa negra de 96 alvéolos. A placa foi, então, colocada no aparelho *Wallac Victor 2* (*PerkinElmer*, EUA) a 37°C por 3 h (36 ciclos de 5 min) e a oxidação da amostra foi monitorada por meio de produto de oxidação de fluorescência verde do *BODIPY*, com comprimento de onda de excitação de 500 nm e de emissão de 520 nm. Para a análise dos resultados, utilizou-se o *software Wallac WorkOut version 2.0*, sendo expressos em porcentagem de inibição da oxidação de *BODIPY* pelo plasma humano em relação à porcentagem de oxidação do *BODIPY* dos controles de lipossomos de *PC*, medidos em integral pelo valor da área abaixo da curva de cinética, e expressos numericamente pelo cálculo: [(média do *PC* - média da amostra) / média do *PC*] x 100. Assim, a performance antioxidante é quantificada em porcentagem e varia de zero (sem proteção antioxidante) a 100% (proteção total).

3.7 Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral baseou-se em valores do teste do MN bucal obtidos na literatura (Chandrasekhar et al., 2006), pela comparação de indivíduos expostos e não expostos aos RGA. A diferença esperada entre os grupos para a frequência de MN em células bucais foi de 0,55 (desvio-padrão de 0,56), com 5% de significância e poder do teste de 95%, determinando-se 27 indivíduos por grupo. Os dados foram tabulados em *software Excel 2011* e analisados estatisticamente com o *software SAS*, Versão 9.3.

Para a variável qualitativa (diferença de sexo entre os grupos) foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para as variáveis quantitativas com distribuição normal (resultados expressos em média ± desvio-padrão), utilizou-se o teste *t de Student.* O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foi aplicado para variáveis sem distribuição normal (resultados expressos em mediana [1° quartil; 3° quartil]). Para avaliação de MN em células bucais, utilizou-se o modelo de regressão linear de *Poisson*. Níveis de significância menores que 5% foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

A tabela 1 mostra os dados das concentrações dos RGA mensuradas nas SO. Observa-se que os valores de todos os anestésicos são superiores em SO sem sistema de exaustão de gases em relação às SO com sistema de exaustão. Todos os anestésicos contribuíram para a poluição ambiental (N_2O > sevoflurano > isoflurano). O valor médio da concentração do N_2O foi 7,2 vezes superior à recomendação do *NIOSH*.

Tabela 1 - Concentrações (ppm) dos resíduos de gases halogenados e de óxido nitroso (N_2O) em salas de operação (SO) do centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (médias e valores mínimos e máximos)

Anestésico	Tipos de sistema de exaustão em SO		Média geral
	Ausente	Presente	
Isoflurano	9,2 (3,0 - 17,8)	1,3 (0,3 - 3,2)	**5,3**
Sevoflurano	16,4 (5,3 - 34,1)	2,9 (1,0 - 7,2)	**9,7**
N_2O	235 (120 - 350)	66 (61 - 70)	**180***

* *time-weighted average* conforme tempo da administração

A tabela 2 mostra os dados demográficos, sem diferença significativa entre os grupos (p > 0,05). A carga horária média dos médicos residentes do grupo exposto foi de 40 h/semanais.

Tabela 2 - Dados demográficos (média ± desvio padrão ou número absoluto)

Características	Grupo controle (n = 31)	Grupo exposto (n = 32)
Idade (anos)	27,4 ± 1,6	28,7 ± 1,9
Sexo (masculino/feminino)	19 / 12	20 / 12
Índice de massa corpórea (kg/m²)	24,5 ± 3,9	24,6 ± 3,8

p > 0,05

Em relação aos danos basais no DNA, avaliados pelo teste do cometa, verificou-se aumento significativo de danos no grupo exposto (figura 10).

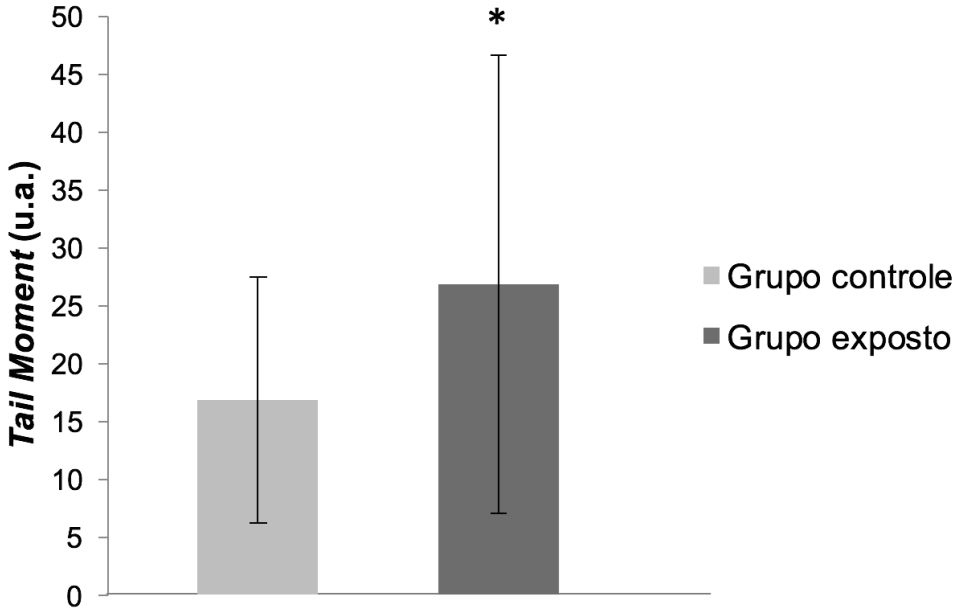


Figura 10 - Danos basais no DNA avaliados pelo teste do cometa em linfócitos periféricos dos grupos controle e exposto. *p = 0,01.

Evidenciou-se aumento da frequência de MN bucal no grupo exposto (média ± desvio padrão = 0,7 ± 0,97) em relação ao grupo controle (média ± desvio padrão = 0,3 ± 0,7), porém sem diferença estatística entre os grupos (p = 0,07; figura 11).

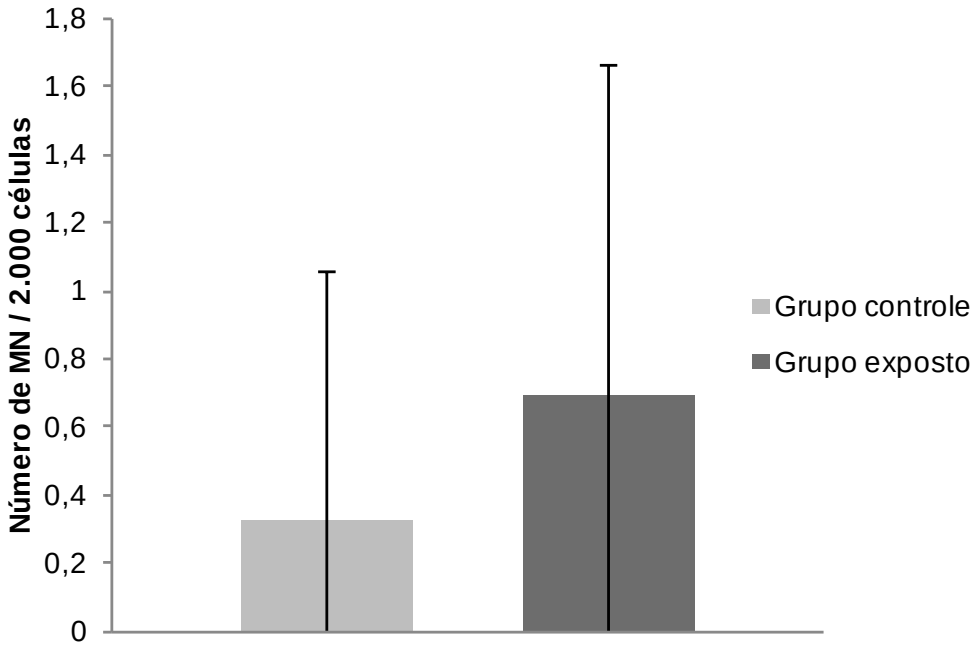


Figura 11 - Frequência de micronúcleos em 2.000 células bucais analisadas nos grupos controle e exposto. MN = micronúcleo. p = 0,07.

Ao se avaliarem os marcadores de estresse oxidativo (tabela 3), não se verificou diferença entre os grupos controle e exposto aos RGA em relação às proteínas (carboniladas), lipídios (MDA e 4-HNE) e DNA (purinas e pirimidinas oxidadas e 8-OH-dG). Também não se observou diferença estatisticamente significante, quando os grupos foram avaliados em relação à capacidade antioxidante plasmática (testes *FRAP*, *ORAC* e *TAP*) (tabela 4).

Tabela 3 - Parâmetros de marcadores de estresse oxidativo (X ± DP ou mediana e quartis) em proteínas, lipídios e DNA

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Exposto	Valor de p
Proteínas carboniladas (nmol/mg)	4,4 ± 1,8	4,5 ± 1,7	0,9
MDA (μmol/l)	0,60 ± 0,21	0,61 ± 0,24	0,8
4-HNE (μg/ml)	8,7 [5,0;12,5]	9,3 [4,4;14,1]	0,7
Purinas oxidadas (u.a.)	35,5 ± 34,0	34,3 ± 34,5	0,9
Pirimidinas oxidadas (u.a.)	33,8 ± 26,2	44,8 ± 37,9	0,2
8-OH-dG (pg/ml)	0,43 ± 0,31	0,48 ± 0,52	0,7

MDA: malonaldeído, 4-HNE: hidroxinonenal, 8-OH-dG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Tabela 4 - Parâmetros de avaliação de capacidade antioxidante no plasma (mediana e quartis ou X ± DP)

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Exposto	Valor de p
***FRAP* (μmol/l)**	381,7 [304,7;500,6]	442,0 [335,0;691,7]	0,2
***ORAC* (μmol/l)**	1567,8 ± 388,6	1611,2 ± 396,4	0,7
***TAP* (%)**	77,5 ± 6,2	79,9 ± 7,8	0,4

FRAP: *Ferric Reducing Ability of Plasma*, *ORAC*: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, *TAP*: *Total Antioxidant Performance*

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou aumento de danos genéticos, mas sem alteração do estado *redox*, em profissionais expostos às concentrações residuais de isoflurano, sevoflurano e N_2O em centro cirúrgico com inadequado sistema de exaustão de gases, no final de três anos de residência médica.

Os médicos residentes representam uma especialização cuja saúde ocupacional e bem-estar físico e pessoal constituem temas pertinentes estudados mundialmente em centros universitários de ensino com treinamento médico (Lue et al., 2010; Eisenach et al., 2014; Kassam et al., 2015). Entretanto, informações acerca dos possíveis efeitos deletérios referentes à exposição ocupacional aos RGA em médicos residentes são limitadas. Nesse contexto, a escassez de evidências nesses profissionais e os potenciais riscos acarretados pelos RGA justificam a preocupação com o assunto nessa população, a qual está exposta diariamente aos diversos anestésicos inalatórios.

A análise das concentrações de RGA nas SO com as mensurações de N_2O, isoflurano e sevoflurano revelou que todas as mensurações, tomadas para uma média de 2 l/min de FGF durante anestesia geral inalatória, estiveram acima do limite recomendado de exposição preconizado pelo *NIOSH* (NIOSH, 1977). Esses limites foram fixados em 2 ppm (*ceiling*) para os anestésicos halogenados, e 25 ppm para N_2O (em *TWA*) durante procedimento anestésico. Diante da ausência de regulamentação formal e de medidas seguras de exposição aos RGA no Brasil e em muitos países em desenvolvimento (Oliveira, 2009), optou-se por usar os limites de exposição recomendados pelo *NIOSH* como referência, mesmo ciente de que tais valores não foram validados para os halogenados mais modernos, incluindo isoflurano e sevoflurano (Occupational Safety & Health Administration, 2000). As concentrações médias dos RGA detectados em ambos os tipos de SO mostraram valores acima dos limites máximos recomendados, sendo mais elevadas nas SO sem sistema de exaustão de gases. É interessante observar que os valores médios de sevoflurano foram 1,8 vezes superiores aos do isoflurano. Esse fato pode ser decorrente da CAM mais elevada do sevoflurano (Torri, 2010) e do frequente uso desse agente para anestesia pediátrica sob indução inalatória.

É importante salientar que o sistema de exaustão de ar das SO de que se dispõe é do tipo parcial, com recirculação de 75% de ar da própria sala (poluído/contaminado) e somente 25% de ar novo (ambiente externo) e com sistema de fluxo turbulento (e não laminar), sendo que a grande desvantagem é que, quando a troca de ar é pequena, a recuperação do ambiente contaminado é lenta, dificultando a dispersão e descontaminação do ar (Lewis, 1993; Dascalaki et al., 2008). Enquanto esse sistema de exaustão está presente em aproximadamente metade das SO, em regime de 6 a 8 trocas de ar/h, o restante das SO, parte de uma ala mais antiga do centro cirúrgico de nosso hospital, ainda funciona sem qualquer sistema de exaustão de gases. Essas SO refletem a realidade de muitos hospitais no Brasil e em outros países em desenvolvimento.

É necessário pontuar, todavia, que até mesmo as SO com sistema de exaustão não se enquadram dentro das normas internacionais preconizadas pelo Instituto Americano de Arquitetos (1993), que recomenda no mínimo 15 trocas de ar/h, a fim de assegurar que o ar circulante nas SO seja completamente preenchido por ar novo. Adicionalmente, o ideal é que se utilize sistema com fluxo de ar unidirecional ou laminar (e não do tipo turbulento), o qual permite que toda a contaminação gerada no ambiente seja levada para fora dele o mais rápido possível (Turpin e Huntzicker, 1995). O fluxo laminar é definido como um padrão de fluxo de ar que se movimenta em sentido unidirecional em velocidade constante, sendo insuflado diretamente sobre o paciente. Os dados do presente estudo mostram que a simples existência de equipamentos de exaustão no centro cirúrgico não é suficiente para suprimir a poluição causada pelos RGA. Assim, é necessário padrão de qualidade acompanhado de inspeções de rotina e mensuração regular das concentrações de RGA nas SO para averiguar o seu adequado funcionamento (Barker e Abdelatti, 1997; Kanmura et al., 1999).

Os valores de RGA acima do limite internacional preconizado (NIOSH, 1977) encontrados no presente estudo provavelmente contribuíram para as alterações encontradas em relação aos danos basais no DNA nos médicos residentes expostos. Dando suporte a essa hipótese, um estudo comparando SO com concentrações abaixo dos limites recomendados de RGA (com sistema de exaustão de gases) na Alemanha, com outras SO com altas concentrações de RGA (sem sistema de exaustão) em um país do leste europeu, constatou aumento significativo de MN em linfócitos somente nos profissionais expostos aos RGA nas SO de

hospital do leste europeu (Wiesner et al., 2001b). Adicionalmente, um outro estudo mostrou correlação positiva somente entre danos no material genético (teste do cometa) e concentrações elevadas de N_2O (acima do limite recomendado) medido em SO de hospital polonês, mas não com isoflurano e sevoflurano, pois suas concentrações estavam abaixo do limite recomendado (Wrońska-Nofer et al., 2009). Esses dados ressaltam a importância do presente estudo em avaliar a poluição/contaminação anestésica nas SO. É primordial garantir a segurança e saúde ocupacional dos profissionais expostos por meio de regulamentações claras com limites máximos de exposição, além de assegurar a manutenção e monitorização da qualidade do ar constantemente, para que eventuais vazamentos e mau funcionamento nos circuitos de anestesia sejam identificados e corrigidos.

Ressalta-se que os efeitos da exposição ocupacional aos RGA no material genético em médicos residentes somente foram abordados por um único estudo (Costa Paes et al., 2014), o qual observou aumento significativo de lesões primárias no DNA nesses profissionais aos oito, 16 e 22 meses expostos ao isoflurano, sevoflurano e N_2O (mas sem medição de suas concentrações) em relação a um grupo controle, em SO sem sistema de exaustão de gases. Assim, esses dados corroboram nossos achados em relação aos danos detectados por quebras de fitas simples e duplas e de sítios álcali-lábeis no DNA ao final de 36 meses nos residentes avaliados, que trabalham em SO com sistema de exaustão de gases ainda não adequado.

O teste do cometa é, de fato, um método confiável e amplamente utilizado como biomarcador de genotoxicidade para biomonitoramento humano (Dusinska e Collins, 2008). Por se tratar de metodologia de *screening* para avaliação de danos no DNA, esse teste possibilita a identificação precoce dos possíveis riscos à saúde de populações expostas a agentes tóxicos (Gunasekarana et al., 2015). Assim, os achados do presente estudo ressaltam o teste do cometa como valiosa ferramenta de genotoxicidade para detecção precoce das alterações genéticas em profissionais expostos aos RGA. Dessa maneira, sugere-se que esse método seja mais difundido e utilizado para monitorar esse tipo de exposição, especialmente nos profissionais em início de carreira. Tais lesões primárias no DNA são passíveis de reparo ou, caso contrário, podem levar à instabilidade genômica (Gunasekarana et al., 2015).

A demonstração de efeitos citotóxicos e/ou mutagênicos associados à exposição ocupacional crônica aos RGA tem sido abordada na literatura. Em

pesquisa realizada no Brasil, profissionais expostos, em média, há 13 anos à mistura de RGA, incluindo halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano e N_2O, tiveram aumento significativo na frequência de MN em linfócitos em relação ao grupo controle (Araujo et al., 2013). De forma semelhante, profissionais do sexo feminino expostas a halotano, isoflurano e N_2O, comparadas a tecnólogas em Radiologia, tiveram aumento significativo de danos citogenéticos (AC, TCI e MN em linfócitos) na Eslovênia (Bilban et al., 2005). Pesquisa realizada na Croácia (Rozgaj et al., 2009) demonstrou aumento significativo de MN em linfócitos de profissionais expostos aos RGA, em SO com sistema de exaustão de gases, porém sem conhecimento de suas concentrações.

O presente estudo avaliou, pela primeira vez, a frequência de MN em células bucais de médicos residentes. O teste de MN bucal constitui-se em metodologia minimamente invasiva que monitora eventos mutagênicos por meio da detecção de danos no DNA e instabilidade cromossômica (Thomas et al., 2009). Considerando que a orofaringe é umas das primeiras vias de contato na inalação dos RGA, esse teste é ferramenta capaz de detectar possível mutagenicidade causada pelos RGA. Ressalte-se, ainda, que 92% das neoplasias malignas são de origem epitelial, o que torna o teste do MN bucal um marcador de evento precoce de instabilidade genômica como resultado de potenciais carcinógenos que adentram o organismo por meio da inalação (Kashyap e Reddy, 2012).

Apesar da ausência de significância estatística, os médicos residentes com exposição aos RGA tiveram média 2,3 vezes maior de frequência de MN bucais em relação aos residentes não expostos, o que sugere importante significado biológico. É interessante ressaltar que anestesiologistas que trabalham no mesmo hospital estudado com exposição crônica (média de 16 anos) aos RGA têm aumento significativo de MN bucais (e também aumento de 2,3 vezes) comparados a grupo de médicos não expostos (Souza, 2016). Assim, sugere-se que esse aumento na frequência de MN encontrada nos médicos residentes expostos pode acarretar instabilidade genômica com o decorrer do tempo. De fato, em estudo anterior, também se observou aumento significativo da frequência de MN (2,6 vezes) em células epiteliais bucais em diversos profissionais (cirurgiões, anestesiologistas, enfermeiros e técnicos) expostos, em média de 10,5 anos, a vários anestésicos, incluindo enflurano e halotano (há décadas não utilizados em nosso hospital), além de isoflurano, sevoflurano, desflurano e N_2O (Chandrasekhar et al., 2006). Esses

mesmos autores demonstraram que, quanto maior a idade e o tempo de exposição, maior foi a frequência de MN bucais nos profissionais cronicamente expostos (Chandrasekhar et al., 2006). Isso reflete a importância do biomonitoramento e da detecção de alterações iniciais devido à exposição ocupacional aos RGA, favorecendo a possibilidade de intervenções precoces, tanto no meio, pela implementação de sistemas de exaustão efetivos nas SO, como nos indivíduos, valendo-se de medidas educativas e protocolos que assegurem o uso de técnicas anestésicas seguras.

Apesar de os mecanismos de genotoxicidade e mutagenicidade dos anestésicos halogenados não serem completamente elucidados, possíveis explicações incluem o metabolismo oxidativo capaz de gerar ERO e a indução de dano direto ao genoma, em qualquer fase do ciclo celular (Chinelato e Froes, 2002). Por outro lado, prejuízo na formação de metionina sintetase e consequente redução nas concentrações de cobalamina são efeitos conhecidamente relacionados ao N_2O, levando, em última análise, à produção disfuncional de ácidos nucleicos e proteínas (Sanders et al., 2008). Fundamentando tais mecanismos, estudo que comparou enfermeiras expostas (cinco a 27 anos) ao isoflurano e sevoflurano (baixas concentrações) e N_2O (altas concentrações) a um grupo controle detectou aumento de danos oxidativos no DNA (FPG), estado pró-oxidativo (8-iso-prostaglandina F_{2a}) e redução em enzima antioxidante GPX nas profissionais expostas (Wrońska-Nofer et al., 2012).

De fato, há uma relação entre genotoxicidade e estresse oxidativo (Lee et al., 2015). O estresse oxidativo se relaciona à indução de danos em macromoléculas, incluindo ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (Halliwell, 1994), causando dano celular e apoptose (Gasparovic et al., 2013) além de uma gama de doenças (Andreoli, 2000). Apesar do crescente interesse dos estudos sobre estresse oxidativo e exposição crônica aos RGA (Malekirad et al., 2005; Türkan et al., 2005; Baysal et al., 2009; Izdes et al., 2010; Wrońska-Nofer et al., 2012; Cerit et al., 2014), evidências de alterações iniciais causadas por menor tempo de exposição aos RGA ainda são escassas. Assim, foi importante estabelecer uma minuciosa avaliação, por meio dos inúmeros métodos conduzidos, a fim de esclarecer se o estresse oxidativo poderia ser um mecanismo para os possíveis efeitos deletérios causados pelos anestésicos inalatórios em profissionais ocupacionalmente expostos.

Não se constatou diferença significativa entre os grupos avaliados em relação aos marcadores de estresse oxidativo em lipídios (MDA e 4-HNE), proteínas (proteínas carboniladas) e ácido nucleico - DNA (8-OH-dG, purinas e pirimidinas oxidadas). Divergindo desses dados, estudos mostraram que a exposição crônica aos RGA induziu tanto danos oxidativos quanto declínio nos marcadores de defesa antioxidante (Malekirad et al., 2005; Türkan et al., 2005; Baysal et al., 2009; Izdes et al., 2010; Wrońska-Nofer et al., 2012). Exemplificando, estudo conduzido no Irã em SO sem sistema de exaustão de gases mostrou, em profissionais expostos ao halotano e N_2O, aumento de peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*) e redução em grupos antioxidantes tióis, mas sem alteração no teste *FRAP* (Malekirad et al., 2005), de forma semelhante aos achados de nosso estudo em relação a este teste de capacidade antioxidante. Por outro lado, estudo realizado em profissionais turcos expostos a enflurano, halotano, isoflurano, sevoflurano e desflurano em SO com sistema de exaustão parcial, observou, no plasma, redução das enzimas antioxidantes GPX e SOD e dos microelementos cobre e selênio, porém com aumento do zinco, em relação aos controles (Türkan et al., 2005).

Tomando como base estudos que realizaram avaliação de capacidade antioxidante hidrofílica em profissionais expostos aos RGA (Malekirad et al., 2005; Baysal et al., 2009; Izdes et al., 2010), o presente estudo foi pioneiro em conduzir uma análise tanto do compartimento antioxidante plasmático hidrofílico como do lipofílico. Assim, apesar de se ter conduzido uma extensa avaliação de biomarcadores oxidativos e antioxidantes, a exposição por três anos aos RGA não levou ao quadro de estresse oxidativo, o qual não parece ser um mecanismo inicial da ação dos anestésicos inalatórios. Além disso, deve ser ressaltado que, diferentemente dos trabalhos da literatura, a população estudada foi de indivíduos jovens, saudáveis e recém-expostos, os quais, possivelmente, apresentam adequada defesa antioxidante, apta a suprir eventuais danos em consequência à exposição ocupacional. Assim, pode-se sugerir que o dano oxidativo pode ter um papel mais tardio no que se refere aos efeitos da exposição aos RGA. Estudos futuros são, portanto, necessários a fim de melhor esclarecer o assunto.

Estudos que investigaram a exposição ocupacional aos RGA e potencial genotóxico e/ou mutagênico, além de estresse oxidativo, exibem controvérsias (Bozkurt et al., 2002; Malekirad et al., 2005; Chandrasekhar et al., 2006; Wrońska-

Nofer et al., 2012; Szyfter et al., 2016). Esses dados conflitantes podem estar relacionados à heterogeneidade dos estudos: mistura variada de RGA, SO com ou sem sistema adequado de exaustão de gases, técnicas anestésicas diversas que potencializam a poluição das SO (por exemplo, uso de máscara laríngea, TOT sem balonete e indução inalatória sob máscara facial, alto FGF e sistema aberto), concentrações dos RGA nas SO, assim como de populações divergentes quanto a idade, sexo, hábitos de vida, profissão e duração de exposição aos RGA. Tais fatores, nem sempre claramente expostos na literatura vigente, podem implicar vieses, o que dificulta a interpretação dos dados.

Uma limitação deste estudo foi o fato de os médicos residentes do grupo exposto também apresentarem contato esporádico com radiação. Entretanto, medidas de proteção como aventais de chumbo de corpo inteiro e de tireoide foram sistematicamente adotadas, a fim de minimizar esta exposição. Ademais, também não foram incluídos, no estudo, médicos residentes das especialidades de Ortopedia e Cirurgia Vascular, visto eles serem expostos, diariamente, à radiação.

Portanto, os marcadores de danos no material genético utilizados parecem ser sensíveis para avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade dos anestésicos inalatórios na exposição ocupacional. Este estudo mostra que esses jovens profissionais, em início de carreira, já apresentam alterações genômicas, as quais podem ter efeito deletério ao longo do tempo, o que reforça a urgência e importância do biomonitoramento genético, assim como da diminuição da exposição aos RGA, com o monitoramento das concentrações residuais de anestésicos inalatórios em SO. Dessa forma, é fundamental que tanto os médicos residentes quanto todos os profissionais atuantes em SO estejam cientes de sua exposição ocupacional. Urge a implantação de adequados sistemas de exaustão nas SO para minimizar tal exposição, já que se trata de problema relevante de saúde pública.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que médicos residentes expostos a altas concentrações de isoflurano, sevoflurano e N_2O, mesmo na presença parcial de sistema de exaustão de ar nas SO, apresentam aumento significativo de danos sistêmicos no DNA e aumento na frequência de MN bucais, mas não de estresse oxidativo.

7 REFERÊNCIAS*

American Institute of Architects, Committee on Architecture for Health. Guidelines for construction and equipment of hospitals and medical facilities. 1992-93. Washington: American Institute of Architects Press; 1993.

Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. Free Radic Biol Med. 2001;31(9):1043-50.

Alleva R. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. Mutagenesis. 2003;18(5):423-8.

Andreoli TE. Free radicals and oxidative stress. Am J Med. 2000;108(8):650-1.

Araujo TK, da Silva-Grecco RL, Bisinotto FMB, 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(1):26.

Baker AB. Low flow and closed circuits. Anaesth Intensive Care. 1994;22(4):341-2.

Barker JP, Abdelatti MO. Anaesthetic pollution. Potential sources, their identification and control. Anaesthesia. 1997;52(11):1077-83.

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(3):189-93.

Benzie IF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of ‘‘antioxidant power’’: The FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239(1):70-6.

Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. Anal Biochem. 2006;354(2):290-8.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? Metabolism. 2000;49(2):3-8.

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(1):60-4.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references[Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last updated 2016 May 25 cited 2016 July 20]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington; 2008. 337p

Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. Mutat Res Rev Mutat Res. 2015;766:20-31.

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;28(3):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(3):88-97.

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, Salvadori DMF. Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay. Toxicol In Vitro. 2007;21(5):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(2):251-4.

Braz MG, Braz LG, Mazoti MA, Pinotti MF, Pardini MIMC, Braz JRC, et al. Lower levels of oxidative DNA damage and apoptosis in lymphocytes from patients undergoing surgery with propofol anesthesia. Environ Mol Mutagen. 2012;53(1):70-7.

Braz MG, Braz LG, Freire CM, Lucio LM, Braz JR, Tang G, et al. Isoflurane and propofol contribute to increasing the antioxidant status of patients during minor elective surgery: a randomized clinical study. Medicine (Baltimore). 2015;94(31):e1266.

Briggs G, Maycock J. The anaesthetic machine. Anaesth Intensive Care Med. 2013;14(3):94-8.

Brozovic G, Orsolic N, Rozgaj R, Kasuba V, Knezevic F, Knezevic AH, et al. DNA damage and repair after exposure to sevoflurane in vivo, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. J Appl Genet. 2010;51(1):79-86.

Byhahn C, Wilke HJ, Westphal K. Occupational exposure to volatile anaesthetics - Epidemiology and approaches to reducing the problem. CNS Drugs. 2001;15(3):197-215.

Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. Mutat Res. 2003;531(1-2):5-23.

Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. Free Radic Biol Med. 2010;49(1):9-21.

Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. N Engl J Med. 2003;348(21):2110-24.

Cao G, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Methods Enzymol. 1999;299:50-62.

Casale T, Caciari T, Rosati MV, Gioffrè PA, Schifano MP, Capozzella A, et al. Anesthetic gases and occupationally exposed workers. Environ Toxicol Pharmacol. 2014;37(1):267-74.

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(1):11-9.

Cerit N, Onuk AA, Ellidag HY, Eren E, Bulbuller N, Yilmaz N. Arylestarase and oxidative stress in operating room personnel. Adv Clin Exp Med. 2014;23(1):49-55.

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(4):249-54.

Chaoul MM, Braz JR, Lucio LM, Golim MA, Braz LG, Braz MG. Does occupational exposure to anesthetic gases lead to increase of pro-inflammatory cytokines? Inflamm Res. 2015;64(12):939-42.

Chinelato AR, Froes NDTC. Genotoxic effects on professionals exposed to inhalational anesthetics. Rev Bras Anestesiol. 2002;52(1):79-85.

Cohen EN, Brown BW, Bruce DL. 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, American Society of Anesthesiologists. Anesthesiology. 1974;41(4):321-40.

Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis. 1993;14(9):1733-5.

Collins AR, Dusinská M, Gedik CM, Stětina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? Environ Health Perspect. 1996;104(Suppl 3):465-9.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. Mutagenesis. 2008;23(3):143-51.

Costa Paes ER, Braz MG, Lima JT, Gomes da Silva MR, Bentes de Sousa L, Lima ES, et al. DNA damage and antioxidant status in medical residents occupationally exposed to waste anesthetic gases. Acta Cir Bras. 2014;29(4):280-6.

Dascalaki EG, Lagoudi A, Balaras CA, Gaglia AG. Air quality in hospital operating rooms. Build Environ. 2008;43(11):1945-52.

De Hert SG. The current place of nitrous oxide in clinical practice: An expert opinion-based task force consensus statement of the European Society of Anaesthesiology. Eur J Anaesthesiol. 2015;32(8):517-20.

Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. Mutagenesis. 2008;23(3):191-205.

Eisenach JH, Sprung J, Clark MM, Shanafelt TD, Johnson BD, Kruse TN, et al. The psychological and physiological effects of acute occupational stress in new anesthesiology residents: a pilot trial. Anesthesiology. 2014;121(4):878-93.

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(5):1573-7.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res. 2000;455(1-2):81-95.

Ferguson LR. Chronic inflammation and mutagenesis. Mutat Res. 2010;690(1-2):3-11.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Assoc Med Bras. 1997;43(1):61-8.

Gasparovic AC, Jaganjac M, Mihaljevic B, Sunjic SB, Zarkovic N. Assays for the measurement of lipid peroxidation. Methods Mol Biol. 2013;965:283-96.

Gunasekarana V, Raj GV, Chand P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. J Clin Diagn Res. 2015;9(3):GE01-5.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: University Press; 1989.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet. 1994;344(8924):721-4.

Harper N. Inhalational anaesthetics. Anaesth Intensive Care Med. 2004;5(8):278-82.

Health and Safety Executive (UK). Occupational exposure limits. Sudbury: HSE Books; 1996.

Hemmings HC Jr, Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA, Harrison NL. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. Trends Pharmacol Sci. 2005;26(10):503-10.

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(2):189-93.

Hoerauf KH, Wallner T, Akça O, Taslimi R, Sessler DI. Exposure to sevoflurane and nitrous oxide during four different methods of anesthetic induction. Anesth Analg. 1999a;88(4):925-9.

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. 1999b;82(5):764-6.

Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, et al. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18(4):505-10.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J Agric Food Chem. 2002;50(16):4437-44.

Hudson AE, Hemmings HC Jr. Are anaesthetics toxic to the brain? Br J Anaesth. 2011;107(1):30-7.

Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. Mutat Res. 2008;658(3):215-33.

Ishizawa Y. Special article: general anesthetic gases and the global environment. Anesth Analg. 2011;112(1):213-7.

ISSA International Section on the Prevention of Occupational Risks in Health Services. Safety in the use of anesthetic gases: Consensus paper from the basic German and French documentation. Hamburg: ISSA International Section on the Prevention of Occupational Risks in Health Services; 1997. ISSA Prevention Series; n. 2042 (E).

Izdes S, Sardas S, Kadioglu E, Karakaya AE. DNA damage, glutathione, and total antioxidant capacity in anesthesia nurses. Arch Environ Occup Health. 2010;65(4):211-7.

Kanmura Y, Sakai J, Yoshinaka H, Shirao K. Causes of nitrous oxide contamination in operating rooms. Anesthesiology. 1999;90(3):693-6.

Karabiyik L, Sardaş S, Polat U, KocabaŞ NA, Karakaya AE. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. Mutat Res. 2001;492(1-2):99-107.

Kashyap B, Reddy PS. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. J Cancer Res Ther. 2012;8(2):184-91.

Kassam A, Horton J, Shoimer I, Patten S. Predictors of well-being in resident physicians: a descriptive and psychometric study. J Grad Med Educ. 2015;7(1):70-4.

Kharasch ED, Schroeder JL, Sheffels P, Liggitt HD. Influence of sevoflurane on the metabolism and renal effects of compound A in rats. Anesthesiology. 2005;103(6):1183-8.

Kharasch ED. Adverse drug reactions with halogenated anesthetics. Clin Pharmacol Ther. 2008;84(1):158-62.

Kopp Lugli A, Yost CS, Kindler CH. Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia. Eur J Anaesthesiol. 2009;26(10):807-20.

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

Lewis JR. Operating room air distribution effectiveness. ASHRAE Trans. 1993;99(2):1191-200.

Lue BH, Chen HJ, Wang CW, Cheng Y, Chen MC. Stress, personal characteristics and burnout among first postgraduate year residents: a nationwide study in Taiwan. Med Teach. 2010;32(5):400-7.

Malekirad AA, Ranjbar A, Rahzani K, Kadkhodaee M, Rezaie A, Taghavi B, et al. Oxidative stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases. Hum Exp Toxicol. 2005;24(11):597-601.

Martien S, Abbadie C. Acquisition of oxidative DNA damage during senescence: the first step toward carcinogenesis? Ann N Y Acad Sci. 2007;1119:51-63.

Mastrangelo G, Comiati V, dell'Aquila M, Zamprogno E. Exposure to anesthetic gases and parkinson disease. BMC Neurol. 2013;13:194.

McGregor DG, Baden JM, Bannister C, Domino KB, Ehrenwerth J, Eisenkraft JB, et al. Waste anesthetic gases: information for management in anesthetizing areas and the postanesthesia care unit (PACU). Park Ridge: American Society of Anesthesiologists; 1999.

McKay DL, Chen CY, Yeum KJ, Matthan NR, Lichtenstein AH, Blumberg JB. Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: a randomized, cross-over pilot study. Nutr J. 2010;9:21.

Moppett I. Inhalational anaesthetics. Anaesth Intensive Care Med. 2012;13(7):348-53.

Musak L, Smerhovsky Z, Halasova E, Osina O, Letkova L, Vodickova L, et al. Chromosomal damage among medical staff occupationally exposed to volatile anesthetics, antineoplastic drugs, and formaldehyde. Scand J Work Environ Health. 2013;39(6):618-30.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Criteria for a recommended standard: occupational exposure to anesthetic gases and vapors. Cincinnati: U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, DHEW (NIOSH); 1977. Publication n. 77-140.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Waste anesthetic gases: occupational hazards in hospitals. Cincinnati: U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, DHEW (NIOSH); 2007. DHHS (NIOSH) Publication n. 2007–151.

National Institutes of Health (NIH), National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). Drinking levels defined. Washington: U.S. Department of Health and Human Services; 2016.

Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin Chem. 1997;43(7):1209-14.

Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med. 2010;49(4):503-15.

Nogueira FR, Braz LG, de Andrade LR, de Carvalho AL, Vane LA, Módolo NS, et al. Evaluation of genotoxicity of general anesthesia maintained with desflurane in patients under minor surgery. Environ Mol Mutagen. 2016;57(4):312-6.

Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. Toxicol Lett. 2004;149(1-3):309-34.

Occupational Safety & Health Administration. Anesthetic gases: guidelines for workplace exposures [Internet]. Washington: OSHA; 2000 [cited 2016 Apr 13]; Available from: http://www.osha.gov/dts/osta/anestheticgases/index.html

Oliveira CRD. Occupational exposure to anesthetic gases residue. Rev Bras Anestesiol. 2009;59(1):110-24.

Panni MK, Corn SB. Scavenging in the operating room. Curr Opin Anaesthesiol 2003;16(6):611-7.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53(10):4290-302.

Reichle FM, Conzen PF. Halogenated inhalational anaesthetics. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2003;17(1):29-46.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 2010;49(11):1603-16.

Rocha TL, Dias-Junior CA, Possomato-Vieira JS, Goncalves-Rizzi VH, Nogueira FR, de Souza KM, et al. Sevoflurane Induces DNA damage whereas isoflurane leads to higher antioxidative status in anesthetized rats. Biomed Res Int. 2015;2015:264971.

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(1):11-7.

Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. Nat Rev Neurosci. 2004;5(9):709-20.

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

Schiewe-Langgartner F, Wiesner G, Gruber M, Hobbhahn J. Exposure of hospital personnel to sevoflurane. Anaesthesist. 2005;54(7):667-72.

Silva LM, Braz LG, Módolo NS. Emergence agitation in pediatric anesthesia: current features. J Pediatr (Rio J). 2008;84(2):107-13.

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(1):184-91.

Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I, et al. Key characteristics of carcinogens as a basis for organizing data on mechanisms of carcinogenesis. Environ Health Perspect. 2016;124(6):713-21.

Souza KM. Avaliação de danos no material genético em anestesiologistas [Projeto de pesquisa]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu; 2016.

Stachnik J. Inhaled anesthetic agents. Am J Health Syst Pharm. 2006;63(7):623-34.

Steege AL, Boiano JM, Sweeney MH. NIOSH health and safety practices survey of healthcare workers: training and awareness of employer safety procedures. Am J Ind Med. 2014;57(6):640-52.

Steen PA, Michenfelder JD. Neurotoxicity of anesthetics. Anesthesiology. 1979; 50(5):437-53.

Szyfter K, Stachecki I, Kostrzewska-Poczekaj M, Szaumkessel M, Szyfter-Harris J, Sobczyński P. Exposure to volatile anaesthetics is not followed by a massive induction of single-strand DNA breaks in operation theatre personnel. J Appl Genet. 2016; 57(3):343-8.

Takács J. Toxicology of nitrous oxide. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2001;15(3):349-62.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nat Protoc. 2009;4(6):825-37.

Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic 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, et al. 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(1):69-77.

Torri G. Inhalation anesthetics: a review. Minerva Anestesiol. 2010;76(3):215-28.

Türkan H, Aydin A, Sayal A. Effect of volatile anesthetics on oxidative stress due to occupational exposure. World J Surg. 2005;29(4):540-2.

Turpin BJ, Huntzicker JJ. Identification of secondary organic aerosol episodes and quantitation of primary and secondary organic aerosol concentrations during SCAQS. Atmos Environ. 1995;29(23):3527-44.

Urban BW, Bleckwenn M. Concepts and correlations relevant to general anaesthesia. Br J Anaesth. 2002;89(1):3-16.

Vaisman AI. Working conditions in the operating room and their effect on the health of anesthetists. Eksp Khir Anesteziol. 1967;12(3):44-9.

Vane LA, Almeida Neto JTP, Curi PR, Vianna PTG, Braz JRC. O efeito do sistema Venturini na prevenção de poluição de sala cirúrgica. Rev Bras Anestesiol. 1990; 40(3):159-65.

von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. STROBE Initiative: The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. Lancet. 2007; 370(9596):1453-7.

Vouriot A, Gauchard GC, Chau N, Nadif R, Mur JM, Perrin PP. Chronic exposure to anesthetic gases affects balance control in operating room personnel. Neurotoxicology. 2005;26(2):193-8.

Whalen FX, Bacon DR, Smith HM. Inhaled anesthetics: an historical overview. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2005;19(3):323-30.

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(1):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(1):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(8):861-4.

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(1-2):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 (N(2)O). Mutat Res. 2012;731(1-2):58-63.

Yasny JS, White J. Environmental implications of anesthetic gases. Anesth Prog. 2012;59:154-8.

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: smolina@fmb.unesp.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de dezembro de 2014 OF. 163/2014-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Leandro Gobbo Braz
Departamento de Anestesiologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Prezado Dr. Leandro,

Em relação ao Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 4440-2012**) "Determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos e avaliação genômica e de estresse oxidativo em profissionais recém-expostos", coordenado por Vossa Senhoria, informo que foi **AUTORIZADA** a inclusão do Prof. Titular José Reinaldo Cerqueira Braz na equipe do estudo, ficando na seguinte conformidade:

Autor: Lorena Mendes de Carvalho Lúcio
Orientador: Leandro Gobbo Braz
Pesquisador Colaborador: *Ana Lucia dos Anjos Ferreira, Daisy Maria Fávero Salvadori, Mariana Gobbo Braz e José Reinaldo Cerqueira Braz.*

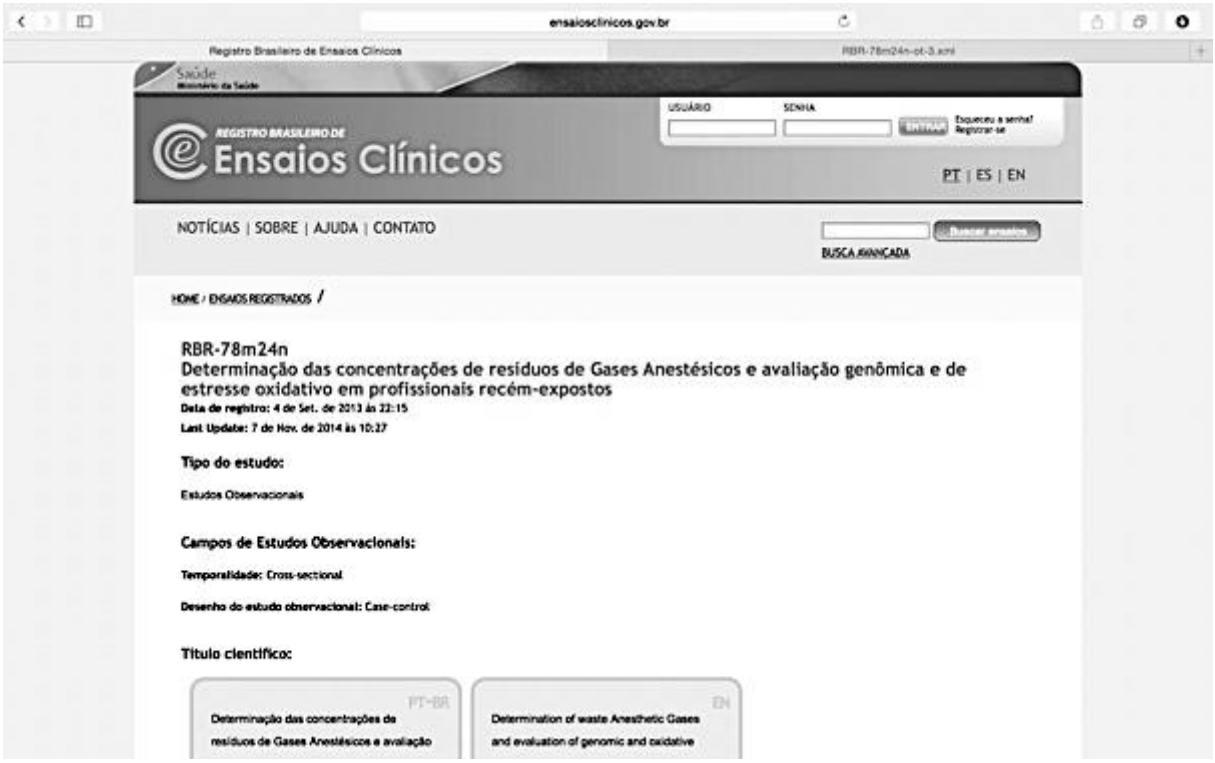
Atenciosamente,

Profª. Drª. Silvana Andréa Molina Lima
Coordenadora do CEP

ANEXO B

Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC)

Número do registro: RBR-78m24n



APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

I - **Identificação**
Nome:_____

Endereço: _____

Cidade: _____ Bairro: _____

CEP: _____ Estado: _____ Telefone: _____

II - **Título da pesquisa:** Determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos e avaliação genômica e de estresse oxidativo em profissionais recém-expostos

III - Explicações do pesquisador aos indivíduos da pesquisa

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa clínica.

A exposição ocupacional ao óxido nitroso (N_2O) e aos anestésicos halogenados em profissionais que atuam no centro cirúrgico (anestesiologistas, cirurgiões, enfermeiros e auxiliares técnicos) pode resultar em efeitos adversos à saúde. Ainda não são conhecidas as reais consequências dessa exposição em profissionais recém-expostos que atuam em salas de cirurgia, como os médicos residentes de anestesiologia e cirurgia.

A exposição crônica a concentrações ambientais mais elevadas de gases anestésicos tem sido associada à genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Alguns trabalhos verificaram aumento significativo de quebras no DNA em linfócitos de profissionais expostos aos resíduos de gases anestésicos. Esses danos ao DNA podem ser avaliados por alguns testes genéticos, tais como teste do cometa, teste do micronúcleo, avaliação do sistema de defesa antioxidante e avaliação da lipoperoxidação.

No presente estudo, objetiva-se avaliar o impacto dos gases anestésicos à saúde de indivíduos expostos (médicos residentes das especialidades de anestesiologia, otorrinolaringologia, oftalmologia, neurocirurgia e cirurgia pediátrica com três anos de exposição ocupacional a resíduos de gases anestésicos) e não

expostos (médicos residentes sem exposição ocupacional). Para isso, serão realizados os testes supracitados mediante coleta de amostras de sangue e saliva daqueles que, como você, estão sendo convidados a participar dessa pesquisa. A coleta será realizada em um único momento, e não será necessário nenhum tipo de acompanhamento. O material coletado será usado unicamente para este fim, sendo posteriormente desprezado. Além disso, haverá uma avaliação da qualidade do ar das salas de cirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, através da medição de gases anestésicos nessas salas, com uso de um aparelho apropriado.

Pedimos também que você responda a um questionário padronizado, contendo alguns dados pessoais. Os dados anotados durante a pesquisa serão mantidos em caráter confidencial e sua identidade será preservada. O pesquisador responsável por este estudo, sempre que solicitado, estará à disposição para esclarecer qualquer questão relacionada à pesquisa. Além disso, você tem total liberdade para se recusar a participar da pesquisa. Caso você concorde em participar e depois não o queira mais, você pode retirar o seu consentimento. O estudo não lhe trará nenhum benefício imediato, porém os seus resultados reforçarão as consequências da exposição ocupacional aos gases anestésicos, porventura vindo a desencadear melhores políticas no controle do seu uso diário e das salas de cirurgia.

Os resultados do estudo serão publicados em congressos ou revistas especializadas e a sua identidade será preservada. Ressaltamos ainda que nem os pesquisadores nem os pacientes receberão qualquer remuneração financeira para participar desta pesquisa.

IV - Consentimento pós-informado

Eu,
_____
abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre eventuais riscos, assim como benefícios que podem resultar do estudo. Concordo, portanto, em participar na qualidade de sujeito do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

_____, _____ de _____ de 20 ___

Assinatura do participante Assinatura do pesquisador

Este documento recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e foi elaborado em duas vias sendo que a primeira via será entregue ao participante e a segunda via será mantida em arquivo pelo pesquisador.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa ou de retirada do consentimento entrar em contato:

Pesquisador Responsável: Pós-Graduanda Lorena Mendes de Carvalho Lucio

Pesquisador Orientador: Leandro Gobbo Braz (Professor Assistente do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP)

Endereço residencial: Rua Azaléia, 370, Bloco 2, apt 101, Bairro Chácara Floresta, Botucatu-SP. CEP:18603-550

Fone: (14) 3811-6222, e-mail: limcarvalho@yahoo.com.br; lbraz@fmb.unesp.br

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO

Determinação das concentrações de resíduos de gases anestésicos e avaliação genômica e de estresse oxidativo em profissionais recém-expostos

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,tomografia e escopia recentemente (no último mês)?
( ) sim ( ) não

44-Quando?_____

45-Sabe quantas chapas ou tomografias 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, tranqüilizantes, 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 qual 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?_____

Se mulher:

80- Já teve aborto? ( ) sim ( ) não

81 – Está tentando engravidar? ( ) sim ( ) não

82- Tem dificuldade para engravidar? ( ) sim ( ) não

83- Tem dor de cabeça ou outras dores? ( ) sim ( ) não

84- Tem náusea, vômito, fadiga ou sensações físicas e psicológicas frente a carga de trabalho? ( ) sim ( ) não

85- Há quanto tempo?_____

Se homem:

86-Sua parceira já teve aborto? ( ) sim ( ) não

87- Está tentando engravidar sua parceira? ( ) sim ( ) não

88- Tem dificuldade para engravidar? ( ) sim ( ) não

89- Tem dor de cabeça ou outras dores? ( ) sim ( ) não

90- Tem náusea, vômito, fadiga ou sensações físicas e psicológicas frente a carga de trabalho? ( ) sim ( ) não

91- Há quanto tempo?_____

IV – Atividade Profissional

92-Qual é a sua especialidade médica?_____

93-Você é residente? ( ) sim ( ) não

94-Se sim, de que ano?
( ) R1 ( ) R2 ( ) R3

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

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

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

98-Tem exposição à radiação (raio-X, tomografia, ressonância) ou outra exposição ocupacional?
( ) sim ( ) não

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

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

101 - Se sim, há quanto tempo não está exposto? _____meses

V- Coleta da amostra biológica

102-Teve exposição aos resíduos de gases anestésicos no dia de hoje?
( ) sim ( ) não

103-Se sim, por quantas horas?_____

104- Realizou anestesia inalatória este mês?
( ) sim ( ) não

105- Quantas vezes? _____

106- Se sim, qual anestésico?
( ) N_2O ( ) isoflurano ( ) desflurano ( ) sevoflurano

107- Qual o fluxo de gás fresco utilizado durante a anestesia? _____l/min

108- Realizou anestesia inalatória hoje?
( ) sim ( ) não

109- Se sim, qual anestésico?
( ) N_2O ( ) isoflurano ( ) desflurano ( ) sevoflurano

110- Qual o fluxo de gás fresco utilizado durante a anestesia? _____l/min