

Jose Eduardo Bagnara Orosz

**Avaliação de danos oxidativos no DNA de linfócitos e
estresse oxidativo no plasma de pacientes submetidos
a cirurgia sob anestesia balanceada com sevoflurano**

Orientadora: Profa Dra Mariana Gobbo Braz

Co-orientador: Prof. Titular José Reinaldo Cerqueira Braz

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

**Botucatu - SP
2014**

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

Orosz, Jose Eduardo Bagnara.

Avaliação de danos oxidativos no DNA de linfócitos e estresse oxidativo no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia balanceada com sevoflurano / Jose Eduardo Bagnara Orosz. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Mariana Gobbo Braz

Coorientador: José Reinaldo Cerqueira Braz

Capes: 40102130

1. Anestésicos - Efeito fisiológico. 2. Toxicidade - Testes. 3. Stress oxidativo. 4. Cirurgia.

Palavras-chave: Anestésicos inalatórios; Estresse oxidativo; Genotoxicidade; Procedimentos cirúrgicos menores.

Dedicatória

Às pessoas mais importantes da minha vida:

**João Carlos e Luzia, meus pais queridos;
exemplos de tudo o que aprendi de melhor;**

Glauce, minha esposa, pelo amor, apoio e compreensão;

Camila, nossa obra-prima, por tantas alegrias.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que possibilitaram a concretização desse trabalho.

Em especial:

À Profa Dra Mariana Gobbo Braz, pelo incentivo, vasto conhecimento transmitido e pela didática irretocável na orientação desse trabalho.

Ao Prof. Titular José Reinaldo Cerqueira Braz, exemplo de dedicação, comprometimento e competência, minha admiração pela sabedoria e serenidade, e minha profunda gratidão pela confiança e paciência como meu co-orientador.

Ao Prof. Dr. Leandro Gobbo Braz e à Dra Rosa Beatriz Amorim, pelo inestimável auxílio na coleta das amostras.

À Profa Dra Daisy Maria F. Salvadori, pelos ensinamentos em genotoxicidade e discussão dos resultados.

À Profa Dra Ana Lúcia A. Ferreira, pelos ensinamentos em estresse oxidativo e discussão dos resultados.

À Profa Dra Lídia Raquel de Carvalho, pelo grande auxílio na análise estatística.

À Damiana T. Pierine, pela ajuda na condução de alguns experimentos.

Ao colega Márcio Antônio de Almeida Barreira, pela ajuda na seleção dos pacientes.

Aos pacientes que doaram amostras de seu sangue para a expansão do conhecimento científico.

Aos professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo aprendizado e exemplo de seriedade acadêmica.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Patologia e Clínica Médica.

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu: Neli Aparecida Pavan, Joana Jacirene Costa Teixeira e André Passaroni, pela amizade e atenção que sempre me dispensaram.

À Rosemeire Aparecida Vicente, pela elaboração da Ficha Catalográfica e revisão das Referências.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo Auxílio à Pesquisa concedido (2009/51110-5).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do sevoflurano.....	16
Figura 2	Momentos das coletas de amostras de sangue venoso periférico.....	28
Figura 3	Mediana, quartis e maior e menor valores de danos no DNA (quebras de fita e sítios álcali-lábeis) avaliados em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p>0,05$	37
Figura 4	Mediana, quartis e maior e menor valores de danos em bases púricas do DNA, reconhecidas pela presença de sítios sensíveis à enzima fpg, avaliados em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p>0,05$	38
Figura 5	Mediana, quartis e maior e menor valores de danos em bases pirimídicas do DNA, reconhecidas pela presença de sítios sensíveis à enzima endo III, avaliados em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p>0,05$	39

- Figura 6** Mediana, quartis e maior e menor valores plasmáticos de MDA dos pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. * $p=0,038$ em relação a m2..... 40
- Figura 7** Mediana, quartis e maior e menor valores da capacidade antioxidante do plasma em pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p>0,05$ 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores demográficos e gênero dos indivíduos estudados.....	33
Tabela 2	Tipo e duração das cirurgias, e doses totais de fentanil, rocurônio e sevoflurano.....	34
Tabela 3	Valores do intraoperatório segundo os momentos estudados.....	35
Tabela 4	Valores hemodinâmicos segundo os momentos estudados.....	36

Orosz, José Eduardo Bagnara. Avaliação de danos oxidativos no DNA de linfócito e estresse oxidativo no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia balanceada com sevoflurano. Botucatu, 2014. 96p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

RESUMO

Apesar da eficácia e segurança demonstradas no uso clínico dos anestésicos inalatórios, existem ainda algumas questões a serem respondidas sobre genotoxicidade e efeitos no equilíbrio redox celular. Poucos estudos têm avaliado os danos no material genético ou o estresse oxidativo em pacientes submetidos a procedimento cirúrgico sob uso do anestésico sevoflurano. Para melhor entender os possíveis efeitos tóxicos deste agente, o presente estudo objetivou avaliar os danos oxidativo no DNA, a peroxidação lipídica e a defesa antioxidante plasmática durante e após a anestesia geral balanceada mantida com sevoflurano, em 15 pacientes adultos sem comorbidades, os quais foram submetidos a cirurgias eletivas de pequeno porte. As amostras de sangue venoso foram coletadas antes da anestesia; após a indução anestésica e imediatamente antes da cirurgia; 2 horas após o início da anestesia e no dia seguinte a cirurgia. Os danos no DNA foram avaliados em linfócitos periféricos utilizando o teste do cometa com as enzimas formamidopirimidina-DNA glicosilase (fpg) e endonuclease III (endo III) para detecção de lesões em purinas e pirimidinas oxidadas, respectivamente. O malonaldeído (MDA) e a defesa antioxidante

plasmática foram detectados por fluorescência. Os resultados mostraram que não houve aumento nos danos do DNA ou oxidação de bases entre os momentos avaliados. A anestesia balanceada com sevoflurano não alterou os níveis de MDA e a defesa antioxidante do plasma manteve-se inalterada durante e após a anestesia. Em conclusão, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que o sevoflurano não leva à oxidação de material genético ou de lipídios e não altera a capacidade antioxidante do plasma durante e após a anestesia balanceada em pacientes sem comorbidades submetidos a cirurgias minimamente invasivas.

Palavras-chave: Anestésicos inalatórios; Genotoxicidade; Estresse oxidativo; Procedimentos cirúrgicos menores.

Orosz, José Eduardo Bagnara. Evaluation of oxidative DNA damage in lymphocytes and oxidative stress in plasma of patients undergoing surgery with balanced sevoflurane anesthesia. Botucatu, 2014. 96p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology) - Botucatu Medical School, UNESP.

ABSTRACT

Despite of the anesthetics effectiveness and safety in clinical use, there are some questions to be answered concerning their genotoxicity and effects on cellular redox balance. Only a few studies have evaluated DNA damage or oxidative stress in patients during surgical procedure with the volatile anesthetic sevoflurane. To further understand the possible toxic effects of this agent, the current study aimed to evaluate oxidative DNA damage, lipid peroxidation and plasma antioxidant defense during and after general balanced anesthesia maintained with sevoflurane in 15 adult patients without comorbidities who underwent elective minor surgery. The venous blood samples were collected at baseline-before anesthesia; after anesthesia induction and immediately before surgery; 2 h after the beginning of anesthesia; and on the day following surgery. DNA damage was detected in peripheral lymphocytes using the comet assay, and the enzymes formamidopyrimidine-DNA glycosylase (fpg) and endonuclease III (endo III) were used to recognize oxidized purine and pyrimidine lesions, respectively. Plasma malondialdehyde (MDA) and antioxidant defense were detected by fluorescence. The results showed no increase in DNA damage or base

oxidation among the time points evaluated. Balanced anesthesia with sevoflurane did not alter MDA levels, and plasma antioxidant defense was unchanged during or after anesthesia. In conclusion, this study showed, for the first time, that sevoflurane does not lead to oxidation in genetic material or lipids, and does not alter the antioxidant status during or after balanced anesthesia in patients without comorbidities undergoing minimally invasive surgeries.

Keywords: Anesthetics, inhalation; Genotoxicity; Oxidative stress; Surgical procedures, minor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Anestésicos Halogenados	14
1.2	Anestésicos Inalatórios e Genotoxicidade	16
1.3	Testes de Genotoxicidade	17
1.4	Anestésicos Inalatórios e Estresse Oxidativo	18
1.5	Avaliação do Estresse Oxidativo	20
2	OBJETIVO	22
3	PACIENTES E MÉTODO	23
3.1	Casuística	23
3.2	Técnica Anestésica	24
3.3	Momentos Estudados	26
3.4	Amostras de Sangue	27
3.5	Análise de Danos Oxidativos no DNA	28
3.5.1	Teste do cometa	28
3.6	Análise do Estresse Oxidativo	30
3.6.1	Avaliação da peroxidação lipídica	30
3.6.2	Aferição da capacidade antioxidante do plasma	31
3.7	Análise Estatística	32

4	RESULTADOS	33
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE.....	60
	APÊNDICE A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
	APÊNCIDE B Questionário	62
	ANEXO.....	68
	Manuscrito enviado para publicação.....	68

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Anestésicos Halogenados

Se por um lado a anestesia tornou-se, há décadas, imprescindível à execução de procedimentos invasivos, permitindo o salto na evolução da técnica cirúrgica observado nos últimos 50 anos, por diversas vezes também mostrou-se capaz de produzir efeitos indesejáveis (Torri, 2010).

A pesquisa por melhores fármacos buscou nas últimas décadas oferecer moléculas com maior seletividade por seus receptores e, com isso, maior previsibilidade de resposta, além de menor incidência de efeitos indesejáveis. Ao mesmo tempo, o rápido desenvolvimento da indústria de equipamentos permitiu que a tecnologia digital fosse incorporada aos aparelhos usados na monitorização perioperatória. Juntos, esses dois fatores possibilitaram ganhos relevantes no controle hemodinâmico, ventilatório e da homeostase, oferecendo ao paciente anestesiado um novo patamar de qualidade, com maior segurança tanto no intra como no pós-operatório. Essa evolução no uso clínico diário vem sendo acompanhada da busca contínua por moléculas ainda melhores e mais seguras, também do ponto de vista toxicológico.

A anestesia nasceu inalatória, obtida a partir do uso de vapor do éter sulfúrico, na década de 1840, nos Estados Unidos (Maia e Fernandes, 2002). Provocou à época uma grande revolução da medicina, ou, mais propriamente, da cirurgia, que encontrava na dor insuportável, produzida pela incisão, um

impedimento à sua evolução. Posteriormente, o éter foi substituído pelo clorofórmio, também sucedido por diversas outras substâncias inalatórias, até que se chegaram aos compostos halogenados mais modernos, não inflamáveis e menos tóxicos, usados até os dias de hoje.

Os anestésicos halogenados são, provavelmente, os anestésicos mais utilizados, isoladamente ou como parte de uma anestesia balanceada. São constituídos de pequenas moléculas lipofílicas capazes de passar através das membranas celulares, e são conhecidos como depressores da respiração mitocondrial, atuando em várias etapas da fosforilação oxidativa (Riess et al., 2004).

Atualmente, entre os anestésicos halogenados, o sevoflurano [éter fluorometil 1-(trifluorometil) 2,2,2-trifluoro etílico], é um dos mais largamente empregados (Torri, 2010), pelas vantagens que oferece, decorrentes de seu baixo coeficiente de partição sangue-gás, que possibilita rápida indução anestésica e despertar igualmente breve. Também oferece a vantagem de poder ser empregado para indução inalatória em crianças, por apresentar odor agradável e pouco pungente (Eger, 1994) (Figura 1).

O sevoflurano foi identificado como anestésico volátil potente na década de 1960, mas não foi utilizado na prática clínica até 1995, devido a questões relacionadas à extensão de sua degradação na presença de compostos absorvedores de CO₂ (Smith et al., 1996), utilizados nos aparelhos de anestesia.

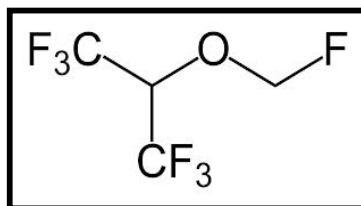


Figura 1 - Estrutura química do sevoflurano.

O composto A [fluormetil-2,2 -difluór - 1 - (trifluormetil) vinil éter] é o principal produto de degradação do sevoflurano formado no circuito ventilatório dos aparelhos de anestesia (Kharash, 1995), como consequência da dehidrofluorinação da molécula halogenada. Trata-se de agente alquilante, com grande afinidade pelo centro nucleofílico de macromoléculas (Fink et al., 1992), sendo capaz de se ligar ao ácido desoxirribonucleico (DNA), produzindo modificações no material genético, como as observadas pelo aumento da frequência de troca entre cromátides irmãs (SCE) em células de ovário de *hamster* chinês (CHO) (Eger et al., 1997). Por outro lado, o Composto A não se mostrou mutagênico quando avaliado pelo teste de Ames (Morio et al., 1992).

1.2 Anestésicos Inalatórios e Genotoxicidade

Apesar da eficácia e da segurança demonstradas pelo sevoflurano em quase duas décadas de uso clínico, há ainda algumas questões a serem respondidas quanto ao seu potencial genotóxico e influência no equilíbrio redox celular, sobretudo em indivíduos que são expostos a esse anestésico quando submetidos a procedimento cirúrgico.

Tanto estudos experimentais (Jaloszynski et al., 1999; Szyfter et al., 2004) como epidemiológicos (Bilban et al., 2005; Chandrasekhar et al., 2006) sugerem que a exposição aos anestésicos inalatórios pode levar a danos no genoma.

Os potenciais genotóxico e mutagênico do sevoflurano foram avaliados *in vitro* (Szyfter et al., 2004; Kaymak et al. 2012), em animais (Kaymak et al. 2004; Brozovic et al., 2010) e em pacientes anestesiados (Karabiyik et al., 2001; Krause et al., 2003; Kadioglu et al., 2009), com resultados conflitantes. No entanto, ressalta-se que apenas alguns estudos têm avaliado o efeito genotóxico do sevoflurano na prática clínica e a maioria destes trabalhos foram conduzidos com pacientes portadores de doenças associadas (Karabiyik et al., 2001) ou que foram submetidos a cirurgias invasivas ou de grande porte (Alleva et al., 2003; Kadioglu et al., 2009), fatores que podem influenciar os resultados positivos de genotoxicidade observados. Além disso, alguns estudos avaliaram a genotoxicidade somente após a anestesia, e não durante o procedimento anestésico-cirúrgico (Kaymak et al., 2004; Brozovic et al., 2010).

1.3 Testes de Genotoxicidade

O teste de Ames, também chamado de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, é capaz de detectar mutações em colônias de bactérias. Trata-se de teste simples e de baixo custo, sendo utilizado para triagem de compostos potencialmente genotóxicos e cancerígenos (Morio et al., 1992). O teste de trocas entre cromátides irmãs (SCE) é uma técnica citogenética, e usualmente

empregada na investigação inicial de substâncias suspeitas de mutagênese e/ou carcinogênese (Wiesner et al., 2008). Outra técnica, bastante sensível para avaliação de danos no material genético, é a de aberrações cromossômicas (CA), a qual requer cultivo celular, e vem sendo também empregada em estudos epidemiológicos (Bilban et al., 2005). O teste do micronúcleo (MN) também é utilizado para avaliar lesões no material genético, sendo capaz de identificar agentes clastogênicos e aneugênicos (Brozovic et al., 2010).

Diferentemente, o teste do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após divisão celular, podem então resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Desta forma, esse teste é utilizado em estudos para detecção de agentes genotóxicos e em epidemiologia. O teste do cometa apresenta várias vantagens que incluem alta sensibilidade, possibilidade de avaliações de danos em células individuais, necessidade de amostras celulares extremamente pequenas, e ainda a possibilidade de ser aplicado a qualquer população de células, necessitando apenas de células viáveis e não necessariamente em proliferação (Collins, 2004). Trata-se de teste relativamente simples e rápido, e de baixo custo para mensuração de quebras de fitas simples e duplas e sítios álcali-lábeis (Tice et al., 2000).

1.4 Anestésicos Inalatórios, Cirurgia e Estresse Oxidativo

Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (*reactive oxygen species* - ROS e *reactive nitrogen species* - RNS) são constantemente

produzidos no organismo como consequência normal do metabolismo aeróbio (Vasconcelos et al., 2007). O sistema de defesa antioxidante é capaz de neutralizar esses agentes, evitando, assim, danos em alvos vulneráveis, tais como ácidos graxos insaturados da membrana celular, aminoácidos/proteínas, e bases do DNA (Beretta et al., 2006). Quando ocorre desequilíbrio entre a magnitude da formação de oxidantes e de antioxidantes, pode haver excesso de radicais e espécies reativas, resultando em oxidação lipídica e proteica, e instabilidade genômica, o que se convencionou chamar de estresse oxidativo (Baysal et al., 2009).

O ato cirúrgico pode não apenas intensificar o quadro de estresse oxidativo pela geração de ROS e iniciar a resposta inflamatória no organismo, mas, também, diminuir a atividade do sistema de defesa biológico contra o ataque dessas moléculas. A lesão tecidual induzida por cirurgia minimamente invasiva tem menor efeito sobre o sistema imunológico, diferentemente do que ocorre nas cirurgias abdominais e ortopédicas (Levy e Tanaka, 2003). Cirurgias oftalmológicas e otorrinolaringológicas são consideradas pouco invasivas e parecem ocasionar menor elevação de citocinas pró-inflamatórias (Goto et al., 2000).

Acredita-se que os anestésicos halogenados também podem contribuir com o estresse oxidativo, por reagirem diretamente com a molécula de DNA, alquilando as purinas, ou por meio da formação de compostos reativos/liberação de ROS, induzindo vários tipos de danos (Jaloszynski et al., 1999; Alleva et al., 2003). O sevoflurano sofre um grau moderado de metabolização (2% a 5%),

catalisada pelo citocromo P450 hepático (Kharasch et al., 1995), e que pode desencadear diretamente a formação de peroxinitrito e aumentar peróxidos intracelulares e óxido nítrico, elevando a produção de ROS (Brozovic et al., 2008). Além disso, o sevoflurano pode ser indutor do processo de apoptose celular (Delogu et al., 2001).

Na literatura ao nosso alcance, há poucos relatos sobre possível ocorrência de estresse oxidativo em pacientes submetidos a procedimento cirúrgico com sevoflurano (Alleva et al., 2003; Sivaci et al. 2006; Cinnella et al., 2007; Türkan et al., 2011). Até o momento faltam informações sobre os possíveis danos oxidativos na molécula do DNA, peroxidação lipídica e defesa antioxidante em pacientes durante e após cirurgias de pequeno porte sob anestesia com sevoflurano. Optando-se por cirurgias de menor porte e pouco invasivas, o desenho metodológico do presente estudo visou minimizar a influência do trauma cirúrgico, reduzindo seu efeito sobre o estado oxidativo em pacientes submetidos ao sevoflurano.

1.5 Avaliação do Estresse Oxidativo

Há várias maneiras de aferição do estresse oxidativo, como o sistema antioxidante e/ou marcadores de dano oxidativo. A avaliação do sistema antioxidante pode ser realizada por antioxidantes individuais e/ou por capacidade antioxidante total. Dentre a avaliação de antioxidantes, destacam-se os enzimáticos como: glutathiona (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além dos co-fatores enzimáticos selênio,

magnésio, zinco, entre outros. Dentre os não enzimáticos, encontram-se os hidrossolúveis (albumina, ácido úrico, ácido ascórbico, etc) e os lipossolúveis (bilirrubina, carotenoides, vitamina E, etc).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma reação em cadeia que acontece nas membranas celulares, com a geração de moléculas altamente instáveis, sendo o malonaldeído (MDA) um aldeído de baixo peso molecular, considerado importante biomarcador de estresse oxidativo (Kadiiska et al., 2005). Outro aldeído gerado a partir do ataque de ROS aos ácidos poli-insaturados da membrana celular é o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Cinnella et al., 2007). Há ainda marcadores como os grupos carbonil, produtos finais da oxidação de aminoácidos e proteínas (Sivaci et al., 2007).

O teste do cometa também é uma metodologia eficiente na detecção de danos oxidativos na molécula de DNA, já que é possível, durante o experimento, a utilização de enzimas de reparo que reconhecem as bases oxidadas (Collins et al., 1997). Deve-se destacar que a maioria dos trabalhos na literatura que monitoraram as lesões no DNA de pacientes submetidos ao ato anestésico-cirúrgico, com o teste do cometa, não utilizou enzimas que reconhecem os danos oxidativos, o que diminui a sensibilidade do teste.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito genotóxico e de estresse oxidativo, incluindo danos oxidativos no DNA, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante, da anestesia balanceada com sevoflurano, em pacientes adultos sem comorbidades, submetidos a cirurgia eletiva minimamente invasiva.

3 PACIENTES E MÉTODO

3.1 Casuística

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP [3167/2009-B] e registrado no *site* do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC sob o identificador REQ 965. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) foi obtido de cada um dos participantes do estudo, após preenchimento de questionário sobre dados pessoais, informações gerais e história médica (Anexo B).

O estudo foi realizado em 15 indivíduos, de ambos os sexos, com estado físico classificado pela Sociedade Americana de Anestesiologistas (ASA) como ASA I (pacientes saudáveis, que não apresentam outra doença a não ser a patologia cirúrgica - Fleisher, 2004) com idade de 18 a 44 anos. Os indivíduos eram todos pacientes da clínica otorrinolaringológica, candidatos às cirurgias eletivas de septoplastia ou timpanoplastia, com duração mínima de 2 horas, sob anestesia geral balanceada com sevoflurano.

Foram excluídos os indivíduos obesos (índice de massa corporal - IMC ≥ 30), portadores de doença maligna, genética ou diabetes, os tabagistas, os que fizeram uso regular de álcool ou alguma medicação, e os que no período de até 30 dias antes da cirurgia haviam recebido radiação, vitaminas, suplementos alimentares, ou ainda, que apresentaram quadros de infecção ou inflamação.

3.2 Técnica Anestésica

Os pacientes receberam como medicação pré-anestésica midazolam (3 mg IV) na sala de operação (SO), onde foram monitorizados com eletrocardioscopia contínua (ECG) nas derivações DII e V5, pressão arterial não-invasiva, frequência cardíaca e saturação periférica de oxihemoglobina (SpO_2), utilizando-se biomonitor Dixtal, modelo DX2010 (Manaus, Brasil). Após indução anestésica e intubação traqueal, foram também monitorizadas as pressões inspiradas e expiradas de oxigênio e sevoflurano, e a pressão expiratória final de dióxido de carbono ($P_{ET}CO_2$), utilizando-se o aparelho de anestesia Primus, da Dräger Medical (Lübeck, Alemanha).

A monitorização do bloqueio neuromuscular do músculo adutor do polegar, pela estimulação do nervo ulnar, foi realizada com emprego do aparelho *TOF Guard* (Biometer, Dinamarca), que se baseia no método da aceleromiografia, utilizando-se como padrão de estimulação a sequência de quatro estímulos (SQE). Utilizou-se em todos os pacientes aquecimento por convecção, com manta térmica específica *Core Drape* modelo 503-030 e o aparelho gerador de fluxo de ar aquecido *WarmTouch* (Mallinkrodt Medical, EUA), após a indução da anestesia.

A indução anestésica foi realizada com o hipnótico propofol (AstraZeneca, Itália), na dose de 2 mg.kg^{-1} IV de peso corporal, o opióide fentanil (Janssen, Brasil) IV ($5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) e rocurônio (Organon, Holanda) IV ($0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$), como bloqueador neuromuscular. A manutenção anestésica foi realizada com sevoflurano (Abbott Laboratories, Brasil), utilizando-se 1,0 a 1,5 concentração

alveolar mínima (CAM) (2%-3%), e reinjeções de fentanil ($2 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e rocurônio $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, conforme a necessidade de cada paciente, de acordo, respectivamente, com os valores de pressão arterial e frequência cardíaca, e com a relação entre a primeira (T1) e quarta (T4) respostas à sequência de quatro estímulos do nervo ulnar.

O fluxo de gases frescos usado consistiu de oxigênio ($0,8 \text{ L.min}^{-1}$) e ar comprimido medicinal ($1,2 \text{ L.min}^{-1}$), e utilizou-se circuito semifechado com cal sodada para absorção de CO_2 e permutador de calor e umidade dotado de filtro bacteriano e viral entre o circuito respiratório e o tubo traqueal (Pall BB100; Pall Corporation, EUA). A fração inspirada de oxigênio (FiO_2) foi de 0,5, volume corrente de 8 mL.kg^{-1} , e a P_{ETCO_2} foi mantida entre 30 e 40 mm Hg, por meio de alterações na frequência respiratória.

Após a indução anestésica, um sensor de temperatura foi introduzido no esôfago inferior para medida da temperatura esofágica ou central (T_{ESOF}), utilizando-se um dos canais do termômetro elétrico *Mon-a-Therm* modelo 90044 (Mallinkrodt Medical, EUA) com dois canais de temperatura (Thermistor 400, Mallinkrodt Medical, EUA). O segundo canal foi utilizado para medida da temperatura na sala de cirurgia (T_{SO}), com sensor colocado próximo ao paciente, mas afastado de fonte de calor.

Ao final da cirurgia os pacientes receberam ou não reversão do bloqueio neuromuscular com atropina ($15 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e neostigmina ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$) IV,

de acordo com a intensidade de bloqueio neuromuscular observado pela monitorização através da sequência de quatro estímulos.

A desintubação traqueal foi realizada somente nas situações de relação T4/T1 igual ou superior a 0,9, com o paciente apresentando resposta a estímulos verbais e com parâmetros ventilatórios dentro da normalidade.

A analgesia pós-operatória foi feita com tramadol (Janssen, Brasil) (1 mg.kg^{-1}) e dipirona (Hoesht, Brasil) (30 mg.kg^{-1}) IV. Profilaxia de náuseas e vômitos foi obtida com uso de ondansetrona (Glaxo SmithKline, Brasil) (8 mg) IV. Todos os pacientes foram encaminhados à Sala de Recuperação Pós-Anestésica, recebendo alta para o quarto sem quaisquer intercorrências.

3.3 Momentos Estudados

Foram registrados após a medicação pré-anestésica e antes da indução anestésica (momento basal) os valores de pressões sistólica e diastólica (mm Hg), frequência cardíaca (bat.min^{-1}), saturação periférica de O_2 (%) e temperatura da SO ($^{\circ}\text{C}$). Os valores desses atributos, em conjunto com os da temperatura esofágica ($^{\circ}\text{C}$), concentração expirada de sevoflurano (%) e da pressão parcial de gás carbônico no final da expiração (P_{ETCO_2}) (mm Hg) foram também registrados após a indução anestésica e intubação traqueal (tempo 0 minuto), e nos tempos 30, 60 e 120 minutos após a indução anestésica e ao final da cirurgia. Foram também registradas a duração da cirurgia e o consumo de fentanil, rocurônio e sevoflurano.

3.4 Amostras de Sangue

Amostras de sangue venoso dos pacientes recrutados para o estudo foram coletadas em tubos com anticoagulante ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) antes de receberem a medicação pré-anestésica (m0), cerca de 15 minutos após a indução da anestesia e sempre imediatamente antes do início da cirurgia (m1), 2 horas após a indução da anestesia (m2) e no 1º dia do pós-operatório, ao redor de 20 horas após o término da cirurgia (m3) (Figura 2). Os tubos foram codificados para que não fossem identificados o paciente e o momento do estudo.

Imediatamente após cada coleta, os linfócitos foram isolados conforme descrito por Braz e Fávero Salvadori (2007) para realização do teste do cometa. O plasma foi separado por centrifugação, armazenado em alíquotas a -80°C até o momento da avaliação de MDA e aferição da capacidade antioxidante.

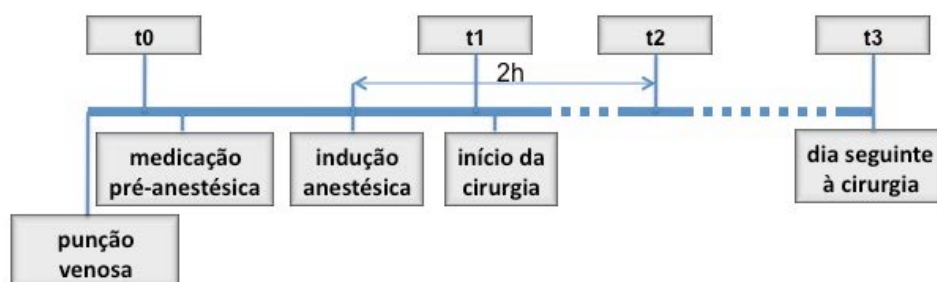


Figura 2 - Momentos das coletas de amostras de sangue venoso

3.5 Análise de Danos Oxidativos no DNA

3.5.1 Teste do cometa

Todas as etapas foram realizadas sob luz indireta. O teste do cometa foi realizado de acordo com a técnica descrita por Singh et al. (1988) e Tice et al. (1991), com pequenas modificações (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, sendo a seguir colocados sobre lâminas pré-revestidas com agarose a 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e acondicionadas a 4°C durante 5 minutos para permitir a solidificação da agarose. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada recém preparada (Tris 1% de Triton X-100, 2,5 M de NaCl, 10 mM, pH 10,

10% de DMSO e 100 mM EDTA) durante 2 horas. Após a etapa de lise, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato (PBS) e colocadas em tampão Flare 1x (Hepes 40 mM, KCl 0,1M, albumina de soro bovino - BSA 0,2 mg.mL⁻¹ e EDTA 0,5 mM, pH 8) durante 5 minutos (3 vezes). Posteriormente, foi adicionado sobre todas as lâminas, codificadas de acordo com o tratamento, 50 µL do tampão de reação das enzimas (Flare 10x, H₂O autoclavada e BSA; controle), ou 50 µL de endonuclease III - endo III (diluição 1:1.000), ou 50 µL de formamidopirimidina DNA glicosilase - fpg (diluição 1:1.000), a fim de se detectar os diferentes tipos de bases oxidadas no DNA. Todas as lâminas foram cobertas com lamínula e incubadas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Na sequência, as lâminas foram colocadas em geladeira por 15 minutos para solidificação da agarose, as lamínulas foram cuidadosamente removidas, e as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese, a qual foi preenchida com tampão alcalino gelado e recém preparado (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH > 13) por 40 minutos, para permitir o desenrolamento do DNA. A seguir, a eletroforese foi conduzida por período de 30 minutos a 25 V e 300 mA. Antes da fixação com etanol absoluto, as lâminas foram neutralizados durante 15 minutos (0,4 M Tris em pH de 7,5) e armazenadas a 4°C até o momento da análise.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio (20 µg.mL⁻¹), cobertas com lamínula e 100 nucleóides (50 em cada uma das duplicatas) foram analisados em microscópio de fluorescência acoplado ao sistema de análise de imagem (*Comet Assay II* -

Perceptive Instruments, Reino Unido), em aumento de 400X. Como parâmetro para a mensuração dos danos no DNA considerou-se o *tail intensity* (% de DNA na cauda). Todas as lâminas foram codificadas e preparadas em duplicata. Linfócitos tratados ou não com peróxido de hidrogênio foram utilizados, respectivamente, como controle positivo e negativo.

3.6 Análise do Estresse Oxidativo

3.6.1 Avaliação da peroxidação lipídica

Todas as etapas foram realizadas sob luz indireta. Alíquotas de 100 µL de plasma (de cada momento/paciente) foram adicionadas a 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) e a 10 µL de hidroxitolueno butilado (BHT). Os tubos foram vedados e aquecidos a 100°C por 20 minutos e posteriormente resfriados, em gelo, por 5 minutos. A solução foi transferida para outro tubo, o qual foi centrifugado por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 300 µL de sobrenadante foram adicionados a 50 µL de hidróxido de potássio (KOH) e 650 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) recém preparado. Os tubos foram vedados e aquecidos por 45 minutos a 100°C e posteriormente resfriados. Em placa negra de 96 poços foram pipetados 200 µL de cada amostra ou curva padrão (realizada com 1,1,3,3 tetraetoxipropano - TEP) em duplicata. O MDA foi detectado por fluorescência (filtro de 510/550 nm), utilizando-se o leitor de microplacas *Wallac Victor X2* (Perkin Elmer, Boston, EUA), sendo expresso em µM.

3.6.2 Aferição da capacidade antioxidante do plasma

A defesa antioxidante do plasma foi quantificada fluorometricamente, tal como descrito por Aldini et al. (2001) com algumas modificações (Braz et al., 2013). Todas as etapas foram realizadas sob luz indireta.

Alíquotas de 100 µL de plasma (de cada momento/paciente) foram adicionadas a 300 µL de tampão fosfato (PBS) e a 100 µL de BODIPY 581/591 (substância lipofílica fluorescente a ser oxidada), agitadas e incubadas a 37°C por 10 minutos. A seguir, 420 µL de PBS e 80 µL do radical iniciador 2,2-azobis-(2-amidinopropano) di-idrocloro - AAPH (20 mM) foram adicionados à reação, e submetidos a agitação em baixa velocidade.

Em placa negra de 96 poços foram pipetados 200 µL de cada amostra em triplicata, assim como o padrão contendo fosfatidilcolina (PC). Em seguida, a placa foi colocada no aparelho *Wallac Victor X2* (Perkin Elmer, Boston, MA, EUA) a 37°C e a corrida levou em torno de 4 horas. A oxidação de cada amostra foi monitorada por meio do aparecimento do produto de oxidação fluorescente do BODIPY 581/591 ($\lambda_{ex} = 500$, $\lambda_{em} = 520$ nm). Calculou-se a capacidade antioxidante pela área do padrão e de cada amostra para obtenção dos resultados pela fórmula: $\text{área PC} - \text{área amostra} / \text{área do PC} \times 100$ (%).

3.7 Análise Estatística

O tamanho amostral foi calculado para 15 pacientes, com poder estatístico de 80%. Os atributos do intraoperatório (pressões arteriais, frequência cardíaca, temperaturas esofágica e da SO, saturação periférica de oxigênio, além de sevoflurano e CO₂ expirados) apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância. Dessa forma, utilizou-se ANOVA para comparação entre os momentos estudados. Os dados do intraoperatório, assim como os demográficos, foram apresentados em média e desvio padrão, exceto para gênero e tipo de cirurgia (distribuição de frequências).

Os dados de danos oxidativos (DNA e lipídios) e de defesa antioxidante não mostraram distribuição normal, sendo o teste não-paramétrico de Friedman empregado para comparação entre os momentos avaliados. Os dados foram expressos como medianas e quartis. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

A população de pacientes estudada constituiu-se de adultos jovens, não obesos, com proporção semelhante entre homens e mulheres (Tabela 1).

Nenhum dos pacientes teve complicações cirúrgicas e todos receberam alta do hospital, de acordo com as diretrizes estabelecidas para o procedimento cirúrgico.

Tabela 1 - Valores demográficos e gênero dos indivíduos estudados

Atributos	
Idade (anos)*	28 ± 9
Peso (kg)*	66 ± 11
Altura (cm)*	167 ± 10
IMC (kg.m ⁻²)*	24 ± 4
Gênero (M/F)**	8 / 7

IMC: índice de massa corporal.

M: Gênero masculino.

F: Gênero feminino.

* Valores expressos em média ± desvio padrão

** Valores expressos em distribuição de frequências

A tabela 2 apresenta os dados relativos ao tipo e duração das cirurgias, e às doses totais de anestésicos nos pacientes avaliados.

Tabela 2 - Tipo e duração das cirurgias, e doses totais de fentanil, rocurônio e sevoflurano

Tipo de cirurgia**	
timpanoplastia / septoplastia	8 / 7
Duração da cirurgia (min)*	204 ± 59
Dose total de fentanil (µg)*	457 ± 90
Dose total de rocurônio (mg)*	43 ± 8
Consumo total de sevoflurano (mL)*	63 ± 24

* Valores expressos em média ± desvio padrão

** Valores expressos em distribuição de frequências

Os valores de temperatura da SO diminuíram significativamente após 120 minutos da indução anestésica em relação ao tempo 30 minutos ($p < 0,05$), enquanto os valores de temperatura esofágica aumentaram de forma não significativa ($p > 0,05$) (Tabela 3). Os valores de CO_2 expirado aumentaram, de forma significativa, no final da cirurgia em relação aos tempos 30 e 60 minutos após a indução da anestesia ($p < 0,05$) (Tabela 3). Os valores de saturação periférica de O_2 não apresentaram diferença significativa ao longo do estudo ($p > 0,05$). Os valores de concentração expirada de sevoflurano diminuíram significativamente no final da cirurgia em relação aos momentos 30 a 120 minutos ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores do intraoperatório segundo os momentos estudados

Atributo	Basal	Tempo (minutos) após a indução da anestesia				Final da cirurgia	p
		0	30	60	120		
T _{SO} (C°)	23,1±1,1ab	23,2±1ab	23,3±0,8a	22,9±0,9ab	22,3±1,0b	22,6±1,1ab	0,017
T _{ESOF} (C°)		35,5±3,3a	36,2±0,7a	36,3±0,5a	36,7±0,6a	37±0,6a	0,06
P _{ET} CO ₂ (mm Hg)		36±4ab	34±2b	34±2b	35±3ab	37±4a	0,017
SEV _{exp} (%)		1,9±0,4ab	2,2±0,5a	2,2±0,4a	2,3±0,5a	1,7±0,6b	0,03
SpO ₂ (%)	97±1a	98±1a	97±3a	98±1a	98±1a	98±1a	0,19

Valores expressos em média ± desvio-padrão; T_{SO} = temperatura da sala de operação; T_{ESOF} = temperatura esofágica; P_{ET}CO₂ = pressão expiratória final de CO₂; SEV_{exp} = concentração de sevoflurano expirado; SpO₂ = saturação periférica de O₂ ; Final= final da cirurgia. Momentos representados por médias com letras minúsculas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

Quanto aos parâmetros hemodinâmicos, não houve alteração significativa da frequência cardíaca (p>0,05), mas se observou diferença em relação à pressão arterial, tanto sistólica como diastólica, ao longo do procedimento anestésico, com redução de seus valores após a indução da anestesia até o final da cirurgia (p<0,05) (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores hemodinâmicos segundo os momentos estudados

Atributo	Basal	Tempo (min) após a indução da anestesia				Final da cirurgia	Valor p
		0	30	60	120		
PAS (mm Hg)	120 ± 10a	100 ± 9b	101 ± 10b	98 ± 13b	99 ± 12b	98 ± 11b	<0,001
PAD (mm Hg)	71 ± 8a	57 ± 11bc	56 ± 10bc	51 ± 7c	58 ± 15bc	64 ± 17ab	<0,001
FC (bat.min ⁻¹)	82 ± 16a	76 ± 15a	80 ± 10a	79 ± 13a	86 ± 15a	81 ± 19a	0,16

Valores expressos pela média ± desvio-padrão; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; FC = frequência cardíaca. Momentos representados por médias com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

Em relação aos danos no material genético, a anestesia geral balanceada com sevoflurano não induziu aumento de danos do DNA (quebras de fita simples ou dupla, ou sítios álcali-lábeis) após a indução da anestesia e imediatamente antes da cirurgia (m1), 2 horas depois do início da anestesia (m2), e um dia após a cirurgia (m3) nos linfócitos de pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico ($p=0,49$; Figura 3). Resultados similares foram observados quando as enzimas fpg e endo III foram utilizadas para detecção de danos em purinas e pirimidinas oxidadas, respectivamente ($p=0,20$; $p=0,88$; Figuras 4 e 5).

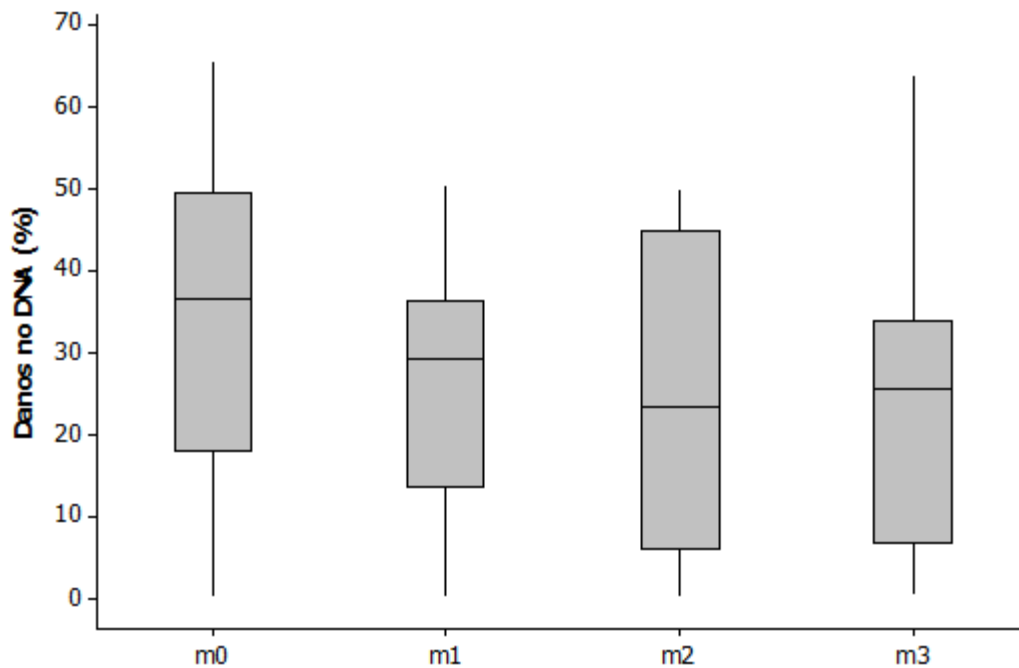


Figura 3 - Mediana, quartis e maior e menor valores de danos no DNA (quebras de fita e sítios álcali-lábeis) avaliados em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p > 0,05$.

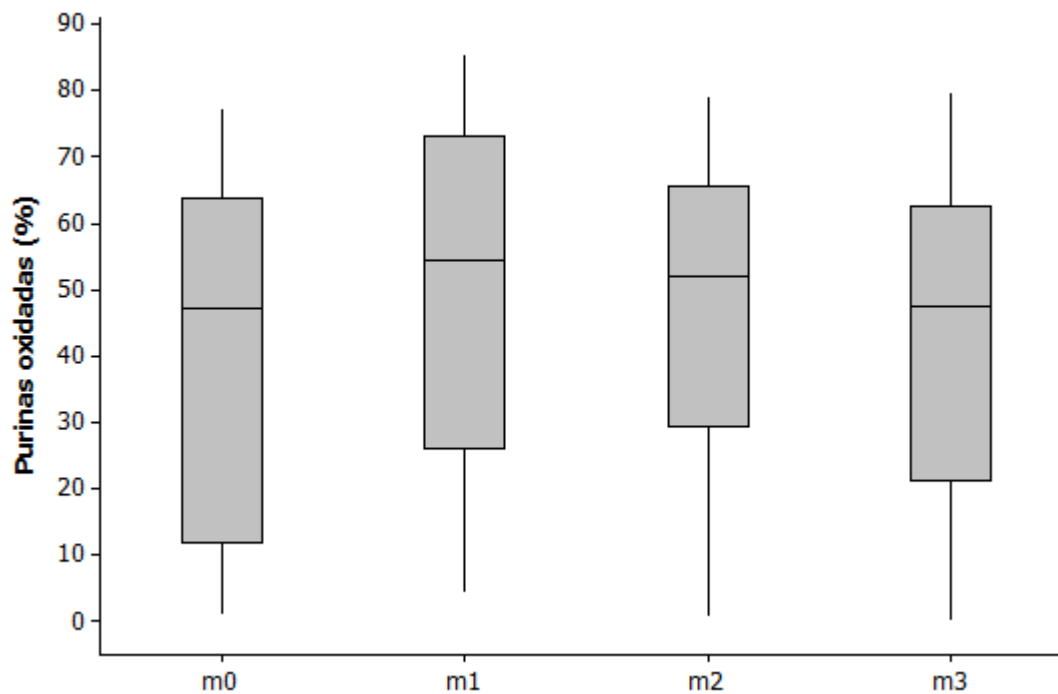


Figura 4 - Mediana, quartis e maior e menor valores de danos em bases púricas do DNA, reconhecidas pela presença de sítios sensíveis à enzima fpg, avaliados em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p > 0,05$.

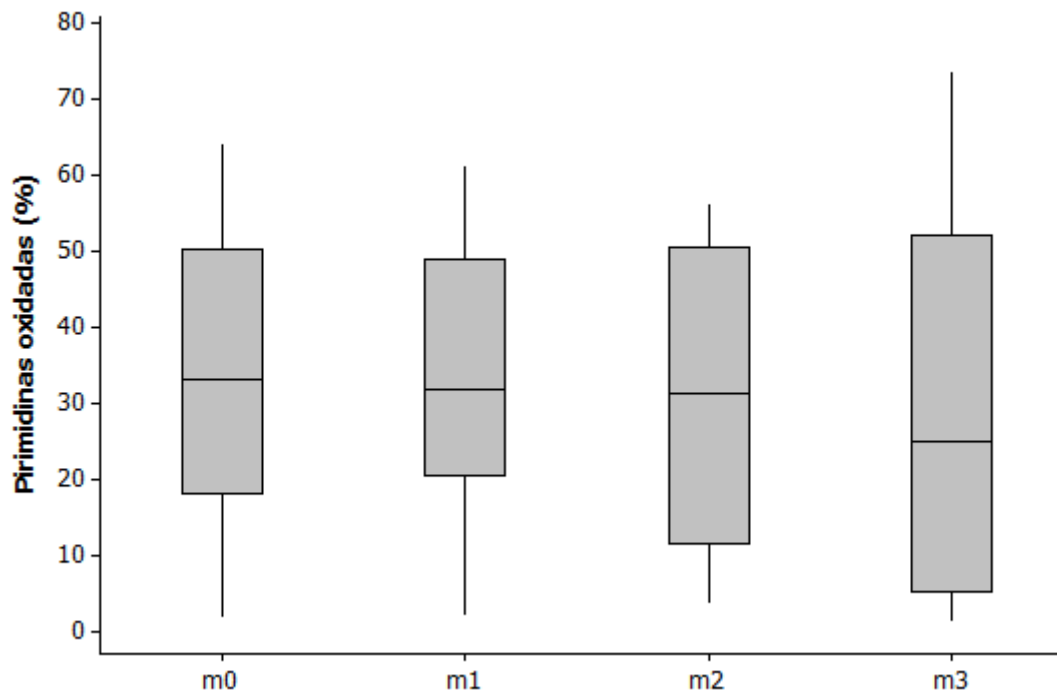


Figura 5 - Mediana, quartis e maior e menor valores de danos em bases pirimídicas do DNA, reconhecidas pela presença de sítios sensíveis à enzima endo III, avaliados em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p > 0,05$.

A figura 6 apresenta os valores de MDA plasmáticos nos quatro momentos de estudo. A anestesia com sevoflurano não induziu peroxidação lipídica. Observou-se aumento significativo de MDA apenas no dia seguinte a cirurgia (m3), quando comparado ao momento 2 horas após o início da anestesia (m2).

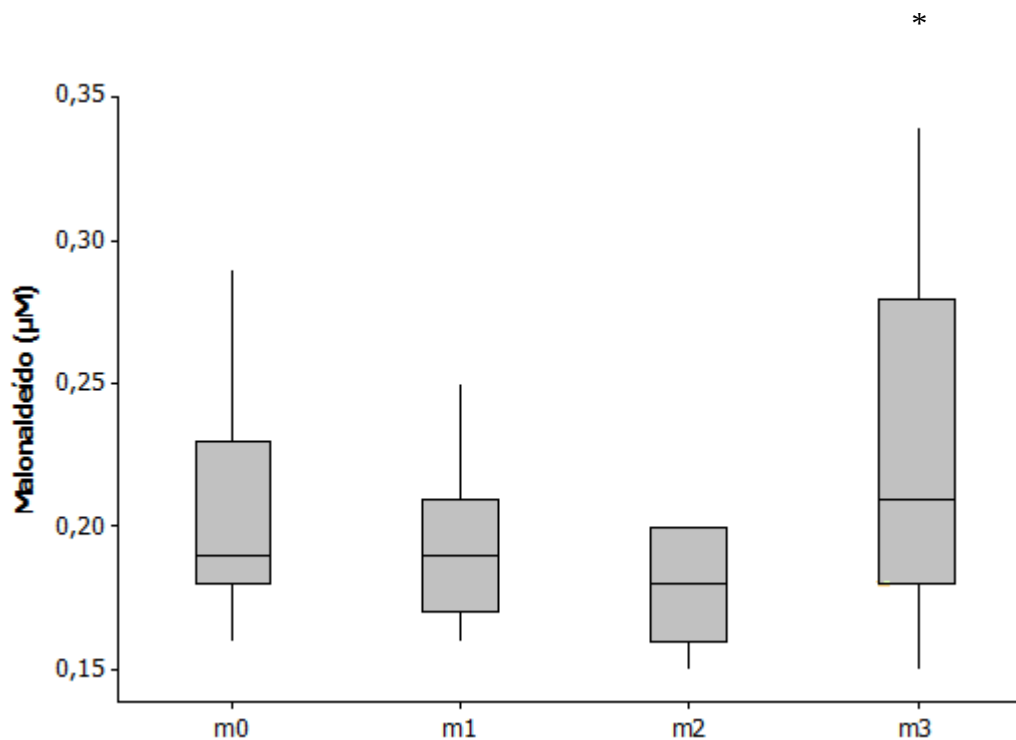


Figura 6 - Mediana, quartis e maior e menor valores plasmáticos de MDA dos pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. * p=0,038 em relação a m2.

Os dados referentes à defesa antioxidante plasmática são apresentados na figura 7. Não houve alteração significativa da capacidade antioxidante durante ou após a anestesia com sevoflurano ($p=0,31$).

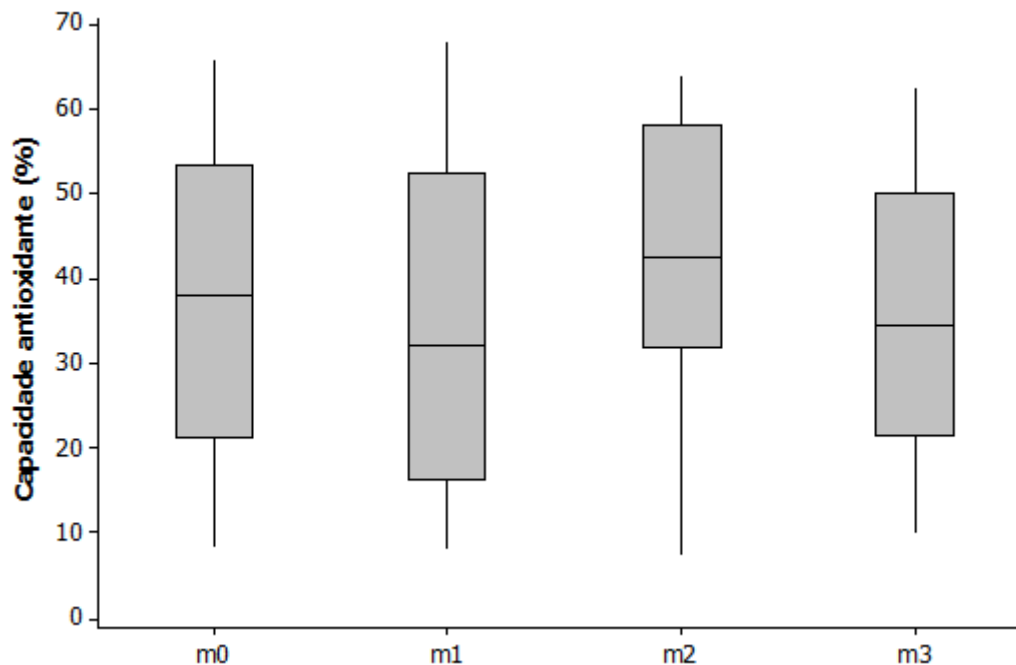


Figura 7 - Mediana, quartis e maior e menor valores da capacidade antioxidante do plasma em pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia com sevoflurano nos momentos avaliados. m0: antes da pré-medicação e da indução da anestesia; m1: após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia; m2: 2 horas após a indução anestésica; m3: no dia seguinte ao da cirurgia. $p>0,05$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou, pela primeira vez, que a anestesia balanceada com sevoflurano não induz danos oxidativos no material genético, não tem influência na peroxidação lipídica e não altera a capacidade antioxidante durante ou após cirurgias minimamente invasivas em pacientes sem comorbidades.

Quanto aos parâmetros hemodinâmicos, os resultados em relação aos valores da pressão arterial durante a anestesia eram esperados, com diminuição significativa de seus valores após a indução anestésica, por serem considerados adequados para cirurgias otorrinolaringológicas. Desse modo, evita-se a ocorrência de sangramentos excessivos no campo operatório, que prejudicam a realização das cirurgias propostas.

A ausência de alteração significativa da frequência cardíaca no intraoperatório possivelmente foi devida à manutenção de plano anestésico adequado durante as cirurgias e à utilização de brometo de rocurônio como bloqueador neuromuscular. Este fármaco é um composto de amônio quaternário, que difere do pancurônio pela ausência de grupamento acetil-éster no núcleo esteróide. Apresenta pequeno potencial para liberação de histamina e determina fraco bloqueio vagal, com pequena ou nenhuma interferência na frequência cardíaca (Naguib et al., 1995).

Os valores obtidos da temperatura ambiente, de 21 a 23°C, são considerados ideais para o conforto da equipe cirúrgica. Por outro lado, a temperatura relativamente baixa da SO, associada à vasodilatação produzida por alguns dos anestésicos utilizados, como propofol (Chiu e White, 2004) e sevoflurano (Eger, 1994; Ebert e Schmid, 2004), leva a perda de calor e tendência à hipotermia. Isso ocorre porque a vasodilatação determina aumento da circulação de sangue às camadas mais superficiais do corpo, como pele e tecido subcutâneo. Dessa forma, há desvio térmico do calor do compartimento central, representado pelos órgãos ricamente vascularizados, para os tecidos periféricos, com diminuição significativa da temperatura central dos pacientes (Vanni et al., 2003). Consequentemente, a temperatura central média de 35,5°C dos pacientes no tempo zero (após a indução anestésica) deveu-se à temperatura fria da SO, em combinação com os efeitos de redistribuição interna do calor após a indução anestésica.

O aumento, embora não significativo, da temperatura esofágica dos pacientes durante a realização das cirurgias, ocorreu devido aos cuidados que foram tomados, como o aquecimento da parte inferior do corpo e dos membros inferiores dos pacientes com manta aquecida, fazendo com que o calor periférico, aos poucos, fosse incorporado ao compartimento central (Vanni et al., 2003). A temperatura central não foi aferida antes da indução da anestesia, mas apenas após a intubação traqueal, pois a passagem do sensor esofágico para determinação da temperatura central seria extremamente desconfortável no paciente acordado.

Os valores da $P_{ET}CO_2$ foram mantidos adequados durante a realização das cirurgias. Somente ao final das cirurgias seus valores aumentaram significativamente devido ao fato de que alguns pacientes já respiravam espontaneamente, mas ainda estavam se recuperando do estado anestésico. Normalmente os pacientes não apresentam volume-minuto adequado ao final da cirurgia, o que ocasiona retenção de CO_2 , com aumento consequente da $P_{ET}CO_2$.

Os valores da concentração de sevoflurano no circuito ventilatório do aparelho de anestesia mantiveram-se como desejado, entre 1 e 1,5 CAM. Somente ao final da cirurgia seus valores foram menores, abaixo de 1 CAM, como esperado, devido ao término da cirurgia.

Crítérios rigorosos foram seguidos no presente estudo em relação à seleção dos indivíduos estudados, incluindo apenas adultos jovens, sem comorbidades, de ambos os sexos e sem obesidade. A literatura mostra que alguns fatores como idade avançada e doenças associadas podem levar à instabilidade genômica (Fenech, 1998; Botto et al., 2002; Moran et al., 2008; Piperakis et al., 2009).

A intensidade da resposta inflamatória, que pode ser geradora de estresse oxidativo, guarda estreita relação com o tipo e o porte do procedimento cirúrgico. Cirurgias com incisões extensas, maior lesão tecidual, ou invasão das cavidades peritoneal ou torácica, sobretudo com manipulação de vísceras, levam a reação inflamatória mais intensa que procedimentos minimamente invasivos (Desborough et al., 2000; Schneemilch et al., 2004), como as cirurgias otorrinolaringológicas, às quais nossos pacientes foram submetidos.

Existem poucos estudos relacionados à genotoxicidade do sevoflurano, os quais apresentam resultados controversos. Estudo realizado *in vitro*, utilizando o teste do cometa, mostrou que o sevoflurano em concentrações de 0,1 mM, 1 mM, 10 mM e 100 mM foi capaz de induzir danos no DNA de linfócitos e células espermáticas após exposição por cinco minutos (Kaymak et al., 2012). Por outro lado, ausência de genotoxicidade foi observada quando linfócitos periféricos foram expostos a esse anestésico volátil, em concentrações de 1 mM ou 10 mM, por intervalos de 10 minutos ou 30 minutos, a diferentes temperaturas (Szyfter et al., 2004).

Em relação aos modelos animais, raros trabalhos têm avaliado o possível efeito genotóxico do sevoflurano. Kaymak e colaboradores (2004) submeteram coelhos a anestesia inalatória com sevoflurano a 3%, por três horas, durante vários dias, e observaram aumento de danos no DNA após exposição repetida a esse agente, em amostras de sangue colhidas no segundo e terceiro dias de inalação, com diminuição dos danos após cinco dias da última exposição. Os mesmos autores mostraram que os animais tratados previamente (15 dias antes da exposição) com antioxidantes como vitamina E (50 UI.dia⁻¹) ou selênio (15 µg.dia⁻¹) apresentaram menos danos que o grupo somente exposto ao sevoflurano. Outro estudo demonstrou efeito genotóxico do sevoflurano (2,4%) após três dias, quando administrado em camundongos expostos por períodos de duas horas diárias (Brozovic et al., 2010). É importante ressaltar que tais estudos avaliaram a genotoxicidade apenas após a inalação de sevoflurano, mas não durante a anestesia.

Em relação aos estudos realizados em pacientes, Krause e colaboradores (2003) não observaram aumento na frequência de troca entre cromátides irmãs após anestesia com sevoflurano (2,5% a 3%) em crianças de um a 14 anos, submetidas a procedimentos cirúrgicos de pequeno porte. Em estudo anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, não se observou diferença, em relação às lesões no DNA, entre pacientes anestesiados com propofol, isoflurano ou sevoflurano (Braz et al., 2011). De forma similar, estudo conduzido em pacientes submetidos a cirurgia colorretal eletiva por laparotomia não se observou aumento nas quebras do DNA em leucócitos de pacientes anestesiados com sevoflurano empregado com 30% ou 80% de oxigênio, mas apenas quando o sevoflurano foi associado a 70% de óxido nitroso (Chen et al., 2013). Assim, esses dados confirmam nossos resultados, de que a anestesia com sevoflurano não é genotóxica em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, quando o agente é associado ao oxigênio.

Por outro lado, pacientes sem ou com comorbidades (ASA I ou II), com idades de 20 a 66 anos, submetidos a cirurgias abdominais inferiores, apresentaram aumento progressivo de danos no DNA após 60 e 120 minutos do início da anestesia com sevoflurano, com redução no primeiro dia de pós-operatório, e retorno a valores próximos dos basais no terceiro dia após a cirurgia (Karabiyik et al., 2001). Resultados semelhantes foram relatados por Kadioglu e colaboradores (2009), quando avaliaram pacientes com câncer de mama (estado físico ASA II ou III), com idades de 33 a 65 anos, que foram submetidas a cirurgia sob anestesia com sevoflurano (1% - 1,5%). Foi observado efeito genotóxico

reversível em amostras de sangue, com danos detectados aos 120 minutos de anestesia, e retorno a valores semelhantes aos do pré-operatório no quinto dia. Essas pacientes apresentaram mais quebras de fita e sítios álcali-lábeis no DNA que o grupo controle (constituído por indivíduos saudáveis), antes mesmo do procedimento anestésico-cirúrgico. Sabe-se que pacientes oncológicos têm susceptibilidade aumentada às mutações (Dhillon et al., 1995) e já foi demonstrada instabilidade genética em linfócitos de mulheres com câncer de mama (Colleu-Durel et al., 2004).

Estudos anteriores não avaliaram a oxidação de bases do DNA durante o procedimento anestésico-cirúrgico. Existem muitas enzimas envolvidas no reparo do DNA, as quais têm atividade específica em determinado tipo de lesão. A enzima fpg remove purinas oxidadas, enquanto que a endo III atua em pirimidinas oxidadas, introduzindo quebras nas fitas do DNA (Collins et al., 2008). Assim, a inclusão destas enzimas aumenta não só a sensibilidade, pela maior quantidade de quebras nas fitas de DNA, como também a especificidade dos dados gerados pelo teste do cometa (Dusinska e Collins, 2008).

Associando enzimas de reparo ao teste do cometa, foi possível mostrar a ausência de oxidação dessas bases do DNA, tanto durante como após a anestesia com sevoflurano, em pacientes adultos jovens sem comorbidades, submetidos a cirurgias minimamente invasivas. Por outro lado, Alleva et al. (2003) observaram aumento de bases oxidadas após 15 minutos da indução anestésica com propofol e atracúrio, mas não no dia seguinte à cirurgia, em pacientes em estado físico ASA I ou II, submetidos a procedimentos mais invasivos

(ortopédicos) sob anestesia com sevoflurano. Nesse caso, o aumento de oxidação no DNA ocorreu imediatamente após a indução da anestesia, antes mesmo do início da cirurgia, e pode ser atribuída à técnica anestésica utilizada. A intubação traqueal foi realizada apenas sob hipnose, provida por 2 mg.kg⁻¹ de propofol, e relaxamento muscular, obtido com 0,5 mg.kg⁻¹ de besilato de atracúrio. Assim, não foi realizada a imprescindível analgesia, habitualmente obtida com um agente analgésico potente como o fentanil, normalmente utilizado na indução da anestesia, para atenuar a resposta endócrina e inflamatória (Guilliland et al., 1997). Sabe-se que a laringoscopia realizada para a intubação traqueal é manobra acompanhada de estímulo nociceptivo intenso, que se não modulada por um fármaco analgésico, leva à maciça liberação de hormônios pró-inflamatórios, principalmente catecolaminas e cortisol, o que pode conduzir o organismo ao quadro de estresse oxidativo (Kurosawa e Kato, 2008).

Diferentemente, não observamos aumento de quebras de fita do DNA ou de bases oxidadas após indução anestésica com fentanil, propofol e rocurônio, na amostra colhida após o início da anestesia, mas imediatamente antes da cirurgia, e nem nos outros momentos avaliados. Dessa forma, a anestesia balanceada com sevoflurano não induziu danos oxidativos no material genético em pacientes sem comorbidades, submetidos a cirurgias eletivas de pequeno porte. É importante ressaltar que nenhum dos fármacos utilizados durante a anestesia e para a analgesia pós-operatória foi relatado como genotóxico (Brambilla e Martelli, 2009; Braz et al., 2009).

Nossos resultados não demonstraram alteração na produção de MDA durante a anestesia. Resultados similares foram relatados na literatura, quando pacientes foram submetidos a histerectomia ou cirurgia abdominal sob anestesia com sevoflurano (Cinnella et al., 2007; Türkan et al., 2011). Sivaci et al. (2006) observaram maior concentração de MDA e de conteúdo de proteínas carboniladas após seis horas e 24 horas de cirurgia laparoscópica em pacientes sob anestesia inalatória com desflurano, mas não com sevoflurano.

Por outro lado, observou-se, no presente estudo, que a concentração de MDA foi maior no dia posterior a cirurgia, quando comparada ao valor observado durante a anestesia. Ressalta-se que esses mesmos pacientes tiveram aumento da citocina pró-inflamatória interleucina 6 (IL-6) apenas um dia após a cirurgia, mas não durante a anestesia com sevoflurano (Orosz et al., 2012). Como o estresse oxidativo e a inflamação são processos interligados, as alterações observadas quanto à peroxidação lipídica e inflamação, no dia seguinte ao da cirurgia, podem ter sido resultado do trauma cirúrgico e não necessariamente da ação do anestésico.

Estudo experimental mostrou ausência de alterações de MDA ou de enzimas antioxidantes GSH-Px e SOD em porcos submetidos a ventilação mecânica durante anestesia com sevoflurano (Allaouchiche et al., 2001). Em outro estudo, também não foram detectadas alterações de GSH-Px e CAT eritrocitária após 12 horas da última exposição ao sevoflurano (4,0%) em ratos tratados durante 60 minutos, por cinco dias consecutivos (Bezerra et al., 2010).

Já em estudo realizado em pacientes submetidos a artroplastia de quadril, verificou-se redução de GSH no primeiro dia do pós-operatório após administração de sevoflurano (Alleva et al., 2003). O estresse cirúrgico, em procedimentos de grande porte como o descrito anteriormente, está associado a maior atividade oxidativa dos neutrófilos, o que pode elevar a produção de ROS (Simms e D'amico, 1997).

Aumento de zinco e GSH-Px, com decréscimo de SOD após uma hora de anestesia com sevoflurano foi relatada em pacientes submetidos a cirurgia abdominal (Türkan et al., 2011). Por outro lado, nossos pacientes não apresentaram mudanças na capacidade antioxidante do plasma, o que sugere um equilíbrio entre a produção de ROS e a defesa antioxidante durante e após o procedimento cirúrgico, condizente com os resultados de danos oxidativos no material genético e em lipídios.

Os anestésicos são fármacos necessariamente administrados durante todo o período da cirurgia, muitas vezes a pacientes portadores de enfermidades graves, ou submetidos a grandes traumas cirúrgicos, e que se encontram sob estresse oxidativo. Estudos como esse visam enriquecer o conhecimento mais aprofundado das potenciais repercussões dos fármacos à homeostase celular, que vão além dos efeitos clínicos observados na prática diária. Assim, essas informações podem auxiliar na indicação do anestésico mais adequado para cada paciente.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostram que a anestesia balanceada mantida com sevoflurano não induz oxidação do DNA ou peroxidação lipídica, e não altera a defesa antioxidante em pacientes com estado físico ASA I, submetidos a cirurgias eletivas. Assim, a anestesia com sevoflurano parece ser segura em relação ao material genético e ao status oxidativo quando administrada em pacientes adultos sem comorbidades, submetidos a cirurgias minimamente invasivas.

7 REFERÊNCIAS

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

Allaouchiche B, Debon R, Goudable J, Chassard D, Duflo F. Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anesth Analg.* 2001; 93:981-85.

Alleva R, Tomasetti M, Solenghi MD, Stagni F, Gamberini F, Bassi A, Fornasari PM, Fanelli G, Borghi B. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. *Mutagenesis.* 2003; 18:423-28.

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

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; 354:290-98.

Bezerra FJL, Vale NB, Macedo BO, Rezende AA, Almeida MG. Evaluation of antioxidant parameters in rats treated with sevoflurane. *Rev Bras Anesthesiol.* 2010; 60:162-69.

Bilban M, Jakopin CB, Ogrinc D. Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). *Int Arch Occup Environ Health.* 2005; 8:60-4.

Botto N, Masetti S, Petrozzi L, Vassalle C, Manfredi S, Biagini A, Andreassi MG. Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2002; 13:269-74.

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

Braz MG, Fávero Salvadori DM. Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay. *Toxicol In Vitro.* 2007; 21:972-6.

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

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

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

Braz MG, Braz LG, Braz JR, Pierine DT, Correa CR, Ferreira AL, Carvalho LR, Yeum KJ, Salvadori DM. Comparison of oxidative stress in ASA physical status I patients scheduled for minimally invasive surgery under balanced or intravenous anesthesia. *Minerva Anesthesiol.* 2013; 71:1030-8.

Brozovic G, Orsolic N, Knezevic F, Knezevic AH, Benkovic V, Vrdoljak DV, Saric A. Evaluation of DNA damage in vivo induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. *Eur J Anaesthesiol.* 2008; 25:642-47.

Brozovic G, Orsolic N, Rozgaj R, Kasuba V, Knezevic F, Knezevic AH, Benkovic V, Lisicic D, Borojevic N, Dikic D. 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; 51:79-86.

Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Sailaja N, Rahman MF, Reddy JP, Mahboob M, Grover P. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis*. 2006; 21:249-54.

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

Chiu JW, White P. Anestesia venosa não-opiíide. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Anestesia Clínica*. 4ª. ed. São Paulo: Manole; 2004. p.327-44.

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

Colleu-Durel, S, Guitton, N, Nourgalieva, K, Legue, F, Leveque, J, Danic, B, Chenal C. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay): a simple technique to show genomic instability in sporadic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 445-51.

Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*. 1997; 375:183-93.

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

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

Delogu G, Famularo G, Moretti S, De Luca A, Tellan G, Antonucci A, Marandola M, Signore L. Interleukin-10 and apoptotic death of circulating lymphocytes in surgical anesthesia trauma. *J Trauma* 2001; 51:92-7.

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

Dhillon VS, Bhasker R, Kler RS, Husain, SA. Sister chromatid exchange (SCE) studies in breast cancer patients: a follow-up study. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995; 80:115-17.

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

Ebert TJ, Schmid PG. Anestesia inalatória. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Anestesia Clínica.* 4ª. ed. São Paulo: Manole; 2004. p.377-419.

Eger II EI. New inhaled anesthetics. *Anesthesiology.* 1994; 80:906-22.

Eger II EI, Laster MJ, Winegar R, Han C, Gong D. Compound A induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Anesthesiology.* 1997; 86:918-22.

Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 20:23-36.

Fink EJ, Malan TP, Morgan SE, Brown EA, Malcomson M, Brown BR. Quantification of the degradation products of sevoflurane in two CO₂ absorbants during low-flow anesthesia in surgical patients. *Anesthesiology.* 1992 77:1064-69.

Fleisher LA. Avaliação pré-operatória. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, editores. *Anestesia clínica.* 4ª. ed. São Paulo: Manole; 2004. p.969-88.

Goto Y, Ho SL, McAdoo J, Fanning NF, Wang J, Redmond HP, Shorten GD. General versus regional anaesthesia for cataract surgery: effects on neutrophil apoptosis and postoperative pro-inflammatory state. *Eur J Anaesthesiol.* 2000; 17:474-80.

Guilliland HE, Armstrong MA, Carabine U, Terence J, McMurray TJ. The choice of anesthetic maintenance technique influences the antiinflammatory cytokine response to abdominal surgery. *Anaesth Analg.* 1997; 85:1394-8.

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

Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med* 2005; 38:698-710.

Kadioglu E, Sardas S, Erturk S, Ozatamer O, Karakaya AE. Determination of DNA damage by alkaline halo and comet assay in patient under sevoflurane anesthesia. *Toxicol Ind Health.* 2009; 25:205-12.

Karabiyik L, Sardas S, Polat U, Kocaba NA, Karakaya AE. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutat Res.* 2001; 492:99-107.

Kaymak C, Kadioglu E, Basar H, Sardas S. Genoprotective role of vitamin E and selenium in rabbits anaesthetized with sevoflurane. *Hum Exp Toxicol.* 2004; 23:413-19.

Kaymak C, Kadioglu E, Coskun E, Basar H, Basar M. Determination of DNA damage after exposure to inhalation anesthetics in human peripheral lymphocytes and sperm cells in vitro by comet assay. *Hum Exp Toxicol.* 2012; 31:1207-13.

Kharasch ED, 1995. Biotransformation of sevoflurane. *Anesth Analg.* 2012; 81:27-38.

Krause T, Scholz J, Jansen L, Boettcher H, Koch C, Wappler F, Esch S. Sevoflurane anaesthesia does not induce the formation of sister chromatid exchange in peripheral blood lymphocytes of children. *Br J Anaesth.* 2003; 90:233-35.

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

Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75:715-20.

Maia RJF, Fernandes CR. O Alvorecer da Anestesia Inalatória: Uma Perspectiva Histórica. *Rev Bras Anesthesiol* 2002; 52:774-82.

Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Fenech MF. Genome instability is increased in lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome and is correlated with insulin resistance. *Mutat Res.* 2008; 639:55-63.

Morio M, Fujii K, Satoh N, Imai M, Kawakami U, Mizuno T, Kawai Y, Ogasawara Y, Tamura T, Negishi A, Kumagai Y, Kawai T. Reaction of sevoflurane and its degradation products with soda lime – toxicity of the byproducts. *Anesthesiology.* 1992; 77:1155-64.

Naguib M, Samarkonde AH, Bokhamees HS, Magboul MA, el-Bakry AK. Comparative potency of steroidal muscular bloking drugs and isobolographic analysis of the interaction between rocuronium and other aminosteroids. *Br J Anaesth.* 1995; 75:37-42.

Orosz JE, Braz MG, Golim MA, Barreira MA, Fecchio D, Braz LG, Braz JR. Cytokine profile in patients undergoing minimally invasive surgery with balanced anesthesia. *Inflammation*. 2012; 35:1807-13.

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

Riess ML, Eells JT, Kevin LG, Camara AKS, Henry MM, Stowe DF. Attenuation of mitochondrial respiration by sevoflurane in isolated cardiac mitochondria is mediated in part by reactive oxygen species. *Anesthesiology*. 2004; 100:498-505.

Schneemilch CE, Schilling T, Bank U. Effects of general anaesthesia on inflammation. *Baillieres Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004; 18:493-507.

Simms HH, D'amico R. Studies on polymorphonuclear leukocyte bactericidal function III: the role of extracellular matrix proteins. *J Surg Res*. 1997; 72:123-8.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1998; 175:184-91.

Sivaci R, Kahraman A, Serteser M, Sahin DA, Dilek ON. Cytotoxic effects of volatile anesthetics with free radicals undergoing laparoscopic surgery. *Clin Biochem*. 2006; 39:293-98.

Smith I, Nathanson M, White P. Sevoflurane: a long awaited volatile anaesthetic. *Br J Anaesth*. 1996; 76:435-45.

Szyfter K, Szulc R, Mikstacki A, Stachecki I, Rydzanicz M, Jalszynski P. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J Appl Genet*. 2004; 45:369-74.

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.

Torri G. Inhalation anesthetics: a review. *Minerva Anesthesiol.* 2010 76:215-28.

Türkan H, Aydın A, Sayal A, Karahalil B. The effect of sevoflurane and desflurane on markers of oxidative status in erythrocyte. *Toxicol Ind Health.* 2011; 27:181-86.

Vanni SM, Braz JRC, Módolo NSP, Amorin RB, Rodrigues Jr GR. Preoperative combined with intraoperative skin-surface warming avoids hypothermia caused by general anesthesia and surgery. *J Clin Anesth.* 2003, 15:119-25.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quim Nova* 2007; 30:1323-38.

Wiesner G, Schiewe-Langgartner F, Lindner R and Gruber M. Increased formation of sister chromatid exchanges, but not of micronuclei, in anaesthetists exposed to low levels of sevoflurane. *Anaesthesia*, 2008; 63:861-64.

APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A)

I. Identificação do paciente

RG hospitalar: _____

Nome:		
Endereço:		
Cidade:	Bairro:	
CEP:	Estado:	Telefone:

II. Título da Pesquisa: **Avaliação de danos oxidativos no DNA de linfócito e estresse oxidativo no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia balanceada com sevoflurano.**

Pesquisador-Responsável: José Eduardo Bagnara Orosz

III. Explicações do pesquisador ao paciente

Este estudo, que será realizado em pacientes que serão submetidos a cirurgias de nariz ou ouvido, tem como objetivo avaliar se o anestésico sevoflurano que será utilizado na cirurgia, têm algum efeito tóxico sobre o DNA - material genético (o componente que determina as características próprias de cada indivíduo) presente nas células do sangue. Será avaliado se esse anestésico pode causar danos diretamente na estrutura do DNA e se altera a resposta normal do seu organismo à cirurgia e anestesia. O estudo não trará danos ao paciente, pois será utilizado anestésico normalmente empregado em anestесias gerais no Hospital das Clínicas. Desta forma, solicitamos seu consentimento para que sejam coletadas 4 amostras de 8 mL de sangue periférico: a primeira, antes da cirurgia; a segunda e a terceira durante a cirurgia; e a última, um dia após a cirurgia (pós-operatório). A quantidade de sangue que será coletada não afetará sua recuperação pós-cirúrgica, e a quantia é muito pequena em relação ao volume total de sangue do organismo. A coleta

será realizada por profissional experiente, e o procedimento causa apenas o desconforto da picada com risco mínimo ou quase inexistente, já que será utilizado material estéril e descartável. Será realizado, também, um questionário sobre seu estilo de vida e história médica; todas as informações são de 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, o paciente, a qualquer momento, terá total liberdade de recusar ou retirar seu consentimento e sair desta pesquisa, sem que isso lhe traga qualquer tipo de prejuízo. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, mas sempre preservando a identidade do paciente. Ressaltamos, também, que nem os pesquisadores e nem o paciente 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 desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que podem resultar do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de paciente, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

_____, ____ de _____ de ____.

Assinatura _____

APÊNDICE B - Questionário

Avaliação de danos oxidativos no DNA de linfócito e estresse oxidativo no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia balanceada com sevoflurano.

Registro hospitalar do paciente:

Código do indivíduo no estudo:

Data ____/____/____

I – Identificação

01-Nome:

02-Sexo: () masculino () feminino

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

04-Data nascimento ____/____/____

05-Idade:

06-Peso:

07-Altura:

08-IMC (índice de massa corporal):

09-Origem (cidade):

10-Profissão:

I - Informações gerais

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

12-Come frutas? () sim () não

13-Se sim, com que frequência?

14-Come verduras? () sim () não

15- Se sim, com que frequência?

16-Come carboidratos? () sim () não

17-Se sim, com que frequência?

18-Come frituras? () sim () não

19-Se sim, com que frequência?

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

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

22-Se sim, quantas vezes por semana?

23-Fuma? () sim () não

24-Se sim, há quanto tempo?

25-Quantos cigarros/dia?

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

27-Já fumou? () sim () não

28-Há quanto tempo deixou de fumar?

29-Quantos cigarros/dia fumava?

30-Durante quanto tempo fumou?

31-Tipo:

32-Consome bebida alcoólica? () sim () não

33-Se sim, quanto por semana (copos)?:

34-Tipo de bebida (cachaça, cerveja, uísque, vinho, etc)?

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

36-Há quanto tempo deixou de beber?

37-Consome drogas? () sim () não

38-Se sim, qual?

39-Há quanto tempo?

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

41-Se sim, qual (produtos de limpeza, agrotóxicos, gasolina, tinta)?

42-Há quanto tempo?

43-Foi submetido a raio X recentemente (dentário ou antes da cirurgia)?

() sim () não

44-Quando?

45-Sabe quantas chapas de RX foram feitas?

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

47-Se sim, qual?

48-Há quanto tempo?

49-Tem alguma doença (asma, hipertensão, diabetes, hepatite, lúpus, artrite, câncer)?

() sim () não

50-Qual?

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

52-Se sim, qual?

53-Há quanto tempo?

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

55-Se sim, qual?

III - História Médica

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

57-Se sim, qual?

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

() sim () não

59-Se sim, qual (is)?

60-Frequência/dia:

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

62-Se sim, qual (is)?

63-Frequência/dia:

64-Há quanto tempo?

65-Tomou alguma medicação no último mês (remédio para pressão, antibiótico,

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 à anestesia? () sim () não

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

78-Há quanto tempo?

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

ANEXO

Manuscrito enviado para publicação

> From: mutagen@kcl.ac.uk
>
> Your manuscript entitled "Sevoflurane anesthesia does not change redox status in patients undergoing surgical procedure" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Mutagenesis.
>
> Your manuscript ID is Mutage-13-154.
>
> Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage> and edit your user information as appropriate.
>
> You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage>.
>
> Thank you for submitting your manuscript to Mutagenesis.
>
> Yours sincerely,
> Rosemary Wilkinson
> Mutagenesis Editorial Office

Manuscript submitted to Mutagenesis



Reviewers should submit their review online at <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage> where full instructions are provided.

Sevoflurane anesthesia does not change redox status in patients undergoing surgical procedure

Journal:	<i>Mutagenesis</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Orosz, Jose Eduardo; Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Anestesiologia Braz, Leandro; Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Anestesiologia Ferreira, Ana; Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Clínica Médica Amorim, Rosa; Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Anestesiologia Salvadori, Daisy Maria; Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Patologia Yeum, Kyung-Jin; Konkuk University, Braz, José Reinaldo; Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Univ Estadual Paulista, Anestesiologia Braz, Mariana; Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Anestesiologia
Keywords:	Comet assay, oxidative DNA damage

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mutage.oupjournals.org/>

Sevoflurane anaesthesia does not change redox status in patients undergoing surgical procedure

Genotoxicity and oxidative stress in anaesthesia

José Eduardo Bagnara Orosz¹, Leandro Gobbo Braz¹, Ana Lucia Anjos Ferreira², Rosa Beatriz Amorim¹, Daisy Maria Favero Salvadori³, Kyung-Jin Yeum⁴, José Reinaldo Cerqueira Braz¹, Mariana Gobbo Braz^{1,*}

¹Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Anestesiologia

²Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Clínica Médica

³Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Patologia

⁴College of Biomedical and Health Sciences, Konkuk University, Chungcheongbuk-do, South Korea

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +55 14 3880 1650; Fax: +55 14 3811 6222; Email: mgbraz@hotmail.com

Abstract

Despite of the anaesthetics effectiveness and safety in clinical use, there are some questions to be answered concerning their genotoxicity and effects on cellular redox balance. Only a few studies have evaluated DNA damage or oxidative stress in patients during surgical procedure with the volatile anaesthetic sevoflurane. To further understand the possible toxic effects of this agent, the current study was designed to evaluate oxidative DNA damage, lipid peroxidation and plasma antioxidant defense during and after general balanced anaesthesia maintained with sevoflurane in 15 adult patients without comorbidities who underwent elective minor surgery. Venous blood samples were collected at baseline-before anaesthesia, after anaesthesia induction and immediately before surgery, 2 h after the beginning of anaesthesia and on the next day of surgery. DNA damage was evaluated in peripheral lymphocytes using the comet assay to recognize single- and double-strand breaks, alkali-labile sites, and oxidized purines and pyrimidines. Plasma malondialdehyde (MDA) and antioxidant defense were determined by a fluorometry. Results showed no increase of oxidized DNA damage among the time points evaluated. Similarly, balanced anaesthesia with sevoflurane altered neither lipid peroxidation nor plasma antioxidant defense during or after anaesthesia. In conclusion, the present study showed, for the first time, that sevoflurane does not induce oxidation in genetic material or lipids, or alter plasma redox state during balanced anaesthesia in patients without comorbidities and undergoing minimally invasive surgeries.

Keywords: Genotoxicity test; Oxidative stress; Inhalation Anaesthetics; Minor surgery

Introduction

Halogenated gases are probably the most used anaesthetics, alone or as part of a balanced anaesthesia. They are small, lipophilic molecules that can pass through cell membranes and result in mitochondrial respiration depression at several oxidative phosphorylation steps. Despite their effectiveness and safety demonstrated over the last decades, there are still some questions to be answered, concerning their genotoxicity and cellular redox balance in anaesthetised patients. Experimental (1,2) and epidemiological (3,4) studies have suggested that exposure to inhalation anaesthetics may lead to DNA damage.

Among the inhaled anaesthetics, sevoflurane has low blood-gas partition coefficient, which allows rapid induction and awakening (5). It was identified as a potent volatile anaesthetic in the late 1960s, but it was not used in clinical practice until 1995 due to questions regarding the extent of its degradation in the presence of CO₂ absorbents (6). Compound A (fluormethyl 2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl) vinyl ether) is the major degradation product of sevoflurane, formed in the anaesthesia circuit (7). It is an alkylating agent (8) that increases the frequency of sister chromatid exchange (SCE) in Chinese hamster ovary cells (CHO) (9), but it was not mutagenic in the Ames test (10).

The genotoxic and mutagenic potential of sevoflurane have been evaluated in vitro (2,11), in animals (12,13), and in humans (14-16), with conflicting results. However, there are few studies evaluating genotoxic effect of sevoflurane in clinical. Most of these studies include patients with mild systemic disease, and/or patients who underwent invasive or major surgeries, and some of them evaluated genotoxicity only after anaesthesia and not during surgical procedure.

It is known that free radicals, reactive oxygen species – ROS, and reactive nitrogen species – RNS are constantly produced as a normal consequence of aerobic metabolism and exert physiological actions. Natural scavenging systems neutralize ROS and RNS avoiding

oxidative damage in vulnerable targets, such as membrane unsaturated fatty acids and DNA bases (17). When an imbalance between oxidants and antioxidants occurs, an excess of free radicals is formed, leading to oxidation of lipids, nucleic acids and proteins, causing the so-called oxidative stress (18). Sevoflurane undergoes a moderate degree of metabolism (2% to 5%), catalyzed by cytochrome P450 (7), which could directly trigger the generation of peroxynitrite and increase intracellular peroxides and nitric oxide (19). Additionally, sevoflurane may induce DNA lesions, which seem to be strictly associated with cellular apoptosis (20).

Up to now, no previous studies have investigated oxidative damage in DNA, lipid peroxidation and the global antioxidant defense in patients without comorbidities before, during and after minor surgeries under sevoflurane anaesthesia. Therefore, the present study was designed to evaluate the genotoxic and oxidative stress effects of general balanced anaesthesia with sevoflurane in adult patients without comorbidities who underwent elective minimally invasive surgery.

Materials and methods

Patients

This study protocol was approved by the Ethical Committee for Human Research from the Botucatu Medical School (UNESP) (protocol 3167-2009-B). After assign the informed consent, all subjects answered a detailed questionnaire about their lifestyle, health status and previous exposure to environmental pollutants. It was enrolled in this study 15 patients of both genders, aged from 18 to 44 years old, with normal body mass index ($18.5 - 24.9 \text{ kg/m}^2$), who were scheduled for elective otorhinological surgeries, and classified by the American Society of Anesthesiologists (ASA) as physical status I patients (healthy patient with no disease other than a surgical abnormality). Smokers, alcoholics, obese, and those subjects who had recently (within about 3 months) received radiation, medication, or vitamin and/or antioxidant supplements were excluded from the study.

General anaesthesia procedure

Standard clinical monitoring was performed as following: electrocardiogram, peripheral oxygen saturation (SpO_2), non-invasive arterial blood pressure (systolic and diastolic), end-tidal CO_2 (PETCO_2) and end-tidal sevoflurane. All patients received active skin surface warming with a specific blanket on the lower limbs from a warming device (WarmTouch, model 5200, Mallinckrodt Medical, Hazelwood, MO) after anaesthesia induction until the end of the surgery to prevent hypothermia. Patients were premedicated intravenously (IV) with the benzodiazepine midazolam (3 mg; Dormonid, Roche, Brazil) in the operating room. Anaesthesia was induced using the opioid fentanyl ($5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ IV; Fentanil, Janssen, Brazil), the hypnotic propofol (2 mg/kg IV; Diprivan 1%, AstraZeneca, Milan, Italy) and the neuromuscular blocker rocuronium (0.6 mg/kg IV; Esmeron, Organon, Oss, The

1
2
3 Netherlands), and maintained with sevoflurane (Sevorane, Abbott, São Paulo, Brazil)
4
5 inhalation at approximately 1.0 minimum alveolar concentration (MAC), equivalent to 1.9%.
6
7 The lungs were mechanically ventilated (Primus anaesthesia machine, Dräger Medical,
8
9 Germany) using the volume-controlled mode with a tidal volume of 8 ml/kg of 40% oxygen
10
11 (0.5 l/min) in air (1.5 l/min) and a respiratory rate of 10-12 breaths/min to maintain the
12
13 $P_{ET}CO_2$ concentration at 30-35 mm Hg. A thermocouple sensor (Mon-a-therm 90044,
14
15 Mallinckrodt Medical, Juarez, Mexico) was used for intraoperative distal esophageal
16
17 temperature measure following tracheal intubation. The probe temperature was attached to
18
19 electronic thermometer (Thermistor 400, model 6150, Mallinckrodt Medical, St. Louis, MO).
20
21 The anaesthesia effectiveness was monitored by assessing the hemodynamic responses during
22
23 maintenance. Additional doses of fentanyl (2 µg/kg) and rocuronium (0.2 mg/kg) were
24
25 administered to assure that the patients were adequately anaesthetised. At the end of the
26
27 surgery, ondansetron (0.1 mg/kg IV; Nauseadron, Cristália, São Paulo, Brazil) was used for
28
29 antiemesis, and tramadol (1 mg/kg; Tramal, Pfizer, São Paulo, Brazil) for postoperative
30
31 analgesia. After awakening, patients were taken to the post-anaesthesia care unit (PACU).
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Blood sampling**

42 Venous blood samples were drawn from all patients at four time points as follows:
43 before premedication and induction of anaesthesia - baseline (t0); after anaesthesia induction
44 and immediately before surgery (t1); 2 h after the beginning of anaesthesia (t2); and on the
45
46 next day of surgery (t3) (Figure 1). Blood was collected in EDTA tubes, and all samples were
47
48 coded and blindly analysed. Immediately after venipuncture, lymphocytes were isolated and
49
50 freshly used for the comet assay. Plasma was separated by centrifugation and stored at -80°C
51
52 until assayed.
53
54
55
56
57
58
59
60

Oxidative DNA damage analysis using the alkaline comet assay

All steps were performed under indirect light. The comet assay was conducted according to Singh *et al.* (21) and Tice *et al.* (22) with slight modifications (23). Lymphocytes (10 µl) were added to 120 µl of 0.5% low-melting-point agarose at 37°C and then layered on slides with precoated 1.5% normal-agarose. The slides were protected with a coverslip and left at 4°C for 5 min to provide the agarose solidification. After removing of coverslips the slides were immersed in cold buffer (1% Triton X-100, 2.5M NaCl, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO and 100 mM EDTA) for 2 h lysing. For detection of oxidized bases, nucleoids were incubated for 30 min with 50 µl of formamidopyrimidine-DNA glycosilase (Fpg) or with 50 µl of endonuclease III (endo III) (New England Biolabs, Ipswich, MA) at 37°C. Other two slides with 50 µl of enzyme buffer only were prepared as control. After 5 min washing in phosphate-buffered saline (PBS) the slides were immersed in alkaline buffer (0.3 M NaOH and 1 mM EDTA at pH > 13) in a horizontal tank for 40 min to allow DNA unwinding before the 30-min period electrophoresis conducted at 300 mA and 25 V. Before fixing with absolute ethanol, the slides were neutralized for 20 min with 0.4 M Tris (pH 7.5), and stored at 4°C. For staining purposes, the ethidium bromide (50 µl at 20 µg/ml) was added and the slides were analysed with 400X magnification in a fluorescent microscope, to score images from 100 nucleoids (two replicate samples) per each patient per time point per treatment using an automated image analysis system (Comet Assay II, Perceptive Instruments, Haverhill, Suffolk, UK). The tail intensity (% DNA in the tail) was used to estimate the extent of DNA damage. Negative and positive controls were used throughout the experiments.

Lipid peroxidation

Malondialdehyde (MDA) is a low molecular weight aldehyde, which was used as a lipid peroxidation biomarker. For each patient and time point, 100 µl plasma aliquots were mixed in duplicate with 500 µl of trichloroacetic acid (TCA) and 10 µl of butylated hydroxytoluene (BHT). Then, vortexed and incubated at 98°C for 20 min. Samples were placed to other tubes, which were cooled on ice and centrifuged at 14000 rpm for 10 min at 4°C. After adding 50 µl of KOH and 650 µl of 2-thiobarbituric acid (TBA) to 300 µl of the supernatant, each tube was vortexed and again maintained at 98°C for 45 min, and then cooled on ice. The lipid peroxidation was monitored from a calibration curve for 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) and MDA was detected by fluorescence using the microplate reader Wallac Victor X2 (Perkin-Elmer, Boston, MA), and it was expressed as µM.

Antioxidant defense

The plasma antioxidant defense was quantified fluorometrically as described by Aldini *et al.* (24) with some modifications (25). Briefly, the 2,2'-azobis (4-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used as a peroxy radical initiator, and the plasma defense was estimated by comparing the area under the curve relative to the oxidation kinetics of phosphatidylcholine (PC) liposome control suspension, used as the reference biological matrix. After adding 100 µl of plasma per patient per time point and 300 µl of cold phosphate buffer – PBS (50 mM, pH 7.4), BODIPY 581/591 (100 µl) was incorporated into the PC liposomes by vortexing gently for 10 sec at low speed. A 10 min incubation at 37°C followed. Next, 420 µl of cold PBS and 80 µl of the radical initiator AAPH (20 mM) were added into the reaction by vortexing at low speed. External standard curves were obtained by oxidation kinetics of a control solution in the presence of PC (100 µl). The oxidation of each

sample was monitored by a green fluorescent oxidation product of BODIPY 581/591 ($\lambda_{ex} = 500$, $\lambda_{em} = 520$ nm, slit 10 nm) using the microplate reader Wallac Victor X2 (Perkin-Elmer, Boston, MA). For every assay performed samples for each subject and time point were analysed within the same run, in triplicates. The results represent the percentage of inhibition of BODIPY 581/591 oxidation in plasma, as compared to that occurring in the external standard samples.

Statistical analysis

Since oxidative damage (detected in DNA and lipids) and antioxidant defense data did not show a normal distribution, the non-parametric Friedman test was used to compare the time points evaluated. Oxidative DNA damage, MDA and antioxidant defense data were expressed as medians, 25th and 75th percentiles. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

None of the patients had surgical complications, and all of them were discharged from the hospital according to the guidelines established for their surgical procedure.

Regarding to the level of DNA damage (strand breaks and alkali-labile sites, and oxidized bases), no statistically significant difference was detected among the sampling times ($t_0 = t_1 = t_2 = t_3$). Figures 2, 3 and 4 present the amount of single- and double-strand breaks and alkali-labile sites, oxidized purines, and oxidized pyrimidines, respectively.

Similarly, sevoflurane anaesthesia did not induce lipid peroxidation (Figure 5). The only significant increase ($P < 0.05$) was detected on the next day of surgery (t_3) when compared with 2 h after the beginning of anaesthesia (t_2).

Figure 6 shows the results of plasma antioxidant defense. No significant alteration was also detected during or after anaesthesia ($P > 0.05$).

Discussion

The main findings in the present study are that balanced anaesthesia with sevoflurane does not lead to oxidative DNA damage in peripheral lymphocytes, has no influence in lipid peroxidation and does not alter plasma redox state during or after anaesthesia in patients without comorbidities undergoing minimally invasive surgeries.

There are a few and controversial results concerning the sevoflurane genotoxicity. This volatile anaesthetic was capable of inducing DNA damage in cells (lymphocytes and sperm cells) exposed *vitro* for 5 min to concentrations between 0.1 mM and 100 mM (11). Contrarily, it was also reported absence of genotoxicity in peripheral lymphocytes exposed to 1 mM or 10 mM of sevoflurane for 10 or 30 min, at different temperatures (2). In animal models, studies have only evaluated genotoxic effect after sevoflurane inhalation, but not during anaesthesia (12,13).

Anaesthetised children undergoing minor surgical procedures have no increased formation of SCE after sevoflurane anaesthesia (15). Recently, measurement of DNA damage was evaluated in patients scheduled for elective open colorectal, before anaesthesia induction and 24 h after the end of surgery with sevoflurane (26). The authors did not observe increase of DNA breaks in leukocytes from patients anaesthetised with sevoflurane with 30% oxygen or 80% oxygen, but only when sevoflurane was associated with 70% nitrous oxide. Therefore, these data support our findings showing that sevoflurane anaesthesia associated with oxygen is unlikely to be genotoxic in patients undergoing surgical procedures. It has to be noted that all the other drugs used during anaesthesia and for the post-operative analgesia have not been reported as genotoxics (27,28).

We emphasize that strict criteria was followed in the current study, and population studied included only adult patients without comorbidities of both genders, with normal body mass index and with no other associated disease or systemic disturbances. Differently,

1
2
3 increased strand breaks and alkaline labile sites were detected in patients without or with
4 comorbidities (ASA II), aged from 20 to 66 years, undergoing more invasive lower
5 abdominal surgeries with sevoflurane, when evaluated 60 min after the start of anaesthesia
6 until the following first day of surgery (14). Similar results were reported by Kadioglu *et al.*
7 (16), when they evaluated lymphocytes from ASA II or III female patients, aged 33 to 65
8 years old, with breast cancer, who underwent surgery with sevoflurane anaesthesia (1% -
9 1.5%). These patients presented more DNA damage than the control group, even before the
10 anaesthesia. It is known that cancer patients have an increased susceptibility to mutations,
11 and a high frequency of SCE has been reported in breast cancer women before surgery, as
12 well as increased DNA damage in lymphocytes, detected by comet assay, suggesting a
13 genomic instability in sporadic breast cancer patients (29,30).

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
The previous studies did not evaluate DNA base oxidation. The original alkaline comet assay measures DNA breaks and has been widely used in both in vitro and in vivo studies, including human biomonitoring. There are many enzymes involved in DNA repair that have specific activity against certain lesions, introducing a break at sites of base damage. Thus, the inclusion of these enzymes increases sensitivity and specificity of DNA damage analysis (31). To the best of our knowledge, this study showed, for the first time, the absence of DNA damage, including oxidized bases recognized by Fpg or endo III, during and after sevoflurane anaesthesia in patients without comorbidities undergoing minimally invasive surgeries. Alleva *et al.* (32) have observed increased oxidized DNA bases 15 min after anaesthesia induction with propofol and atracurium, but not 24 h after surgery conducted with sevoflurane anaesthesia, in physical status ASA I and II patients scheduled for hip arthroplasty procedures. The increased oxidative damage observed by the authors may be due to the absence of a potent analgesic agent such as fentanyl, usually associated for the anaesthesia induction. It is known that laryngoscopy for tracheal intubation is a painful

maneuver, strictly related to an intense release of pro-inflammatory stress hormones (33), suggesting an oxidative stress. In contrast, we did not find any alterations in strand breaks, alkali-labile sites or oxidized DNA bases after anaesthesia induction using fentanyl, propofol and rocuronium and immediately before surgery. Moreover, we have previously found a significant reduction in oxidized purines when patients were anaesthetised exclusively with the intravenous propofol (23). The antioxidant activity of this anaesthetic has been widely reported (34,35).

Our findings also demonstrated no significant change of MDA production during anaesthesia, and are in accordance with previous studies, which found stable MDA levels in patients scheduled for hysterectomy or abdominal surgery under sevoflurane anaesthesia (35,36). After 6 h and 24 h of laparoscopic surgery, MDA and protein carbonyl content were higher in patients under desflurane, but not under sevoflurane anaesthesia (37). We observed increased lipid peroxidation one day after surgery when compared with the period during anaesthesia. We have previously shown that these patients have increased release of pro-inflammatory cytokine IL-6 one day after surgery, but not under sevoflurane anaesthesia (38). It is known that oxidative stress and inflammation are linked processes. Therefore, we could suppose that alterations on the following day of surgery may be a result of the surgical trauma, rather than anaesthetics themselves.

No changes in MDA or in the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) were also detected in a swine model under mechanical ventilation during sevoflurane anaesthesia (34). Furthermore, no changes in oxidative stress parameters, such as the erythrocytes GSH-Px or catalase activities have been detected in rats 12 h after the last exposure to sevoflurane (4.0%) for 60 min during 5 consecutive days (39).

On the other hand, increased zinc and GSH-Px content, with a decrease of SOD 1 h after sevoflurane anaesthesia has already been reported (36). A reduction of GSH on the first

1
2
3 post-operative day, but not during sevoflurane anaesthesia, was also described (32). In our
4
5 study, the patients did not present changes in the systemic antioxidant defense, indicating a
6
7 balance between free radicals production and scavenging during and after the surgical
8
9 procedure.
10

11
12 In conclusion, our findings pointed out that balanced anaesthesia maintained with
13
14 sevoflurane does not induce oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and does not change
15
16 the antioxidant defense during or after surgery. Therefore, sevoflurane anaesthesia seems to
17
18 be safe for DNA and redox status in patients without comorbidities undergoing elective
19
20 minimally invasive surgeries.
21

22 23 24 25 26 **Funding**

27
28 This work was supported by the grant #2009/51110-5, São Paulo Research
29
30 Foundation (FAPESP), Brazil.
31

32 33 34 35 36 **Acknowledgements**

37
38 The authors thank Damiana T. Pierine (UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu,
39
40 SP, Brazil) for technical help and Professor Lídia R. de Carvalho (UNESP – Univ Estadual
41
42 Paulista, Botucatu, SP, Brazil) for statistical advice.
43
44

45
46
47 Conflict of interest statement: None declared.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Jalszynski, P., Kujawski, M., Wasowicz, M., Szulc, R. and Szyfter, K. (1999) Genotoxicity of inhalation anaesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutat. Res.*, **439**, 199-206.
2. Szyfter, K., Szulc, R., Mikstacki, A., Stachecki, I., Rydzanicz, M. and Jalszynski, P. (2004) Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J. Appl. Genet.*, **45**, 369-374.
3. Bilban, M., Jakopin, C. B. and Ogrinc, D. (2005) Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **8**, 60-64.
4. Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P. V., Sailaja, N., Rahman, M. F., Reddy, J. P., Mahboob, M. and Grover, P. (2006) Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis*, **21**, 249-254.
5. Torri, G. (2010) Inhalation anaesthetics: a review. *Minerva Anesthesiol.*, **76**, 215-228.
6. Smith, I., Nathanson, M. and White, P. (1996) Sevoflurane: a long awaited volatile anaesthetic. *Br. J. Anaesth.*, **76**, 435-445.
7. Kharasch, E. D. (1995) Biotransformation of sevoflurane. *Anesth. Analg.*, **81**, 27-38.
8. Fink, E. J., Malan, T. P., Morgan, S. E., Brown, E. A., Malcomson, M. and Brown, B. R. (1992) Quantification of the degradation products of sevoflurane in two CO₂ absorbants during low-flow anaesthesia in surgical patients. *Anesthesiology*, **77**, 1064-1069.
9. Eger II, E. I., Laster, M. J., Winegar, R., Han, C. and Gong, D. (1997) Compound A induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Anesthesiology*, **86**, 918-922.

10. Morio, M., Fujii, K., Satoh, N., Imai, M., Kawakami, U., Mizuno, T., Kawai, Y., Ogasawara, Y., Tamura, T., Negishi, A., Kumagai, Y. and Kawai, T. (1992) Reaction of sevoflurane and its degradation products with soda lime – toxicity of the byproducts. *Anesthesiology*, **77**, 1155-1164.
11. Kaymak, C., Kadioglu, E., Coskun, E., Basar, H. and Basar, M. (2012) Determination of DNA damage after exposure to inhalation anaesthetics in human peripheral lymphocytes and sperm cells in vitro by comet assay. *Hum. Exp. Toxicol.*, **31**, 1207–1213.
12. Kaymak, C., Kadioglu, E., Basar, H. and Sardas, S. (2004) Genoprotective role of vitamin E and selenium in rabbits anaesthetized with sevoflurane. *Hum. Exp. Toxicol.*, **23**, 413-419.
13. Brozovic, G., Orsollic, N., Rozgaj, R., Kasuba, V., Knezevic, F., Knezevic, A. H., Benkovic, V., Lisicic, D., Borojevic, N. and Dikic, D. (2010) 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.*, **51**, 79-86.
14. Karabiyik, L., Sardas, S., Polat, U., Kocaba, N. A. and Karakaya, A. E. (2001) Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutat. Res.*, **492**, 99-107.
15. Krause, T., Scholz, J., Jansen, L., Boettcher, H., Koch, C., Wappler, F. and Esch, S. (2003) Sevoflurane anaesthesia does not induce the formation of sister chromatid exchange in peripheral blood lymphocytes of children. *Br. J. Anaesth.*, **90**, 233-235.
16. Kadioglu, E., Sardas, S., Erturk, S., Ozatamer, O. and Karakaya, A. E. (2009) Determination of DNA damage by alkaline halo and comet assay in patient under sevoflurane anaesthesia. *Toxicol. Ind. Health.*, **25**, 205-212.

- 1
2
3 17. Beretta, G., Aldini, G., Facino, R. M., Russell, R. M., Krinsky, N. I. and Yeum, K. J.
4
5 (2006) Total antioxidant performance: A validated fluorescence assay for the
6
7 measurement of plasma oxidizability. *Anal. Biochem.*, **354**, 290-298.
8
9
10 18. Baysal, Z., Cengiz, M., Ozgonul, A., Cakir, M., Celik, H. and Kocyigit, A. (2009)
11
12 Oxidative status and DNA damage in operating room personnel. *Clin. Biochem.*, **42**, 189-
13
14 193.
15
16 19. Brozovic, G., Orsolic, N., Knezevic, F., Knezevic, A. H., Benkovic, V., Vrdoljak, D. V.
17
18 and Saric, A. (2008) Evaluation of DNA damage in vivo induced by combined
19
20 application of cisplatin and sevoflurane. *Eur. J. Anaesthesiol.*, **25**, 642-647.
21
22 20. Matsuoka, H., Kurosawa, S., Horinouchi, T., Kato, M. and Hashimoto, M. (2001)
23
24 Inhalation anaesthetics induce apoptosis in normal peripheral lymphocytes in vitro.
25
26 *Anesthesiology*, **95**, 1467-1472.
27
28 21. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988) A simple technique for
29
30 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-
31
32 191.
33
34 22. Tice, R. R., Andrews, P. W., Hirai, O. and Singh, N. P. (1991) The single cell gel (SCG)
35
36 assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells.
37
38 *Adv. Exp. Med. Biol.*, **283**, 157-164.
39
40 23. Braz, M. G., Braz, L. G., Mazoti, M. A., Pinotti, M. F., Pardini, M. I., Braz, J. R. and
41
42 Salvadori, D. M. (2012) Lower levels of oxidative DNA damage and apoptosis in
43
44 lymphocytes from patients undergoing surgery with propofol anaesthesia. *Environ. Mol.*
45
46 *Mutagen.*, **53**, 70-77.
47
48 24. Aldini, G., Yeum, K. J., Russell, R. M. and Krinsky, N. I. (2001) A method to measure
49
50 the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic. Biol.*
51
52 *Med.*, **31**, 1043-1050.
53
54
55
56
57
58
59
60

25. Braz, M. G., Braz, L. G., Braz, J. R., Pierine, D. T., Correa, C. R., Ferreira, A. L.,
Carvalho, L. R., Yeum K. J. and Salvadori, D. M. (2013) Comparison of oxidative stress
in ASA physical status I patients scheduled for minimally invasive surgery under
balanced or intravenous anaesthesia. *Minerva Anesthesiol.*, **79**, 1030-1038.
26. Chen, Y., Liu, X., Cheng, C. H., Gin, T., Leslie, K., Myles, P. and Chan, M. T. (2013)
Leukocyte DNA damage and wound infection after nitrous oxide administration: a
randomized controlled trial. *Anesthesiology*, **118**, 1322-1331.
27. Brambilla, G. and Martelli, A. (2009) Genotoxicity and carcinogenicity studies of
analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. *Pharmacol. Res.*, **60**, 1-17.
28. Braz, M. G., Braz, L. G., Barbosa, B. S., Giacobino, J., Orosz, J. E., Salvadori, D. M. and
Braz, J. R. (2011) DNA damage in patients who underwent minimally invasive surgery
under inhalation or intravenous anaesthesia. *Mutat Res.*, **726**, 251-254.
29. Dhillon, V. S., Bhasker, R., Kler, R. S. and Husain, S. A. (1995) Sister chromatid
exchange (SCE) studies in breast cancer patients: a follow-up study. *Cancer Genet.*
Cytogenet., **80**, 115-117.
30. Colleu-Durel, S., Guitton, N., Nourgalieva, K., Legue, F., Lévêque, J., Danic, B. and
Chenal, C. (2004) Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay): a simple
technique to show genomic instability in sporadic breast cancer. *Eur. J. Cancer*, **40**, 445-
451.
31. Dusinska, M. and Collins, A. R. (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-
environment interactions. *Mutagenesis*, **23**, 191-205.
32. Alleva, R., Tomasetti, M., Solenghi, M. D., Stagni, F., Gamberini, F., Bassi, A.,
Fornasari, P. M., Fanelli, G. and Borghi, B. (2003) Lymphocyte DNA damage precedes
DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia.
Mutagenesis, **18**, 423-428.

- 1
2
3 33. Kurosawa, S. and Kato, M. (2008) Anaesthetics, immune cells, and immune responses. *J.*
4
5 *Anesth.*, **22**, 263-277.
6
7 34. Allaouchiche, B., Debon, R., Goudable, J., Chassard, D. and Duflo, F. (2001) Oxidative
8
9 stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anesth. Analg.*, **93**,
10
11 981-985.
12
13 35. Cinnella, G., Vendemiale, G., Dambrosio, M., Serviddio, G., Pugliese, P. L., Aspromonte,
14
15 G. and Altomare, E. (2007) Effect of propofol, sevoflurane and desflurane on systemic
16
17 redox balance. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, **20**, 585-593.
18
19 36. Türkan, H., Aydin, A., Sayal, A. and Karahalil, B. (2011) The effect of sevoflurane and
20
21 desflurane on markers of oxidative status in erythrocyte. *Toxicol. Ind. Health*, **27**, 181-
22
23 186.
24
25 37. Sivaci, R., Kahraman, A., Serteser, M., Sahin, D. A. and Dilek, O. N. (2006) Cytotoxic
26
27 effects of volatile anaesthetics with free radicals undergoing laparoscopic surgery. *Clin.*
28
29 *Biochem.*, **39**, 293-298.
30
31 38. Orosz, J. E., Braz, M.G., Golim, M. A., Barreira, M. A., Fecchio, D., Braz, L. G. and
32
33 Braz, J. R. (2012) Cytokine profile in patients undergoing minimally invasive surgery
34
35 with balanced anaesthesia. *Inflammation*, **35**, 1807-1813.
36
37 39. Bezerra, F. J., Vale, N. B., Macedo, B. O., Rezende, A. A. and Almeida, M. G. (2010)
38
39 Evaluation of antioxidant parameters in rats treated with sevoflurane. *Rev. Bras.*
40
41 *Anesthesiol.*, **60**, 162-169.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Fig. 1. Blood samples collected from patients without comorbidities undergoing elective minor surgery. t0: before premedication and induction of anaesthesia (baseline), t1: after anaesthesia induction and immediately before surgery, t2: 2 h after the beginning of anaesthesia, and t3: on the next day of surgery.

Fig. 2. DNA damage, evaluated by alkaline comet assay, in lymphocytes from patients undergoing surgery with sevoflurane anaesthesia among the time points. t0: before premedication and induction of anaesthesia (baseline), t1: after anaesthesia induction and immediately before surgery, t2: 2 h after the beginning of anaesthesia, and t3: on the next day of surgery. Data are expressed as median and percentiles. $P = 0.49$.

Fig. 3. Oxidative DNA damage, recognized by Fpg-sensitive sites, in lymphocytes from patients undergoing surgery with sevoflurane anaesthesia among the time points. t0: before premedication and induction of anaesthesia (baseline), t1: after anaesthesia induction and immediately before surgery, t2: 2 h after the beginning of anaesthesia, and t3: on the next day of surgery. Data are expressed as median and percentiles. $P = 0.20$.

Fig. 4. Oxidative DNA damage, recognized by endo III-sensitive sites, in lymphocytes from patients undergoing surgery with sevoflurane anaesthesia among the time points. t0: before premedication and induction of anaesthesia (baseline), t1: after anaesthesia induction and immediately before surgery, t2: 2 h after the beginning of anaesthesia, and t3: on the next day of surgery. Data are expressed as median and percentiles. $P = 0.88$.

Fig. 5. Plasma malondialdehyde (MDA) in patients undergoing surgery with sevoflurane anaesthesia among the time points. t0: before premedication and induction of anaesthesia (baseline), t1: after anaesthesia induction and immediately before surgery, t2: 2 h after the beginning of anaesthesia, and t3: on the next day of surgery. Data are expressed as median and percentiles. * $P = 0.038$: t3 > t2.

Fig. 6. Plasma antioxidant defense from patients undergoing surgery with sevoflurane anaesthesia among the time points. t0: before premedication and induction of anaesthesia (baseline), t1: after anaesthesia induction and immediately before surgery, t2: 2 h after the beginning of anaesthesia, and t3: on the next day of surgery. Data are expressed as median and percentiles. $P = 0.31$.

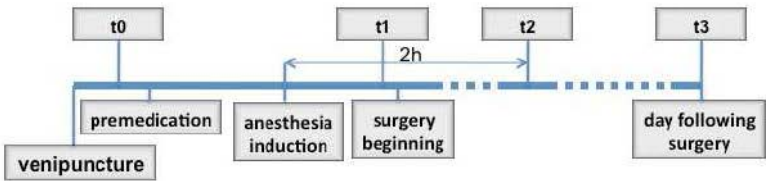


Fig. 1.

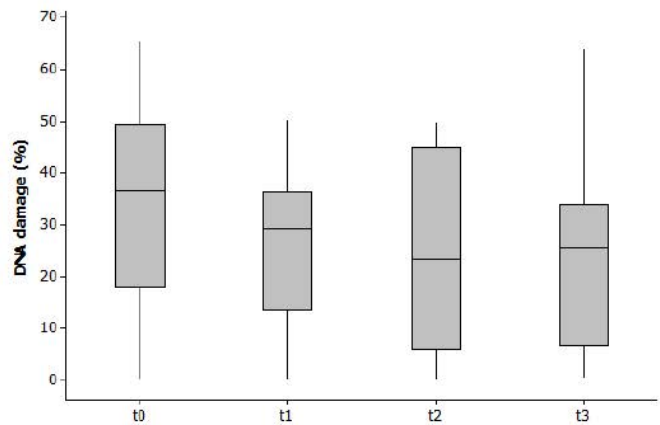


Fig. 2.

Peer Review

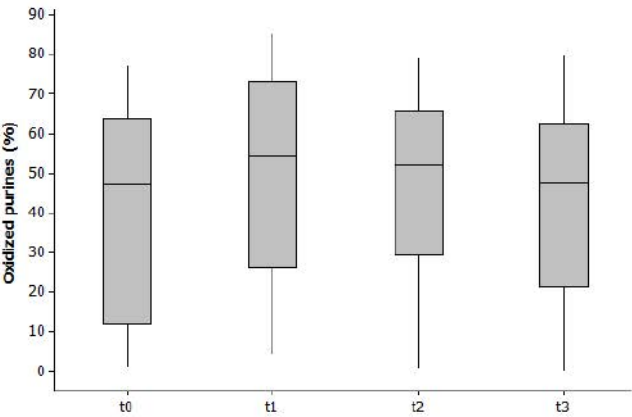


Fig. 3.

Peer Review

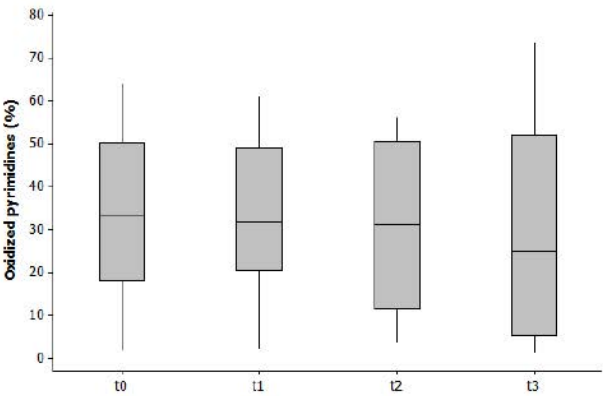


Fig. 4.

Peer Review

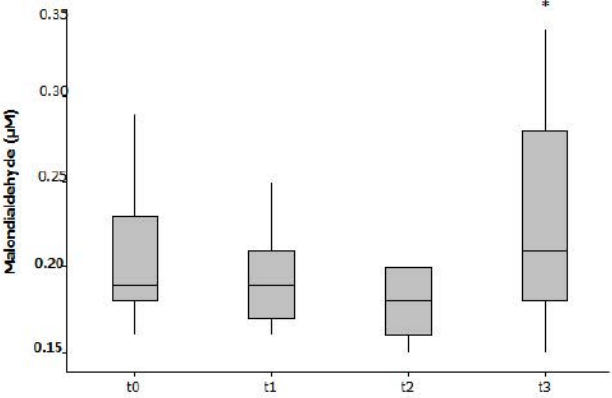


Fig. 5.

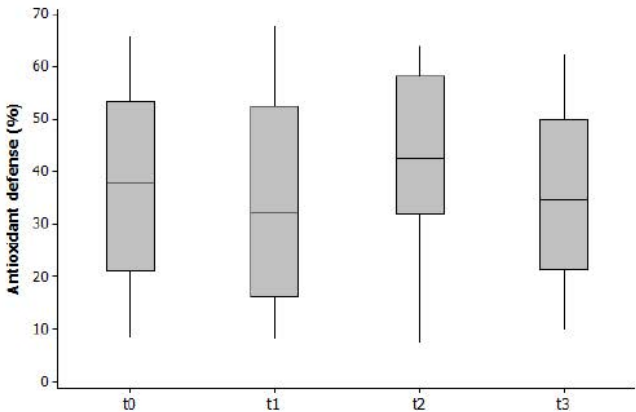


Fig. 6.

Peer Review