

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO MESQUITA FILHO”

Faculdade de Medicina de Botucatu

Projeto de Pesquisa

**“Avaliação de instabilidade genética e citotoxicidade em profissionais
expostos aos resíduos de gases anestésicos que atuam em hospital
veterinário”**

Candidata ao Mestrado: Drielle Baptista dos Santos Figueiredo

Orientadora: Mariana Gobbo Braz

Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia

Botucatu - SP

2017

RESUMO

Os anestésicos inalatórios têm sido utilizados nas salas operatórias (SO) há muito tempo tanto para cirurgias humanas quanto para cirurgias veterinárias. Assim, os profissionais que atuam nas SO, mundialmente, estão expostos aos resíduos dos gases anestésicos (RGA) diariamente durante anos/décadas. A literatura tem mostrando que a exposição ocupacional aos RGA pode ter efeitos deletérios nos profissionais expostos. Considerando-se que há escassez de dados na literatura sobre os possíveis efeitos da exposição ocupacional aos RGA em profissionais atuantes em hospital veterinário, os quais são muito expostos aos anestésicos halogenados, o presente estudo tem como objetivo, de forma inédita, avaliar a instabilidade genética e a citotoxicidade nesses profissionais. Assim, o estudo será realizado em profissionais expostos aos RGA no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, onde serão mensuradas, pela primeira vez, as concentrações dos RGA em SO. Haverá coleta de material biológico (células esfoliativas bucais, sangue periférico e urina) de 30 profissionais expostos aos RGA e de 30 voluntários que não atuam em hospital, havendo pareamento por sexo, idade e estilo de vida. Os danos no material genético serão avaliados de forma sistêmica pelo teste do cometa; a instabilidade genética será avaliada pela frequência de micronúcleos (MN) detectados em mucosa bucal e em linfócitos; a citotoxicidade será analisada por meio dos testes de MN bucal e em linfócitos, assim como por citometria de fluxo. Haverá também análise de hemograma, de F2-isoprostano e de enzimas (bioquímico). Considerando a importância, originalidade e relevância do tema, com os resultados obtidos neste estudo, serão conhecidas as concentrações dos RGA em SO e obter-se-ão informações dos possíveis efeitos dos RGA em profissionais expostos que atuam em hospital veterinário, contribuindo, assim, para maior entendimento dos possíveis efeitos tóxicos da exposição ocupacional aos RGA.

1. INTRODUÇÃO

Exposição ocupacional aos resíduos de gases anestésicos (RGA)

Os anestésicos inalatórios têm sido utilizados há muitas décadas em salas operatórias (SO) tanto em cirurgias humanas como veterinárias. Assim, ambos pacientes e profissionais atuantes em SO são considerados grupos de risco devido à exposição a estes agentes.

Em 1950 houve a descoberta de agentes anestésicos halogenados. O halotano foi um dos primeiros anestésicos inalatórios a ser bem-sucedido, desbancando rapidamente os anestésicos inalatórios usados anteriormente, com exceção ao óxido nitroso - N₂O (Eger, 2005). Mais tarde, outros anestésicos inalatórios foram sendo também utilizados como o metoxiflurano, enflurano, isoflurano, sevoflurano e desflurano (Yilmaz & Calbayram, 2016), sendo estes últimos os agentes mais utilizados atualmente na anestesiologia humana e o isoflurano o mais utilizado na anestesiologia veterinária. A metabolização destes compostos é via citocromo P450, pela CYP2E1 sendo a sua metabolização no fígado (Kharasch & Thummel, 1993). Dentre as vantagens do uso dos halogenados mais modernos estão a baixa solubilidade, a indução e recuperação rápida da anestesia geral, os baixos coeficientes de partição sangue/gás e o baixo custo no caso do isoflurano e sevoflurano comparado ao desflurano (Young & Apfelbaum, 1995; Wolverson & Nathanson, 1998).

Os resíduos de gases anestésicos (RGA) são pequenas quantidades desses anestésicos inalatórios quando utilizados na SO, o que expõe a equipe cirúrgica aos potenciais riscos de exposição. Um estudo clássico, realizado pela *American Society of Anesthesiologists (ASA)* em 1974, avaliou os efeitos dos RGA em mulheres que trabalhavam continuamente em SO, as quais foram comparadas com mulheres não expostas aos RGA, e observou-se que as profissionais expostas ocupacionalmente tiveram risco aumentado para abortos espontâneos, anormalidades congênitas, doenças renais, hepáticas e câncer. De fato, estudos sugerem que a exposição crônica aos RGA pode constituir riscos para a saúde de pessoal exposto, desde o aparecimento de sintomas como irritabilidade, fadiga e cefaleia (ISSA, 2002), até efeitos neurotóxicos e alterações neurocomportamentais (Guirguis et al., 1990; Rowland et al., 1995; Lucchini et al., 1996), doenças hepáticas, renais e hematopoiéticas (Green et al., 1981; Franco et al., 1991; Obata et al., 2000), além de indução de problemas reprodutivos incluindo aborto espontâneo e defeitos congênitos, especialmente em médicas veterinárias (Shirangi et al., 2007, 2009; Allweiler & Kogan, 2013). Embora a anestesiologia tenha evoluído, quando os agentes anestésicos são administrados por inalação a contaminação do ar em SO ainda é inevitável (Hoerauf et al., 1996; Hoerauf et al., 1997).

Dessa forma, são diversos os profissionais que estão expostos ocupacionalmente aos RGA, mundialmente, como os médicos e médicos veterinários anesthesiologistas e cirurgiões, enfermeiros, técnicos, além de estudantes atuantes em SO e em salas de recuperação (NIOSH, 2007). De forma semelhante à medicina, os avanços na medicina veterinária e o maior cuidado no bem-estar dos animais pelos proprietários, têm havido maior expectativa de vida de pequenos animais nos últimos anos. Com isso, os animais de estimação têm apresentado maior probabilidade de, em algum momento de suas vidas, serem submetidos a intervenção cirúrgica-anestésica (Carareto et al., 2005), aumentando assim a exposição aos RGA.

A presença desses RGA no ambiente cirúrgico se deve a três causas principais: SO sem sistema de exaustão, técnicas anestésicas e estação de anestesia (Yasny & White, 2012). O equipamento anestésico utilizado na medicina veterinária geralmente é o mesmo utilizado em anesthesiologia humana e os principais anestésicos utilizados são os halogenados (Fritsch, 2000). Assim, para minimizar a exposição ocupacional aos RGA, o *National Institute of Occupational Safety and Health* (NIOSH, 2007) recomenda até dois ppm para os anestésicos halogenados, embora esse limite refere-se aos anestésicos mais antigos e não para os agentes mais modernos utilizados, e até 25 ppm para o N₂O, durante o período de administração anestésica, tanto para cirurgias humanas quanto para veterinárias. Entretanto, em cirurgias veterinárias, as concentrações de RGA podem exceder o limite máximo em 30% a 50% das medições realizadas na década de 1990 em países em desenvolvimento (Gardner et al., 1991; Korczynski, 1999). Infelizmente no Brasil não existem valores estabelecidos e recomendados para a exposição ocupacional aos RGA (Oliveira, 2009) e esse assunto permanece negligenciado. Assim, ressalta-se a importância e originalidade em se conhecer as concentrações de RGA em hospital veterinário brasileiro. Acredita-se que vários desses profissionais devem estar expostos a altas concentrações uma vez que as SO, no Brasil, assim como em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, não possuem sistema de exaustão adequado e vários profissionais atuam com animais de grande porte, os quais necessitam de altas concentrações anestésicas, o que leva à maior poluição das SO.

Fazendo um paralelo com centro cirúrgico humano, nosso grupo de pesquisa recentemente mostrou, de forma inédita em hospital público universitário, que as concentrações residuais dos anestésicos isoflurano e sevoflurano excederam, e muito, o limite internacional recomendado (NIOSH) quando as medições foram realizadas durante a anestesia em SO sem sistema de exaustão de gases, com aumento progressivo das concentrações quanto maior o tempo da anestesia; já em SO com sistema parcial de exaustão as concentrações dos

RGA foram bem menores, mas a exposição ao sevoflurano ainda excedeu o limite recomendado (Braz et al., 2017).

Exposição ocupacional aos RGA e danos no material genético

Há algumas décadas, percebe-se um aumento dos trabalhos na literatura em relação à exposição ocupacional aos RGA e seus possíveis efeitos no genoma, o que demonstra uma preocupação em relação aos possíveis efeitos tóxicos frente à exposição ocupacional aos RGA, uma vez que milhões de profissionais têm exposição ocupacional diária aos RGA em todo o mundo, o que destaca tal assunto como importante questão de saúde ocupacional. Deste modo, estudos nesta área são relevantes e abrangem as áreas de anestesiologia, toxicologia, genética, entre outras.

Estudos têm mostrado aumento de danos no material genético (ácido desoxirribonucleico - DNA), de aberrações cromossômicas (AC), de trocas de cromátides irmãs (TCI) e de micronúcleo (MN) em profissionais expostos cronicamente aos RGA em SO de centro cirúrgico humano (Chang et al., 1996; Sardas et al., 1998; Rozgaj & Kasuba, 2000; Rozgaj et al., 2001; Chinelato & Froes 2002; Sardas et al., 2006; Chandrasekhar et al., 2006; Baysal et al., 2009; Rozgaj et al., 2009; Wronska-Nofer et al., 2009). Estudo realizado por Eroglu et al. (2006) mostrou que médicos anestesiológicos que trabalhavam em SO sem sistema de exaustão e eram expostos aos resíduos de sevoflurano e N₂O tiveram aumento de frequência de TCI em relação ao grupo de não expostos; os autores também relataram diminuição significativa da frequência de TCI após afastamento de dois meses das SO. El-Ebiary et al. (2013) observaram aumento significativo de danos genéticos em profissionais ocupacionalmente expostos (médicos anestesiológicos e cirurgiões, enfermeiros e técnicos) aos RGA, quando comparados ao grupo controle. De forma interessante, um estudo realizado na Eslovênia mostrou que médicas anestesiológicas expostas ao halotano, isoflurano e N₂O tiveram aumento significativo de danos citogenéticos (MN, AC e TCI) comparadas tanto com tecnólogas em radiologia quanto mulheres não expostas aos RGA (Bilban et al., 2005). Já Wrońska-Nofer et al. (2012) relataram correlação positiva entre danos oxidativos no DNA e concentrações de N₂O, porém sem associação com efeitos genotóxicos relacionados ao isoflurano ou sevoflurano em enfermeiras. Por outro lado, Wiesner et al. (2001) não observaram aumento significativo na frequência de MN detectados em linfócitos periféricos de profissionais alemães expostos às baixas concentrações de N₂O e dos halogenados isoflurano, sevoflurano e desflurano.

Em estudo realizado em hospital de Manaus, nosso grupo de pesquisa, ao avaliar médicos residentes em anestesiologia e cirurgia expostos aos RGA isoflurano, sevoflurano e N₂O, observou aumento de danos no DNA já aos oito meses de exposição (Costa Paes et al. (2014). Pela primeira vez no Brasil, nosso grupo de pesquisa mensurou a poluição anestésica no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp, onde ainda são utilizados, embora em menor número, aparelhos de anestesia que não possuem sistemas de exaustão, e somente metade das SO possuem sistema de exaustão de gases, aumento superior a duas vezes para os anestésicos halogenados e de seis vezes para o N₂O baseando-se nos valores recomendados pelo *NIOSH*, e observou-se aumento significativo de danos basais no DNA em médicos residentes expostos por três anos aos anestésicos, mas não em anestesiológicos cronicamente expostos, que atuavam em hospital universitário (Lucio, 2016; Souza et al., 2016). Por outro lado, de forma inédita, observou-se que a exposição crônica induziu instabilidade genética, citotoxicidade e alteração de proliferação celular, detectadas pelo teste do MN bucal (Souza et al., 2016).

Entretanto, na prática veterinária, há somente um único trabalho, na literatura ao nosso alcance, realizado na Alemanha com dez cirurgiões veterinários expostos ao isoflurano e N₂O que reportou aumento da formação de TCI, mas não de MN em linfócitos nem de índice proliferativo ou mitótico (Hoerauf et al., 1999), evidenciando a escassez de literatura em relação aos possíveis danos genéticos em profissionais atuantes em centro cirúrgico veterinário.

Exposição ocupacional aos RGA e citotoxicidade

O acúmulo de danos no material genético pode ser reparado; caso isso não ocorra, estas lesões podem ser fixadas, acarretando em mutações, morte celular ou neoplasias (Sasaki et al., 2000; Ward, 2002; Anazetti & Melo, 2007). Assim, a citotoxicidade tem influência na cinética de divisão celular e nos sistemas controladores do ciclo celular.

A apoptose é forma mais comum de morte celular programada, a qual se trata de processo complexo que pode ser induzido por vários fatores e que desempenha papel importante em processos como inflamação, tolerância imunológica e hematopoiese (Tyther et al., 2002). Em estudo realizado *in vitro*, a exposição ao sevoflurano e ao isoflurano se mostrou citotóxica por aumentar a apoptose celular via regulação de caspase-3 em linfócitos de maneira tanto dose como tempo dependentes (Matsuoka et al., 2001). Em outro estudo, relatou-se indução de apoptose pela exposição ao sevoflurano e, em menor extensão pelo isoflurano, mas não pelo desflurano, em linfócitos T em cultura celular (Loop et al., 2005).

Certamente, o processo apoptótico depende da intensidade, duração e tipo de exposição (Franco et al., 2009). Em estudo realizado por Souza et al. (2016) foi verificado que médicos anesthesiologistas expostos em média por 16 anos aos RGA isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O apresentaram citotoxicidade, pelo aumento de parâmetros de morte celular e alteração de índice proliferativo, em células esfoliativas bucais. Relatos de que os anestésicos inalatórios podem causar alterações imunológicas, incluindo linfocitopenia são descritos na literatura, como reportado por Perić et al. (1991), os quais observaram diminuição de leucócitos, incluindo linfócitos, em profissionais da saúde expostos cronicamente a altas concentrações de halotano e N₂O. De forma similar, diminuição de linfócitos, especialmente os T auxiliares, foi demonstrada em profissionais atuantes em centro cirúrgico humano e expostos cronicamente a isoflurano e N₂O quando comparados a profissionais não expostos aos anestésicos (Bargellini et al., 2001). Por outro lado, inibição de apoptose em neutrófilos já foi relatada em exposição ocupacional crônica aos anestésicos isoflurano, sevoflurano e N₂O (Goto et al., 2000; Tyther et al., 2002).

A vivacidade de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, no qual cada célula de um organismo sofre alterações cíclicas que a conduzem à divisão celular. O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1 (G = *gap* = intervalo) - a célula cresce devido às sínteses proteicas; nesta fase as células estão sujeitas às influências externas sobre o ciclo celular, principalmente durante a transição G1/S (S = síntese); na fase S ocorre a duplicação do DNA celular; a fase G2 representa a segunda fase de intervalo, no qual a célula tem maior crescimento e passa a produzir proteínas e organelas e se reorganiza preparando-se então para a fase M (M = mitose), a qual representa a divisão celular propriamente dita (Alberts et al., 2002). A transmissão de informações genéticas de uma geração de célula para a próxima requer replicação do genoma durante a fase S e sua segregação para as duas novas células filhas durante a mitose ou a fase M. As fases S e M são eventos cruciais rigorosamente ordenados em um processo cíclico que permite a duplicação correta da célula sem o acúmulo de anormalidades genéticas. Em um ciclo celular normal, a fase S é sempre precedente da fase M. Entre as fases S e M, existem duas lacunas preparatórias, G1 separa M de S e G2 está entre S e M. Quando a célula sofre diferenciação, ela sai da fase G1 do ciclo celular para entrar em um estado quiescente conhecido como G-zero – G0 (Pucci et al., 2000). Em estudo recente, Luo et al. (2015) reportaram que o isoflurano pode influenciar o comportamento das células tumorais ovarianas *in vitro* por regular marcadores associados ao ciclo celular. Entretanto, no que se refere à citotoxicidade e a possíveis alterações no ciclo celular pelos

RGA em profissionais que atuam em centro cirúrgico veterinário, não há trabalhos na literatura ao nosso alcance.

Exposição ocupacional e biomonitoramento humano

Biomarcadores genéticos têm sido muito empregados para a monitorização da exposição a agentes genotóxicos e/ou mutagênicos com potencial efeito carcinogênico (Norppa, 2016). Assim, com a evolução de ferramentas e marcadores genéticos e celulares de toxicidade, há a possibilidade de se melhor compreender os possíveis efeitos tóxicos/deletérios dos RGA em nível sistêmico e molecular. Destacam-se como importantes e sensíveis marcadores de genotoxicidade e mutagenicidade o teste do cometa e MN, respectivamente (Lucio et al., 2017).

A genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético. Quando estas alterações passam a ser permanentes e transmissíveis, utiliza-se o termo mutagenicidade, assim, todo agente mutagênico é genotóxico (Sasaki et al., 2000). Durante a mitose de células somáticas as mutações decorrentes são capazes de se propagar pelo organismo levando a consequências como a morte celular, formação de tumores e envelhecimento (Düsmen et al., 2012).

O teste do cometa detecta quebras de fita simples e dupla do DNA, sítios álcalis-lábeis e lesões oxidativas, além de ser um método sensível e de baixo custo, sendo uma importante ferramenta de avaliação de genotoxicidade. É um teste de *screening*, considerado o método de escolha para identificação de lesões no DNA, principalmente em estudos epidemiológicos de populações submetidas a diferentes exposições ocupacionais (Collins et al., 2008). A metodologia consiste em imergir células eucarióticas em gel de agarose, lisar a membrana celular e posterior eletroforese; sob condições alcalinas de eletroforese, as células com danos no DNA apresentam maior taxa de migração da molécula em direção ao ânodo, imitando a aparência de um cometa (cabeça e cauda) (Tice et al., 2000).

Os MN são formados durante divisão celular, sendo resultantes dos fragmentos dos cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros ou mesmo de dano no aparelho mitótico; assim, representam perda de cromatina (Salvadori et al., 2003). Alguns estudos têm evidenciado que a frequência de MN pode estar associada ao desenvolvimento de câncer (Fenech et al., 1999; Carvalho et al., 2002; Fenech, 2002; Bonassi et al., 2005). Segundo Bonassi et al. (2007), há correlação positiva entre o número de MN e o aumento do risco relativo de ocorrência de neoplasias malignas principalmente do sistema urogenital (bexiga e rim) além do trato gastrointestinal, apesar de mais estudos serem necessários para validar o

MN como marcador de risco para câncer. Assim, além do teste do MN detectar instabilidade genética, é possível a avaliação de citotoxicidade pelos índices mitótico e de proliferação celular (ICH, 1997). Assim, a principal metodologia utilizada atualmente para verificação de instabilidade genômica em seres humanos é a do MN, o qual pode ser detectado tanto em linfócitos periféricos como em células esfoliadas. Inclusive já se verificou uma correlação positiva entre a frequência de MN em linfócitos e células esfoliadas da mucosa bucal (Ceppi et al., 2010). Entretanto, ainda não se avaliou se existe correlação entre frequência de MN em linfócitos e em células bucais frente à exposição ocupacional aos RGA.

O uso de MN em células bucais (avaliado pelo teste *Buccal Micronucleus Cytome - BMCyt*) também é validado e tem sido amplamente difundido na última década por estudos de biomonitoramento humano para avaliar exposição a agentes genotóxicos e/ou carcinógenos, além de doenças neoplásicas. Apresenta a vantagem de ser pouco invasivo, tem rápida preparação, sem necessidade de cultivo celular, além de ser versátil, já que diversas análises podem ser feitas, incluindo avaliação de dano no DNA, proliferação celular, apoptose, entre outras (Bonassi et al., 2011; Bolognesi et al., 2015). Pelo fato de médicos anestesiológistas cronicamente expostos terem mostrado instabilidade genômica em mucosa bucal, sugere-se que a análise de *BMCyt* deva ser utilizada para biomonitoramento de possíveis efeitos tóxicos no material genético decorrentes da exposição ocupacional aos RGA em todos os profissionais expostos (Souza et al., 2016).

Na década de 1970, foi desenvolvido o primeiro citômetro de fluxo e este se tornou um instrumento essencial nas ciências biológicas. A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular que permite análise rápida e objetiva de vários parâmetros de células em suspensão. Dentre as vantagens dessa metodologia, há a possibilidade de diferenciar populações celulares heterogêneas, quantificar proteínas e enzimas, além de detectar proliferação celular, apoptose e reconhecer a fase celular do processo apoptótico (Bertho et al., 2000).

A viabilidade/citotoxicidade celular pode ser detectada utilizando marcadores como anexina V (marcada com *Fluorescein IsoThioCyanate - FITC*), uma vez que a anexina marca células em apoptose precoce. Em células viáveis, a fosfatidilserina se encontra na superfície interna da bicamada lipídica; já em células em início de processo apoptótico, a membrana celular ainda permanece intacta, mas sofre desorganização e a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada. Portanto, a anexina V é uma proteína que se liga aos fosfolipídios e possui alta afinidade pela fosfatidilserina na presença de íons de cálcio. Assim, a marcação de células com anexina V refere-se à apoptose precoce, uma vez que há alterações

morfológicas, mas sem perda da integridade da membrana (Palma, 2005). Tem se utilizado também a coloração com *7-Amino-Actinomycin D* (*7-AAD*) para discriminar apoptose precoce da tardia (Kerr et al., 1972). Trata-se de um intercalante de DNA usado como um corante vital, pois enquanto a célula estiver com a membrana íntegra, o *7-AAD* não pode se ligar e/ou intercalar ao DNA; no entanto, quando a integridade da membrana é perdida, o *7-AAD* passa a ter acesso ao DNA (Zimmermann & Meyer, 2011). Adicionalmente, as aplicações da citometria de fluxo na análise do ciclo celular incluem: revelar a distribuição de células em fases específicas do ciclo celular e/ou determinar a cinética de progressão por meio dessas fases, além de elucidar os mecanismos moleculares associados ao ciclo celular (Darzynkiewicz et al., 2001). A citometria de fluxo ainda possibilita medições multiparamétricas, com o estudo das relações entre os constituintes celulares medidos, especialmente o conteúdo de DNA (posição do ciclo celular ou ploidia do DNA) sem a necessidade de sincronização celular (Darzynkiewicz et al., 2001).

2. OBJETIVOS

Frente à escassez de dados e considerando a originalidade e relevância do tema, o presente estudo tem como objetivo avaliar a instabilidade genética e a citotoxicidade em profissionais expostos aos RGA que atuam em hospital veterinário.

3. MÉTODO

Após aprovação do protocolo de estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP e obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), serão recrutados 30 profissionais de áreas diversas atuantes, há no mínimo um ano, no centro cirúrgico de grandes e pequenos animais e na reprodução animal do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, de ambos os sexos, os quais são expostos ocupacionalmente ao isoflurano e em menor extensão ao sevoflurano. Para o grupo controle serão recrutados 30 voluntários que não atuem em hospital, os quais serão pareados por sexo, idade e estilo de vida. A todos os indivíduos da pesquisa será aplicado questionário detalhado que inclui dados demográficos, questões de história médica e estilo de vida. Os profissionais expostos aos RGA (grupo exposto) também responderão questões relacionadas ao tempo de exposição ocupacional e período de trabalho semanal e mensal. Serão excluídos do estudo os portadores de doença maligna, doenças infecciosas ou inflamatórias, os que fazem uso pesado de álcool (acima de nove doses semanais para mulheres e acima de 14 doses semanais para homem, sem episódios

de embriaguez – *NIAAA*, 2015), “drogas ilícitas”, medicamentos e os que fazem uso de suplementação vitamínica ou que tenha atuado em alguma área com exposição ocupacional.

Mensuração das concentrações de RGA em SO

Para a coleta de ar utilizar-se-á o aparelho *InfraRan 4-gas anesthetic specific vapor analyzer* (*Wilks Enterprise*, EUA) para medição das concentrações individuais dos RGA isoflurano e sevoflurano por espectrofotometria infravermelha (Pickworth et al., 2013), durante anestesia inalatória no hospital veterinário universitário, o qual dispõe de SO sem sistema de exaustão de gases. Esse equipamento portátil tem limite de detecção de 0 a 50 ppm para os halogenados, para um fluxo de amostras de 10 l/min.

Coleta de material biológico

Para ambos os grupos (exposto e controle), de forma simultânea, serão obtidas células esfoliadas de ambos os lados da cavidade oral (bochecha), após prévia higienização; urina isolada a ser coletada em frasco universal estéril, sendo a primeira da manhã; além de amostra de sangue venoso a ser coletada em tubos específicos após jejum (oito h).

Ressalta-se que não será necessária coleta biológica pela Unidade de Pesquisa Clínica (UPECLIN) da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pois todas as amostras serão realizadas pela aluna responsável pelo projeto, a qual tem ampla experiência na coleta de amostra biológica. Todas as amostras serão previamente codificadas, imediatamente transportadas ao Laboratório GENOTOX (Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPLEX, FMB-UNESP), no qual as amostras serão processadas sob luz amarela para evitar a possibilidade de danos adicionais ao DNA e serão analisadas, com exceção das análises bioquímicas e de hemograma, que serão realizadas em laboratório terceirizado.

Metodologias a serem utilizadas

-Teste do MN bucal (MBNCyt)

As células bucais serão transferidas para solução salina, sendo, em seguida, centrifugadas (1000 rpm por 5 min, a 4°C) e fixadas com metanol/ácido acético, na proporção de 3:1, seguindo protocolo descrito por Tolbert et al. (1992), com pequenas modificações. A centrifugação será repetida (três vezes), o sobrenadante será retirado e a solução fixadora será adicionada. A seguir, as amostras serão gotejadas em lâminas limpas, com secagem à temperatura ambiente por 24 h. As lâminas serão submetidas à coloração de *Feulgen*/*Fast-*

Green e serão analisadas em microscópio óptico, conforme recomendação de Thomas et al. (2009). Realizar-se-á a análise de 1000 células por indivíduo para identificação de células basais, diferenciadas e binucleadas; cromatina condensada, cariorrexe, picnose e cariólise. Para MN e broto nuclear serão analisadas 2000 células diferenciadas.

-Isolamento de células mononucleares

Após a coleta de sangue, realizar-se-á o isolamento de células mononucleares com *Ficoll-Paque Plus*[®] (GE Healthcare) seguindo o protocolo de Braz & Fávero Salvadori (2007). Para isso, 2 ml do sangue total serão homogeneizados com 2 ml de solução salina (PBS) e colocados, cuidadosamente, sobre 3 ml de ficol. Após centrifugação por 30 min a 2500 rpm, a 4°C, os linfócitos serão retirados com auxílio de pipeta *Pasteur* e transferidos para outro tubo, no qual serão adicionados 4 ml de PBS. Após nova centrifugação por 15 min, a 1500 rpm (4°C), as células (0,5 ml) serão utilizadas para o teste do cometa e MN a fresco.

-Teste do cometa

Alíquotas de 10 µl de células mononucleares serão adicionadas a 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão. Cada uma das alíquotas será colocada sobre lâmina previamente recoberta com camada de agarose de ponto de fusão normal, coberta com lamínula e colocada a 4°C para solidificação da agarose. Após, a lamínula será removida e a lâmina colocada em solução de lise gelada e recém-preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, Triton X-100 a 1% e dimetilsulfóxido a 10%). Em seguida, as lâminas serão lavadas em PBS por 5 min. Após esse período, as lâminas serão transferidas para cuba horizontal de eletroforese, que será preenchida com tampão alcalino gelado e recém-preparado (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH>13). Após período para desespiralização do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis, a eletroforese será conduzida a 25V. Finalizada a eletroforese, as lâminas serão colocadas por 15 min em solução de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5), fixadas com etanol, secas à temperatura ambiente e armazenadas a 4°C. No momento da análise, as lâminas serão coradas com *SYBR Gold* e 100 nucleoides (50 nucleoides/lâmina/indivíduo) serão analisados em microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instruments*, Reino Unido), para mensuração dos danos no DNA (% de DNA na cauda).

-Cultura de linfócitos periféricos e teste do MN

Imediatamente após o isolamento de células mononucleares (~ 95% linfócitos), as amostras serão processadas de acordo com o protocolo descrito por Salvadori et al. (2003). Será transferido volume de 500 µl de amostra aos frascos de cultura contendo 4,5 ml de meio *RPMI*, 1 ml de soro fetal bovino e 150 µl de fitohemaglutinina. O meio de cultura com a amostra será então incubado a 37°C com 5% de CO₂. Após 44 h serão adicionados 18 µl de citocalasina B (6 µg/ml) ao meio mantendo o frasco de cultura na incubadora por mais 28 h a 37°C. No final das 72 h, a cultura será transferida para tubos de ensaio, que serão centrifugados a 800 rpm por 5 min a 20°C. O sobrenadante será então descartado. Em seguida, será adicionado à suspensão de células solução hipotônica gelada (KCl 0,075 M) por 7 min e após este período será adicionado o fixador metanol/ácido acético e centrifugado a 800 rpm por 5 min a 20°C e essa sequência será repetida três vezes. Sendo o primeiro, na proporção de 3:4 com o acréscimo de três gotas de formaldeído seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante, depois, na proporção de 5:1, o qual será repetido mais uma vez, com nova centrifugação a 800 rpm por 5 min a 10°C e descarte ao término de cada adição. O precipitado final, após ressuspensão, será gotejado (três gotas dos linfócitos) em lâminas de vidro, as quais serão flambadas. As lâminas serão coradas após 24 h com solução de Giemsa 5%, por 5 min. A análise da frequência de MN, índice de proliferação celular e mitótico será feita por meio de microscopia óptica, conforme critérios descritos por Fenech (2000).

-Citometria de fluxo

Amostras de sangue periférico colhidas em tubos contendo heparina sódica serão imunofenotipadas para avaliação de viabilidade celular, apoptose e ciclo celular. Uma alíquota de 100 µl de sangue total será marcada com anticorpos monoclonais específicos às populações celulares de interesse (*CD16-APC* – neutrófilos e *CD3-PE* – linfócitos T), utilizados para caracterização das mesmas, de acordo com recomendações dos fabricantes. Após incubação de 30 min no escuro, as amostras serão lavadas com solução isotônica e serão ressuspensas em tampão de anexina e corante *7-AAD*. Após 15 min, serão adicionados 5 µl de anexina-V-FITC e 5 µl de *7-AAD*, incubando-se por 15 min no escuro. Acrescentar-se-ão 450 µl de solução de lise (*Lyse Solution - BD Pharmingen™*) com nova incubação por mais 15 min. As amostras serão centrifugadas a 1600 rpm por 5 min e ressuspensas em solução salina isotônica para aquisição no citômetro de fluxo modelo *FACSCalibur-BD®* utilizando *software CellQuest™*. Realizar-se-á *gate* para caracterizar as populações leucocitárias de interesse, incluindo *CD16⁺/CD3⁻* (neutrófilos) e *CD16⁻/CD3⁺* (linfócitos), e em cada uma

delas serão avaliados os parâmetros de viabilidade celular (anexina⁻/7AAD⁻), apoptose precoce (anexina⁺/7AAD⁻) e apoptose/morte tardia/avançada (anexina⁺/7AAD⁺).

Para o ciclo celular utilizar-se-á o *kit* da *BD Cycletest™ Plus DNA* e serão seguidas as recomendações do fabricante. Após incubação de 30 min no escuro, as amostras já marcadas para as populações de interesse serão lavadas em solução isotônica. A concentração celular deverá ser ajustada para 5.0×10^5 células/ml com solução tampão de dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida as células serão ressuspensas em centrífuga a 1600 rpm por 5 min em temperatura ambiente desprezando-se o sobrenadante. Acrescentar-se-ão 250 µl da solução A (tripsina) e as amostras serão homogeneizadas suavemente, sendo em seguida incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Sem remover a solução A, será adicionado volume de 200 µl da solução B (inibidor de tripsina e RNase). Homogeneizar-se-ão os tubos levemente e as amostras serão incubadas por mais 10 min a temperatura ambiente. Após esse período, adicionar-se-á volume de 200 µl de solução C (iodeto de propídio gelado), os tubos serão novamente homogeneizados e incubados (10 min no escuro a 4°C). Acrescentar-se-ão 450 µl de solução de lise (*Lyse Solution - BD Pharmingen™*) com nova incubação por mais 15 min. As amostras serão centrifugadas a 1600 rpm por 5 min e ressuspensas em solução salina isotônica para aquisição no citômetro de fluxo modelo *FACSCalibur-BD®* utilizando *software CellQuest™*.

-Análise bioquímica, de hemograma e urinária

Em parte do sangue total colhido em tudo com EDTA, realizar-se-á a fresco a contagem celular de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, a ser realizado em equipamento automático. Por meio das amostras de soro colhidas em tubo seco, realizar-se-á dosagem bioquímica de creatinina e das enzimas hepáticas alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT), por meio de analisador automatizado. O F2-isoprostano urinário será avaliado por meio de imunoensaio utilizando-se *kit* comercialmente disponível, conforme instruções do fabricante (*OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F2α ELISA kit, Cell Biolabs, EUA*). As concentrações de F2-isoprostano serão expressas em ng/mg de creatinina.

Análise estatística

O tamanho amostral foi calculado baseado em estudos prévios (Chandrasekhar et al., 2006; Souza et al., 2016), assumindo uma diferença média esperada entre os grupos para o teste do MN bucal em torno de 0,52 e desvio-padrão igual de 0,56, ficando determinado 30

indivíduos por grupo com poder do teste de 95% (erro tipo II - β de 0.05) e erro tipo I - α de 0.05.

Para as características dos grupos será utilizado o teste t de Student independente para comparação das médias, exceto para a distribuição do sexo entre os grupos, que será analisada pelo teste do qui-quadrado. Se os dados a serem analisados apresentarem distribuição normal, utilizar-se-á o teste t de Student para comparação dos grupos; se não, os dados serão analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para os dados dos testes de MN, utilizar-se-á o modelo de regressão linear de Poisson, e a correlação de dados será analisada por teste de Spearman. Adotar-se-á nível de 5% de significância.

4. CRONOGRAMA

Atividades/Semestres	1º/2018	2º/2018	1º/2019	2º/2019	1º/2020
Aquisição de materiais e reagentes	X	X	X	X	
Aprovação do estudo pelo CEP e registro no REBEC	X				
Participação em reuniões do grupo de pesquisa	X	X	X	X	X
Aplicação de questionários, TCLE e coleta de material biológico dos dois grupos de estudo	X	X	X		
Mensuração dos RGA nas SO de hospital veterinário	X	X	X		
Processamento das amostras a fresco para avaliação de danos no material genético (teste do cometa e teste do MN bucal)	X	X	X	X	
Cultura celular e teste do MN em linfócitos	X	X	X	X	
Análise do teste do cometa e dos parâmetros para o MN bucal e sistêmico	X	X	X	X	
Análise de hemograma, bioquímica e urinária, além de parâmetros de citometria de fluxo	X	X	X	X	
Tabulação dos dados e análise estatística		X	X	X	
Apresentação de trabalho em evento científico		X	X	X	
Redação de manuscrito e exame de qualificação				X	
Redação de dissertação e defesa				X	X

5. BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cell Cycle Programmed Cell Death. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002;2498-9.

Allweiler SI, Kogan LR. Inhalation anesthetics and the reproductive risk associated with occupational exposure among women working in veterinary anesthesia. Vet Anaesth Analg. 2013;40:285-9.

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

Anazetti MC, Melo PS. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. Metrocamp Pesq. 2007;1:37-58.

Bargellini A, Rovestia S, Barbieri A, Vivolia R, Roncagliac R, Righia E, et al. Effects of chronic exposure to anaesthetic gases on some immune parameters. Sci Total Environ. 2001;270:149-56.

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.

Bertho A, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:429-33.

Bilban M, Jakopin CB, Ogrinc D. Cytogenetic tests performed on operating room personnel (the use of anaesthetic gases). Int Arch Occup Environ Health. 2005;78:60-64.

Bolognesi C, Roggieri P, Ropolo M, Thomas P, Hor M, Fenech M, et al. Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. Mutagenesis. 2015;4:545-55.

Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Strömberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives, *Environ Mol Mutagenesis*. 2005;54:258-70.

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

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

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 LG, Braz JRC, Cavalcante GAS, Souza KM, Lucio LMC, Braz MG. Comparação de resíduos de gases anestésicos em salas de operação com ou sem sistema de exaustão em hospital universitário brasileiro. *Rev Bras Anesthesiol*. 2017;67:516-20.

Carareto R, Souza Rocha L, Henao G, Piedad N, Gonçalves SM, Nunes N, et al. Estudo retrospectivo da morbidade e mortalidade associada com anestesia geral inalatória em cães. *Semina: Ciênc Agrár*. 2005;26:569-74.

Carvalho MB, Ramirez A, Gattás GJF, Guedes AL, Amar A, Rapoport A, et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. *Rev Assoc Med Bras*. 2002;48:317-22.

Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res*. 2010;705:11-9.

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

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

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

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

Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*. 2001;38:179-93.

Düsmen E, Berti A, P Soares, LC, Vicentini VEP. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. *SaBios: Rev Saúde e Biol*. 2012;7:66-81.

Eger IE. The pharmacology of inhaled anesthetics. *J Crit Care*. 2005;24:89-100.

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

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

Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*. 1999;428:271-83.

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

Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today*. 2002;22:1128-37.

Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis ML. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutat Res.* 2009;674:3-22.

Fritschi L. Cancer in veterinarians. *Occup Environ Med.* 2000;57:289-97.

Gardner R, Hampton J, Causton J. Inhalation anaesthetics: exposure and control during veterinary surgery. *Ann Occup Hyg.* 1991;4:377-88.

Goto Y, Gallagher J, Fanning N, Wang J, McCusker S, Redmond P, et al. Does chronic occupational exposure to volatile anesthetic agents influence the rate of neutrophil apoptosis? *Can J Anaesth.* 2000;47:350-3.

Green CJ. Anaesthetic gases and health risks to laboratory personnel: a review. *Lab Anim.* 1981;15:397-403.

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

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

Hoerauf K, Harth M, Wild K, Hobbhahn J. Occupational exposure to desflurane and isoflurane during cardio pulmonary bypass: is the gas outlet of the membrane oxygenator a operating room pollution hazard? *Br J Anaesth.* 1997;78:378-80.

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

International Conference on Harmonization (ICH) Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals. Guideline S2B. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1997.

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

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.

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

Korczynski RE. Anesthetic gas exposure in veterinary clinics. *Appl Occup Environ Hyg*. 1999;14:384-90.

Loop T, Dovi-Akue D, Frick M, Roesslein M, Egger L, Humar M, et al. Volatile anesthetics induce caspase-dependent, mitochondria-mediated apoptosis in human T lymphocytes in vitro. *Anesthesiology*. 2005;102:1147-57.

Luo X, Zhao H, Hennah L, Ning J, Liu J, Tu H, et al. Impact of isoflurane on malignant capability of ovarian cancer in vitro. *Br J Anaesth*. 2015;114:831-9.

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

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

Lucio LM, Braz MG, Nascimento P Jr, Braz JRC, Braz LG. Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. *Rev Bras Anesthesiol*. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjane.2017.07.002>

Matsuoka H, Kurosawa S, Horinouchi T, Kato M, Hashimoto Y. Inhalation anaesthetics induce apoptosis in normal peripheral lymphocytes in vitro. *Anesthesiology*. 2001;95:467-72.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). Drinking Levels Defined [Internet]. Bethesda: NIAAA; 2015 [acesso 20 Out 2017]. Disponível em: <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>

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

Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett*. 2016;149:309-34.

Obata R, Bito H, Ohmura M, Moriwaki G, Ikeuchi Y, Katoh T, Sato S. The effects of prolonged low-flow sevoflurane anesthesia on renal and hepatic function. *Anesth Analg*. 2000;91:1262-8.

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

Palma PR. Avaliação da anexina V e calceína AM como marcadores de apoptose em linfócitos [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde; 2005.

Perić M, Vranes Z, Marusić M. Immunological disturbances in anaesthetic personnel chronically exposed to high occupational concentrations of nitrous oxide and halothane. *Anaesthesia*. 1991;46:531-7.

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

Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000;2:291-9.

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

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

Rozgaj R, Kasuba V, Brozović G, Jazbec A. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212:11-7.

Rowland AS, Baird DD, Shore DL, Weinberg CR, Savitz DA, Wilcox AJ. Nitrous oxide and spontaneous abortion in female dental assistants. *Am J Epidemiol*. 1995;141:531-8.

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

Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyeme F, Nisbkiete E, Saga A, Ishida K, et al. The comet assay with multiple mouse organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from de IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. *Critical Rev in Toxic*. 2000;30:629-99.

Sardas S, Aygün N, Gamli M, Unal Y, Berk N, Karakaya AE. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutat Res*. 1998;418:93-100.

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

Shirangi A, Fritschi L, Holman C. Prevalence of occupational exposures and protective practices in Australian female veterinarians. *Aust Vet J*. 2007;85:32-8.

Shirangi A, Fritschi L, Holman C. Associations of unscavenged anesthetic gases and long working hours with preterm delivery in female veterinarians. *Obst Gynecol*. 2009;5:1008-17.

Souza KM, Braz LG, Nogueira FR, Souza MB, Bincoletto LF, Aun AG, et al. Occupational exposure to anesthetics leads to genomic instability, cytotoxicity and proliferative changes. *Mutat Res*. 2016;791:42-8.

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

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

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

Tyther R, Halligan M, Wang J, Redmond HP, Shorten G. Effects of chronic occupational exposure to anaesthetic gases on the rate of neutrophil apoptosis among anaesthetists. *Eur J Anaesthesiol*. 2002;19:604-8.

Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2002;46:351-60.

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

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

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

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

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

Yılmaz S, Calbayram NÇ. Exposure to anesthetic gases among operating room personnel and risk of genotoxicity: a systematic review of the human biomonitoring studies. *J Clin Anesth*. 2016;35:326-31.

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

Zimmermann M, Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. In: Stoddart MJ, editor. *Mammalian cell viability – methods and protocols*. New York: Human Press; 2011;57-8.