

Efeito carcinogênico do Isoflurano[®], avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*

*Carcinogenic effect of the Isoflurane[®], assassed by epithelial tumor clone detection test (ETT) in *Drosophila melanogaster**

Isabella Cristina Branquinho de Oliveira

Graduanda do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM).

E-mail: isabellabranquinho@outlook.com

Jeyson Cesary Lopes

Professor orientador (UNIPAM).

E-mail: jeysoncl@unipam.edu.br

Resumo: O Isoflurano[®] é um anestésico inalatório amplamente utilizado na Medicina Veterinária, tanto para indução quanto para manutenção anestésica, principalmente pelas vantagens da rápida alteração do plano anestésico, excreção parcialmente (ou não) dependente das funções hepáticas e renais e, em consequência, menor período de recuperação anestésica. Em meio a tantas vantagens, existem autores que postulam que o anestésico pode ser genotóxico; desse modo, pode promover a formação de tumores, uma vez que a genotoxicidade está associada à carcinogênese. Nesse contexto, o presente estudo objetivou analisar o efeito carcinogênico do Isoflurano[®] por meio do teste ETT em *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos na pesquisa demonstram que o Isoflurano[®] nas concentrações de 3% e 0,75% apresentam frequências tumorais de 0,51 e 0,46, respectivamente. Constatou-se um aumento significativo ($p > 0,05$) na frequência de tumores em relação ao controle negativo 0,26. Isso posto, nas presentes condições experimentais, o Isoflurano[®] apresentou efeito carcinogênico, evidenciando efeito indutor de tumores.

Palavras-chave: Anestesia. Carcinogênese. Inalatória. Tumor.

Abstract: Isoflurane[®] is an inhaled anesthetic widely used in veterinary medicine, both for anesthetic induction and maintenance, mainly due to its advantages of rapid change in the anesthetic plane, excretion partially or not dependent on hepatic and renal functions and, consequently, shorter anesthetic recovery period. In spite of many advantages, some authors have postulated that the anesthetic can be genotoxic, thus, it may promote the formation of tumors, since genotoxicity is associated with carcinogenesis. In this context, the present study aims to analyze the carcinogenic effect of Isoflurano[®] through the ETT test in *Drosophila melanogaster*. The results of the research show that Isoflurane[®] at concentrations of 3% and 0.75% have tumor frequencies of 0.51 and 0.46, respectively, thus, there is a significant increase ($p > 0,05$) in the frequency of tumors when compared to the negative control 0,26. Thus, under the present experimental conditions, Isoflurano[®] showed a carcinogenic effect, evidencing tumor-inducing effect.

Keywords: Anesthesia. Carcinogenesis. Inhalation. Tumor.

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na Medicina Veterinária e a maior atenção oferecida pelos proprietários aos seus animais de estimação têm como consequência um aumento na expectativa de vida de cães, gatos e cavalos. À vista disso, animais de estimação têm apresentado maior propensão de, em algum momento de suas vidas, estarem sujeitos a intervenções cirúrgicas e anestésicas, as quais, por mais seguras que possam ser, sempre oferecem algum grau de risco ao paciente (CARARETO *et al.*, 2005).

Neste contexto, destaca-se o Isoflurano[®], um anestésico inalatório muito utilizado na medicina veterinária, em cães, gatos, equinos e pássaros. O Isoflurano[®] atua na manutenção de anestesia, por dispor de rápida recuperação, de aumento da frequência cardíaca, resultando em uma menor diminuição do débito cardíaco e, quando administrado com opioides, leva a uma depressão respiratória; dessa forma, seu uso torna-se bastante viável (STEFFEY, 2013).

Em contrapartida, Tardelli *et al.* (2013) postula que o Isoflurano[®] pode ser genotóxico, podendo promover a formação de tumores, uma vez que a genotoxicidade está associada a carcinogênese. Supõe-se que o anestésico reaja diretamente na molécula de DNA, alquilando a posição N7 das purinas, por moléculas derivadas de metabólitos resultantes do metabolismo hepático/renal ou dos produtos de sua degeneração. Outra provável explicação é a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), já que estas podem levar a diferentes lesões no material genético (BARBOSA *et al.*, 2010).

Assim como outros anestésicos inalatórios, o Isoflurano[®] pode ser inalado não apenas pelo paciente, mas também pela equipe cirúrgica quando não há um correto sistema de escoamento (SILVA, 2015). Isto posto, fazem-se urgentes pesquisas a fim de se compreender precisamente a capacidade de ele gerar danos ao material genético de animais (ROCHA *et al.*, 2015; BRAZ; KARAHALIL, 2015). De pacientes humanos (BRAZ *et al.*, 2011; OROSZ *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2016) e de profissionais inalantes, como veterinários, médicos e profissionais da saúde (SOUZA *et al.*, 2016; CHANDRASEKHAR *et al.*, 2006); SZYFTER *et al.*, 2016).

Nesse contexto, por tratar-se de saúde pública, torna-se relevante identificar os riscos trazidos pela inalação do anestésico tanto pelo paciente quanto pelo profissional, com intuito de se perceber o risco de carcinogênese acarretado por ele (LUCIO *et al.*, 2018). Sendo assim, a presente pesquisa objetivou avaliar o potencial carcinogênico e/ou anticarcinogênico do Isoflurano, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. O uso da *D. melanogaster* é fundamental, já que esse organismo modelo possui genes semelhantes aos dos mamíferos. Além disso, trata-se de um método *in vivo* (DOKE; DHAWALE, 2015).

2 METODOLOGIA

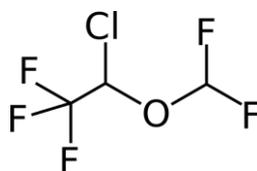
2.1 AGENTES QUÍMICOS

2.1.1 Isoflurano

Isoflurano, $C_3H_2ClF_5O$, massa molecular 184,5 g/mol e registro CAS 26675-46-7, foi adquirido comercialmente com auxílio de uma receita C1 branca, disponibilizada por um médico veterinário, por ser um medicamento de controle especial, restrito a hospitais.

Na realização do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT), foi utilizada água de osmose reversa como solvente para se obterem as diferentes concentrações de 3%, 1,5%, 0,75%, 0,375% e 0,1875%. As concentrações utilizadas no estudo foram estabelecidas com base em dois trabalhos desenvolvidos por Olufs *et al.* (2018) e Kundomal e Baden (1985), nos quais foi utilizada a *D. melanogaster* como organismo-teste.

Figura 1- Fórmula estrutural Isoflurano®

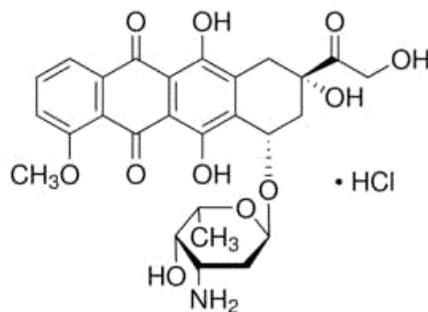


Fonte: <https://www.kisspng.com/png-halogenated-ether-isoflurane-chemical-formula-enfl-3355411/download-png.html>.

2.1.2 Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (DXR), de nome comercial Adriblastina RD®, produzido pelo laboratório Pfizer e comercializado em ampolas de 50mg, possui fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}$, massa molecular 579.9802g/mol e registro CAS 25316-40-9. Foi utilizado como controle positivo (0,4mM), uma vez que possui efeito carcinogênico e genotóxico quando utilizado em altas doses.

Figura 2 - Fórmula estrutural Doxorrubicina.



Fonte: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d2975000?lang=pt®ion=BR&cm_sp=Insite_-_noResults_doxorrubicina_-_noResults9-.

2.1.3 Teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ett) em *drosophila melanogaster*

O teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) faz uso de duas linhagens diferentes de *Drosophila melanogaster*, as linhagens *mwh/mwh* e *wts/TM3*. Estas são mantidas em incubadora tipo B.O.D., em temperatura controlada (25°C), no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) em frascos de 250 mL, dispondo de meio de cultura próprio para *D. melanogaster*.

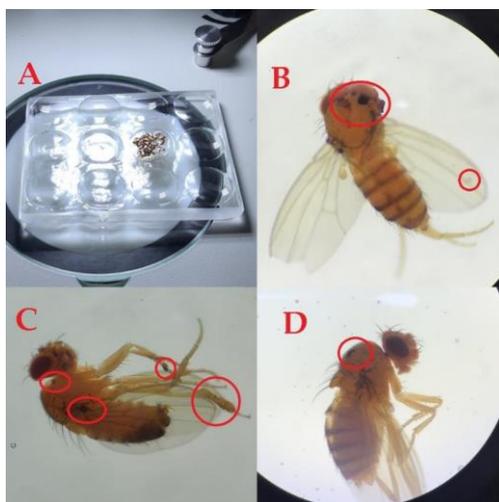
Para a realização do teste, foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3*, *Sb¹* com machos *mwh/mwh*. Após esse procedimento, as moscas foram transferidas para frascos contendo base sólida de ágar e uma camada de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) suplementado com sacarose, onde ocorreu a postura dos ovos durante período de 8 horas. Após a eclosão dos ovos, o meio de postura foi lavado com água osmose reversa, e larvas de 72 horas (\pm 4 horas) provenientes do cruzamento foram coletadas com o auxílio de peneira de malha fina.

As larvas foram submetidas a uma exposição crônica às substâncias testadas, por 48 horas (\pm 2 horas). Para isso, foram adicionados, em frascos de 25mL, 1,5g de purê de batatas instantâneo e 5mL de cinco diferentes concentrações isoladas de isoflurano (3%, 1,5%, 0,75%, 0,375% e 0,1875%). Como controle negativo, foi utilizada água de osmose reversa e, como controle positivo, ocloridrato de doxorrubicina (0,4mM).

Após a metamorfose, os indivíduos adultos emergentes foram coletados e transferidos para frascos contendo etanol 70%, devidamente identificados. Para a análise, as moscas adultas com tricomas de fenótipo curto foram descartadas, sendo analisadas apenas as moscas de tricomas selvagem. A análise ocorreu usando placa escavada contendo glicerina (Glicerol $C_3H_8O_3$), com auxílio de pinças para manuseio dos indivíduos e em uma lupa estereoscópica.

A localização de cada tumor foi observada e transcrita para uma planilha padrão, que separa a ocorrência de tumores nas estruturas do corpo da mosca (olhos, cabeça, asas, corpo, pernas, halteres) e o total por mosca, em cada concentração testada.

Figura 3 – Placa escavada com glicerina e moscas (A), tumores no corpo e asa (B), tumores no corpo, asa e pernas (C) e tumor no corpo (D)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, as diferenças entre as frequências de tumor das concentrações testadas de isoflurano e dos controles positivo e negativo foram calculadas, utilizando-se o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou o teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster* para avaliar o potencial carcinogênico de diferentes concentrações de ISOFLURANO® (3%, 1,5%, 0,75%, 0,375% e 0,1875%). Como controle negativo, foi utilizada água de osmose reversa e, como controle positivo, DXR 0,4 mM. Os resultados dessa análise foram agrupados na Tabela 1.

Tabela 1— Frequência de clones de tumores observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com Doxorubicina (0,4mM) e diferentes concentrações de Isoflurano®

Tratamentos		Número de indivíduos analisados	Número de tumores analisados							Frequência de tumores/mosca)
Isoflurano (%)	DXR (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	94	1	0	10	11	3	0	25	0,26
0	0,4	146	44	28	257	134	123	32	618	4,23*
0,1875	0	95	3	5	6	14	6	0	34	0,36
0,375	0	94	2	1	6	11	4	2	26	0,28
0,75	0	80	1	6	9	15	5	2	38	0,46*
1,5	0	113	0	4	9	18	3	1	35	0,31
3	0	119	0	6	10	34	8	3	61	0,51*

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

DXR, doxorubicina.

Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, a frequência tumoral obtida para os indivíduos tratados com o controle positivo DXR 0,4 mM, a frequência observada foi de 4,23 tumores por mosca, logo é possível notar um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de tumores, em comparação com o controle negativo, revelando que o gene marcador *wts* estava ativo nos descendentes e que a linhagem respondeu como esperado.

As larvas que foram submetidas ao tratamento com o Isoflurano® nas concentrações de 3% e 0,75% apresentaram frequências tumorais de 0,51 e 0,46, respectivamente. Desse modo, observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) de

tumores em relação ao controle negativo, indicando um efeito indutor de tumores do composto nestas concentrações.

Ainda que os mecanismos da genotoxicidade e mutagenicidade do Isoflurano® não estejam completamente elucidados, sabe-se que esse composto possui diferentes faces que levam a carcinogênese tanto aos pacientes expostos quanto ao inalante ocupacional. As primeiras hipóteses descritas na literatura estão associadas à exposição de cultura de células de pacientes. A exemplo disso, em 1999, Jaloszynski *et al.* detectaram o potencial genotóxico do Isoflurano (ISF), quando utilizaram o teste do cometa em linfócitos humanos expostos, *in vitro*, a concentrações de 1 mM. O aumento de lesões genotóxicas em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgias invasivas e anestesiados com o ISF foi também relatado por Sardas *et al.* (1998) e por Karabiyik *et al.* (2001). Resultados semelhantes foram obtidos por Kim *et al.* (2006), que também utilizando o teste do cometa, observaram aumento de danos no DNA de linfócitos, baço, medula óssea, fígado e cérebro de ratos expostos a 1% de ISF, por 30 ou 60 minutos.

Benzonana *et al.* (2013) relata que o anestésico induz a expressão de fator indutível de hipóxia (HIF) de forma dependente do tempo e da concentração exposta ao ISF, aumentando a proliferação celular, migração celular e induz o rearranjo citoesquelético nas células. Segundo Semenza (2003), os HIFs são fatores de transcrição que coordenam diretamente a expressão de mais de 800 genes que atuam para compensar as mudanças nas condições fisiológicas, permitindo que a célula se adapte e sobreviva. Sendo assim, o autor afirma que os HIFs e muitos de seus genes-alvo também estão fortemente envolvidos em toda a série de atividades tumorgênicas.

Zhang e Shao (2016) relatam que o ISF influencia a síntese proteica e o crescimento celular superexpressando a proteína AKT, que está associada diretamente à autonomia do sinal de crescimento e à resistência a estímulos antiproliferativos através da via proteína quinase B/alvo da rapamicina em mamíferos (AKT/mTOR) A AKT/mTOR promove a biogênese do ribossomo e a tradução do RNA mensageiro, além de estimular a entrada na fase G₁ do ciclo celular, ativando proteínas atuantes na proliferação celular (MAJUMDER *et al.*, 2004).

Outra face da anestesia inalatória e de seus riscos de carcinogenicidade deve-se aos profissionais de saúde, que ficam expostos cronicamente a resíduos de gases anestésicos (RGA) e ao estresse oxidativo. Em um estudo pioneiro realizado por Paes *et al.* (2014), os efeitos da exposição ocupacional aos RGAs no material genético foram observados durante a residência médica. Os autores verificaram aumento significativo de lesões primárias no genoma de médicos residentes expostos de 16 a 22 meses ao Isoflurano, Sevoflurano e N₂O em relação a um grupo controle, em sala de operação sem exaustão de gases.

De acordo com Chinelato e Froes (2002), o metabolismo oxidativo é capaz de gerar Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e a indução de dano direto no genoma, em qualquer fase celular. Jena (2012) relata a atuação de diferentes espécies reativas na geração de modificações estruturais ao DNA, levando ao aparecimento de mutações e diversas doenças como o câncer. Nesse estudo, o pesquisador enfoca um maior ataque dos radicais livres à base nitrogenada guanina, fato que se deve à menor oxidação dessa base.

Nelson e Cox (2014) relatam que o ciclo celular é regulado por diferentes genes, como os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor e os genes de reparo; sendo que mutações geradas em qualquer um destes genes resultarão em divisões celulares desordenadas, com uma possível geração de tumores (GRIFFITHS *et al.*, 2017).

Malekirad *et al* (2005) realizou um estudo onde foi avaliada a exposição crônica de profissionais da saúde a anestésicos inalatórios sem sistema de exaustão de gases, sendo verificado aumento de peroxidação lipídica por ERO e redução em grupos antioxidantes; entretanto, uma correlação negativa entre danos no material genético e capacidade antioxidante foi observada em profissionais expostos a halotano, isoflurano, sevoflurano, desflurano e N₂O, em centro cirúrgico com sistema de exaustão de gases anestésicos (BAYSAL *et al*, 2009).

Outros estudos mostraram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, em que foram detectados aumento na frequência de quebras no material genético e diminuição de enzima e capacidade antioxidante, em profissionais expostos a enflurano, halotano, isoflurano, sevoflurano, desflurano e em salas de operação com sistema de exaustão parcial (IZDES *et al*, 2010; TÜRKAN; AYDIN; SAYAL, 2005).

Os trabalhos citados anteriormente corroboram os resultados aqui obtidos, uma vez que, de acordo com a literatura consultada, o ISF é capaz de induzir danos ao material genético tanto por um mecanismo de ação direto quanto por meio de via oxidativa, gerando ERO. No presente estudo, o ISF apresentou efeito carcinogênico após exposição crônica das larvas de *Drosophila melanogaster*, nas concentrações de 3% e 0,75%, revelando efeito indutor de tumor em exposições de longo prazo.

4 CONCLUSÃO

Com base nas concentrações e condições experimentais delineadas no presente estudo, conclui-se que o Isoflurano é um potencial agente carcinogênico, tanto para animais que passarem pelo processo de anestesia, quanto para o profissional exposto a ele, uma vez que foi capaz de induzir a formação de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. Os mecanismos específicos indutores de lesão não foram alvo deste estudo, mostrando a importância de se aprofundar em pesquisas que melhor elucidem seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, B. S.; BRAZ, M. G.; BRAZ, J. R. C. Avaliação da genotoxicidade do sevoflurano em linfócitos de pacientes submetidos a cirurgia. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 15, n. 4, p. 203-210, 2010.

BAYSAL, Z; CENGIZ, M; OZGONUL, A; CAKIR, M; CELIK, H; KOCYIGIT, A. Oxidative status and DNA damage in operating room personnel. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p 189–193. 2019.

BENZONANA, L. L.; PERRY, N. J.; WATTS, H. R. et al: Isoflurane, a commonly used volatile anesthetic, enhances renal cancer growth and malignant potential via the hypoxia-inducible factor cellular signaling pathway in vitro. **Anesthesiology**, v. 119, p. 593–605. 2013.

BRAZ, M. G.; BRAZ, L. G.; BARBOSA, B. S.; GIACOBINO, J.; OROSZ, J. E.; SALVADORI, D. M.; BRAZ, J. R. DNA damage in patients who underwent minimally invasive surgery under inhalation or intravenous anesthesia. **Mutation Research**, v. 2, n. 4, p. 251-254, 2011.

BRAZ, M. G.; KARAHALIL, B. Genotoxicity of anesthetics evaluated in vivo (animals). **Biomed Research International**, v. 2015, p.8, 2015.

CARARETO, R.; ROCHA, L. S.; GUERRERO, P. N. H.; SOUSA, M. G.; NUNES, N.; PAULA, D. P.; NISHIMORI, C. T. Estudo retrospectivo da morbidade e mortalidade associada com anestesia geral inalatória em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 569-574, out./dez. 2005.

CHANDRASEKHAR, M.; REKHADEVI, P.V; SAILAJA, N.; RAHMAN, M. F.; REDDY, J. P.; MAHBOOB, M.; GROVER, P. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. **Mutagenesis**, v. 21, n. 4, p.249-254, 2006.

CHINELATO, A. R.; FROES, N. D. T. C. Genotoxic effects on professionals exposed to inhalational anesthetics. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p.79-85. 2002.

DOKE, S. K; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 223–229, 2015.

GRIFFITHS, A. J. F; WESSLER, S. R; CARROL, S. B; DOEBLEY, J. **Introdução à genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

IZDES, S; SARDAS, S; KADIOGLU, E; KARAKAYA, A.E. DNA Damage, Glutathione, and Total Antioxidant Capacity in Anesthesia Nurses. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v. 65, n. 4, 2010

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.**, v. 439, p. 199-206. 1999.

JENA, N. R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. **Journal of Biosciences**, v.37, n.3, p. 503-517, 2012.

KARABIYIK, L; SARDAS, S; POLAT, U; KOCABAS, N. A; KARAKA, Y. A. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. **Mutat Res.**, v. 492, 99-107, 2001.

KIM, H.; OH, E.; IM, H.; MUN, J.; YANG, M.; KHIM, J.Y.; LEE, E.; LIM, S. H.; KONG, M. H.; LEE, M.; SUL, D. Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. **Toxicology**, v. 220, n. 2-3, p. 169-178, 2006.

KUNDOMAL, Y. R; BADEN, J. M. Mutagenicity of Inhaled Anesthetics in *Drosophila Melanogaster*. **Anesthesiology**, v. 62, p.305-309, 1985.

LUCIO, L. M. C.; BRAZ, M. G.; NASCIMENTO-JUNIOR, P.; BRAZ, J. R. C.; BRAZ, L. G. Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 68, n. 1 jan./fev. 2018.

MAJUMDER, P. K; FEBBO, P. G; BIKOFF, R; BERGER, R. XUE, Q; MCMAHON, L. M; MANOLA, J; BRUGAROLAS, J; MCDONNELL, T. J; GOLUB, T. R; LODA, M; LANE, H. A; SELLERS, W. R. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. **Nat Med**, v.10, p. 594- 601, 2004.

MALEKIRAD, A. A; RANJBAR, A; RAHZANI, K; KADKHODAEI, M; REZAIE, A. TAGHAVI, B; ABDOLLAHI, M. Oxidative stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, p. 597- 600, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOGUEIRA, F. R.; BRAZ, L. G.; ANDRADE, L. R.; CARVALHO, A. L.; VANE, L. A.; MÓDOLO, N. S.; AUN, A. G.; SOUZA, K. M.; BRAZ, J. R.; BRAZ, M. G. Evaluation of genotoxicity of general anesthesia maintained with desflurane in patients under minor surgery. **Environ Mol Mutagen**, v. 57, p. 312-316, 2016.

OLUFS, Z. P. G; LOEWEN, C. A; GANETZKY, B; WASSARMAN, D. A; PEROUANSKY, M. Genetic variability affects absolute and relative potencies and kinetics of the anesthetics isofurane and sevofurane in *Drosophila melanogaster*. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

OROSZ, J. E.; BRAZ, L. G.; FERREIRA, A.L.; AMORIM, R. B.; SALVADORI, D. M.; YEUM, K. J.; BRAZ, J.R. C; BRAZ, M.G. Balanced anesthesia with sevoflurane does not alter redox status in patients undergoing surgical procedures. **Mutation Research**. v. 773, p. 29-33, 2014

PAES, E. R. da C.; BRAZ, M. G.; LIMA, J. T. de; SILVA, M. R. G. da; SOUSA, L. B. de; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C. de; BRAZ, J. R. C. DNA damage and antioxidante status in medical residents occupationally exposed to waste anesthetic gases. **Acta. Cir. Bras.**, v. 29, p.280-286, 2014.

ROCHA, T. L.; DIAS-JUNIOR, C. A.; VIEIRA, J. S. P.; RIZZI, V. H. G.; NOGUEIRA, F. R.; SOUZA, K. M., BRAZ, L. G.; BRAZ, M. G. Sevoflurane induces DNA damage whereas isoflurane leads to higher antioxidative status in anesthetized rats. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 6, 2015.

SARDAS, S; AYGUN, N; GAMLI, M; UNAL, Y; UNAL, N; BERK; KARAKAYA, A. E. 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.**, p. 93-100, 1998.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p. 721-732, 2003.

STEFFEY, P. E. Anestésicos inalatórios. *In*: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SILVA, P. E. S. **Efeitos genotóxicos relacionados ao uso de anestésicos**. 2015. 29f. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Residência Médico Veterinário) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Disponível em: <http://ses.sp.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=5667>.

SOUZA, K. M.; BRAZ, L. G.; NOGUEIRA, F. R.; SOUZA, M. B.; BINCOLETO, L. F.; AUN, A. G.; CORRENTE, J. E.; CARVALHO, L. R.; BRAZ, J. R. C.; BRAZ, M. G. Occupational exposure to anesthetics leads to genomic instability, cytotoxicity and proliferative changes. **Mutation Research**, v. 791-792, p. 42-48, 2016.

SZYFTER, K.; STACHECKI, I.; POCZEKAJ, M. K.; SZAUMKESSEL, M. HARRIS, J. S.; SOBCZYNSKI, P. Exposure to volatile anaesthetics is not followed by a massive induction of single-strand DNA breaks in operation theatre personnel. **Journal of Applied Genetics**, v. 57, n.3, p. 343-348, 2016.

TARDELLI, M. A; OLIVEIRA, C. G. D; MAGALHÃES, E. Parte 3: riscos biológicos e saúde ocupacional. *In*: **Bem-estar ocupacional em anesthesiologia**, Brasília: CFM, p. 373-391, 2013.

TURKAN, H; AYDIN, A; SAYAL, A. Effect of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress Due to Occupational Exposure. **World J. Surg.**, v. 29, p. 540-542. 2005.

ZHANG, W.; SHAO, X. Isoflurane Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Malignancy by Activating the Akt-Mammalian Target of Rapamycin (mTor) Signaling Pathway. **Medical Science**, v. 22, p. 44-46. 2016.