

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PERFIL DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RESIDENTES DE
CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA EXPOSTOS A GASES ANESTÉSICOS
DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM MANAUS-AM.

Bolsista: Leilane Bentes de Sousa, CNPq

MANAUS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB – S/0057/2011

PERFIL DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RESIDENTES DE
CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA EXPOSTOS A GASES ANESTÉSICOS
DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM MANAUS-AM.

Bolsista: Leilane Bentes de Sousa, CNPq

Orientador: Prof^o Dr Emerson Silva Lima

MANAUS

2012

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, está sendo desenvolvida pela acadêmica do curso de Farmácia Leilane Bentes de Sousa

RESUMO

Os gases anestésicos (halotano, isoflurano e sevoflurano) são amplamente utilizados na prática cirúrgica como potentes indutores de anestesia. Contudo, estudos demonstram que a exposição ocupacional constante a esses agentes químicos pode acarretar riscos a saúde, como o estresse oxidativo. No Amazonas, incluindo a cidade de Manaus, foco do nosso estudo, existe uma quantidade insuficiente de trabalhos que abordem a temática, além da existência de queixas dos profissionais, em virtude das sérias implicações a saúde e qualidade de vida que podem estar sofrendo pela constante permanência no centro cirúrgico, sem as devidas precauções e normas de segurança, justificando assim a realização dessa pesquisa. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento das enzimas do sistema de defesa antioxidante, Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, além das proteínas carboniladas, por meio da análise de amostras de sangue periférico de 15 residentes de anestesiologia e cirurgia (grupo exposto) de um Hospital Universitário em Manaus-AM, coletadas no início do primeiro e segundo ano de residência médica, contabilizando um ano de exposição. Estes resultados foram comparados com a análise do sangue de 30 acadêmicos do Curso de Farmácia (grupo controle) com a mesma faixa etária. Através deste estudo, pôde-se observar que não houve aumento significativo na atividade da catalase ao comparar os residentes de cirurgia e anestesiologia, expostos durante um ano aos gases anestésicos ($5,48 \pm 2,97$ k/ghb/min), com indivíduos sadios não expostos ($4,41 \pm 1,85$ k/ghb/min). Da mesma forma, não houve alteração significativa na atividade da Superóxido Dismutase entre o grupo controle e o grupo exposto ($659,2 \pm 149,09$ e $617,07 \pm 183,41$ Unid SOD/ml de sangue total, respectivamente). Em contrapartida, os residentes, após um ano de exposição, apresentaram um conteúdo de carbonila menor que o grupo controle ($1,1 \pm 4,23$ e $0,593 \pm 0,23$ nmol/mg de Carbonila), indicando que não houve estresse oxidativo. Em relação à Glutathione Peroxidase, este estudo demonstrou que a exposição aos gases anestésicos aumenta significativamente ($p < 0,05$) sua atividade após um ano de exposição comparado ao grupo controle não exposto ($4589,92 \pm 979,41$ e $4277 \pm 1678,93$ U/L de GPx, respectivamente), indicando que quantidades maiores de H_2O_2 estão sendo produzidas. Apesar da obtenção deste resultado significativo, mais estudos que abordem a temática devem ser realizados, a fim de esclarecer se a exposição ocupacional aos gases anestésicos altera não só a atividade do sistema de enzimas antioxidantes, como também outros importantes biomarcadores de estresse oxidativo.

Palavras chaves: Gases anestésicos, sistema de defesa antioxidante e estresse oxidativo.

ABSTRACT

The anesthetic gases (halothane, isoflurane and sevoflurane) are widely used in surgical practice as potent inducers of anesthesia. However, studies show that occupational exposure constant these chemical agents can cause health risks, such as oxidative stress. In Amazonas, including the city of Manaus, the focus of our study, there is an insufficient amount of work on the theme, besides the existence of complaints from professionals, because of the serious implications for the health and quality of life may be suffering by constant stay in the operating room without the proper precautions and safety standards, thus justifying the realization of this research. The objective of this study was to evaluate the behavior of the enzymes of antioxidant defense system, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and protein carbonyls, through the analysis of peripheral blood samples from 15 residents of anesthesiology and surgery (exposed group) of a University Hospital in Manaus - AM, collected at the beginning of the first and second year of residency, accounting for one year of exposure. These results were compared with analysis of the blood of 30 academics Pharmacy Course (control group) from Manaus that have the same age and are in good general health. Through this study, it was observed that there was no significant increase ($p > 0.05$) in catalase activity when comparing surgery and anesthesiology residents, for a year exposed to anesthetic gases (5.48 ± 2.97 k / ghb / min) and unexposed healthy individuals (4.41 ± 1.85 k / gHb / min). Likewise, no significant change in the Superoxide Dismutase activity between the control and exposed group (659.2 ± 149.09 and 617.07 ± 183.41 Units SOD / ml of whole blood, respectively). In contrast, residents, after a year of exposure, showed a carbonyl content of less than the control group (1.1 ± 4.23 and 0.593 ± 0.234 - nmol/mg Carbonyl), indicating no oxidative stress. Regarding glutathione peroxidase, this study demonstrated that exposure to anesthetic gases increases significantly ($p < 0.05$) activity after one year of exposure compared to unexposed control group (4589.92 ± 979.41 and 4277 ± 1678 , 93 U / L GPx, respectively), indicating that higher amounts of H₂O₂ are being produced. Despite the achievement of this significant result, further studies that address the theme should be performed in order to clarify if the occupational exposure to anesthetic gases alter not only the activity of antioxidant enzymes system, as well as other important biomarkers of oxidative stress.

Keywords: anesthetic gases, the antioxidant defense system and oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 – Variáveis antropométricas do grupo de estudo e grupo controle.....	20
Gráfico 1 – Resultados da determinação da atividade da Catalase nos eritrócitos dos indivíduos participantes de estudo.....	21
Gráfico 2 – Resultados da determinação da Superóxido Dismutase (SOD) nos eritrócitos dos indivíduos participantes de estudo.....	21
Gráfico 3 – Resultados da determinação da atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx) nos eritrócitos dos indivíduos participantes de estudo.....	22
Gráfico 4 – Resultados do Conteúdo de Carbonila ($\eta\text{mol/mg}$) no plasma dos indivíduos participantes do estudo.....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	OBJETIVOS	09
2.1	Objetivo Geral	09
2.2	Objetivo Específico	09
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
3.1	Os Gases Anestésicos (GAs)	09
3.2	Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Estresse Oxidativo (EO)	10
3.3	Sistema de Defesa Antioxidante	11
3.3.1	Catalase (CAT)	11
3.3.2	Glutationa Peroxidase (GPx)	11
3.3.3	Superóxido Dismutase (SOD)	12
3.3.4	Proteínas Carboniladas	12
3.4	Anestésicos Inalatórios e Estresse Oxidativo	13
4	MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1	Tipo de estudo	14
4.2	População de estudo	14
4.3	Amostragem	14
4.4	Crítérios de elegibilidade	14
4.5	Informações Éticas	15
4.6	Coleta de Dados	15
4.7	Amostra Biológica	15
4.8	Ensaio Laboratoriais	15
4.8.1	Superóxido Dismutase (SOD)	16
4.8.2	Catalase (CAT)	16
4.8.3	Glutationa Peroxidase (GPx)	16
4.8.4	Proteínas Carboniladas	17
4.9	Análise Estatística	17
4.10	Desenho Experimental	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A existência de doenças relacionadas a processos envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, vem merecendo especial atenção nos últimos anos (ROVER JÚNIOR, 2001). Essas doenças são decorrentes de um processo que envolve o desequilíbrio entre as ERO e o sistema de defesa antioxidante, denominado estresse oxidativo, podendo levar a consequências deletérias para a homeostase celular (KEHRER, 2000).

As ERO promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Durante a evolução, as células criaram um sistema antioxidante que pode converter ERO em elementos inativos através das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx). Proteínas como a albumina, ferritina e ceruloplasmina, também podem eliminar ERO. (BARREIROS *et al*, 2006)

A exposição ocupacional aos gases anestésicos, em profissionais que atuam no centro cirúrgico, pode resultar em efeitos adversos à saúde podendo se estender ainda por muitos anos. Os gases anestésicos atualmente utilizados, embora sejam rapidamente eliminados do organismo, por apresentarem baixa solubilidade no sangue e tecidos, podem ocasionar alterações no organismo humano (ISSA, 2002). Em pacientes, os anestésicos halogenados voláteis podem intensificar o estresse oxidativo (SIVACI *et al*, 2006; CINNELLA *et al*, 2007). Quanto a exposição ocupacional de anestesiólogos e cirurgiões, os autores verificaram aumento significativo da peroxidação lipídica plasmática (MALEKIRAD *et al*, 2005) e do índice de estresse oxidativo que apresentou correlações positivas com lesões no DNA (BAYSAL *et al*, 2009). De maneira semelhante, outras pesquisas também verificaram, no grupo exposto, diminuição significativa do sistema de defesa antioxidante por um período de três anos, em relação ao grupo controle não exposto (TÜRKAN *et al*, 2005).

Diante do exposto, este projeto visa identificar se a exposição ocupacional de residentes aos gases anestésicos, utilizados num Hospital de Manaus – AM desencadeiam alterações no sistema de defesa antioxidante decorrentes do estresse oxidativo. Este estudo torna-se importante para inferir o grau dos danos a que são submetidos os profissionais da saúde dessa unidade de saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a interferência dos gases anestésicos no sistema de defesa antioxidante em residentes de cirurgia e anestesiologia num Hospital Universitário em Manaus-AM.

2.2 Objetivo Específico

Avaliar o perfil das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa Peroxidase (GPx), além das proteínas carboniladas, importantes biomarcadores de estresse oxidativo, em residentes de cirurgia e anestesiologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas – HUGV em Manaus-AM frente a exposição aos gases anestésicos (isoflurano, halotano e sevoflurano) no centro cirúrgico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os Gases Anestésicos (GAs)

Os gases anestésicos tiveram a primeira descrição clínica para uso em anestesia geral em torno de 1950. Um dos primeiros agentes empregados foi o clorofórmio. Sua ação foi descrita como sendo “envenenamento”, e a ele foi atribuída grave toxicidade hepática e renal. Nos anos seguintes, os GAs foram investigados e estudados intensamente, e hoje são amplamente empregados na prática anestésica. Sabe-se que a maioria dos mecanismos pelos quais os GAs provocam seus efeitos tóxicos envolve seus metabólitos, que são produtos da biotransformação mediada pelo citocromo P-450. (KENNA, 1995) Os anestésicos inalatórios atualmente usados são o halotano, o enflurano, o isoflurano ($\text{CHF}_2\text{-O-CHCl-CF}_3$) e o sevoflurano ($\text{CH}_2\text{F-O-CH-(CF}_3)_2$) (DAL MOLIN, 2005).

O isoflurano e o sevoflurano são anestésicos administrados por via respiratória nas fases de indução e manutenção da anestesia geral. Em baixas doses, induzem hipnose, analgesia, amnésia, euforia, excitação e hiper-reflexia. Com concentrações mais altas, promovem sedação profunda, relaxamento muscular e redução das respostas motoras e autonômicas ao estímulo nocivo. (FERREIRA, 2004)

3.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Estresse Oxidativo (EO)

As ERO, chamadas também como radicais livres (RL), por definição, são caracterizadas por qualquer espécie capaz de possuir existência independente de pelo menos um elétron desemparelhado, ou seja, pelo menos um elétron isolado em um orbital atômico ou molecular (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999). Esse tipo de elétron pode reagir com átomos isolados (hidrogênio, íons metálicos, etc.) ou com moléculas (açúcares, proteínas, lipídeos, DNA, etc.) sendo esta propriedade biologicamente relevante (SLETER, 1984; HALLIWEL, 1987; SIES, 1993). Caracterizando, sua capacidade de ocasionar diversos danos às macromoléculas, como a peroxidação lipídica e conseqüentemente a destruição de membranas e células (FRIDOVICH, 1978), ou a quebra de fita de DNA (MENEHINI, 1988).

Dentre as ERO, temos o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que apesar de apresentar baixa reatividade, é capaz de inativar as enzimas catalase e glutathione peroxidase (FRIDOVICH, 1986). O radical superóxido apresenta pequena reatividade molecular, e é duvidosa a sua capacidade de causar danos significativos às estruturas celulares. Esta ERO pode reagir com o óxido nítrico para formar o peroxinitrito, capaz de oxidar e transferir nitrato para aminoácidos de várias proteínas pulmonares, causando a inibição dessas proteínas (ANDRADE JUNIOR et al, 2005). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também é capaz de inativar enzimas, principalmente pela oxidação de grupos tios essenciais, podendo desta forma, destruir estruturas celulares (EATON, 1991), entre outros danos, como a quebra de fita simples no DNA pela formação de espécies mais reativas a distância. O peróxido de hidrogênio pode reagir com metais redox-ativos como ferro e cobre, produzindo novas ERO. Além disso, possui meia vida longa e grande capacidade de se difundir através das membranas celulares hidrofóbicas (com difusão semelhante à da água), ampliando o efeito tóxico da reoxigenação (ANDRADE JUNIOR et al, 2005). Outro tipo de ERO é o radical hidroxila (HO^{\cdot}), uma das espécies mais reativas que se conhece, que tem capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas biológicas, modificando suas funções (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de ERO (ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além do desequilíbrio do sistema de defesa de antioxidante endógeno, que protegem a integridade e a função celular (BURKE et al, 2002). Os mecanismos pelos quais as células são atacadas pelas ERO são muito complexos e ainda não estão perfeitamente claros. A vida em aerobiose se

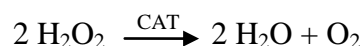
caracteriza pela contínua produção de ERO, que é contrabalançada pelo seu consumo por meio de defesas antioxidantes não-enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou o organismo se encontra sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos (BELLÓ-KLEIN, 2002; BUSQUETS *et al*, 2002).

3.3 Sistema de defesa antioxidante

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes, retardam ou inibem a oxidação. Podem ser de dois tipos principais, os enzimáticos e não enzimáticos. As defesas antioxidantes enzimáticas são constituídas por enzimas como a Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD). As defesas antioxidantes não enzimáticas compreendem as proteínas que minimizam a biodisponibilidade de catalisadores de reações que produzem ERO, tais como os íons ferro e cobre, proteínas que protegem biomoléculas contra danos, por outros mecanismos, e substâncias de baixo peso molecular que sequestram ERO (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999).

3.3.1 Catalase (CAT)

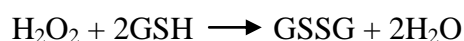
A Catalase localiza-se predominantemente em peroxissomos, onde catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular:



Sua atividade pode ser inibida pela ação do superóxido. Essa inibição recíproca pelo substrato de uma enzima sobre a outra é vista como um mecanismo regulatório para que haja uma atividade acoplada entre as duas enzimas (KONO e FRIDOVICH, 1982).

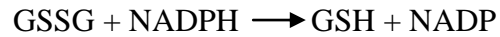
3.3.2 Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPX catalisa a redução de H_2O_2 em H_2O , utilizando glutathione, na sua forma reduzida (GSH), como substrato:



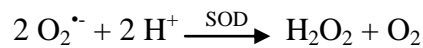
Quando a GSH é oxidada na reação, haverá a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, formando GSSG. Queda nos níveis endógenos de GSH

pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão elevada de GSH/GSSG para garantir a disponibilidade de GSH. Para tanto, é necessária a constante regeneração do GSH, que se dará por meio da ação da enzima Glutathione Redutase (GR) (POWERS, 1999).



3.3.3 Superóxido Dismutase (SOD)

A Superóxido Dismutase reduz o superóxido em peróxido de hidrogênio, segundo a reação:



A SOD foi a primeira enzima capaz de metabolizar ERO a ser descoberta (McCord e Fridovich, 1969). O peróxido de hidrogênio já foi demonstrado como inibidor da sua atividade (Bray *et al*, 1974). Trabalhos demonstram que a SOD pode ter um efeito pró-oxidante, visto que uma elevada atividade sem aumento compensatório da atividade da catalase promoveria um excesso de peróxido, que poderia reagir com metais e formar o radical hidroxil (KELNER *et al*, 1995). Embora o H_2O_2 não seja um verdadeiro ERO, pode reagir com metais redox-ativos como ferro e cobre, produzindo novos ERO. Além disso, tem meia vida longa e grande capacidade de se difundir através das membranas celulares hidrofóbicas (com difusão semelhante à da água), ampliando o efeito tóxico da reoxigenação. (ANDRADE JUNIOR *et al*, 2005)

O equilíbrio entre a atividade das três principais enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) é de extrema importância para a remoção dos intermediários tóxicos de oxigênio dos sistemas biológicos. A atividade da SOD, que consiste na dismutação de íons superóxido formando peróxido de hidrogênio, deve ser complementada pela CAT e GPx, gerando água e oxigênio molecular (CAT) ou água e glutathione oxidada (GPx) (SIMON-GIAVAROTTI, 2001).

3.3.4 Proteínas Carboniladas

Os radicais livres podem atacar uma série de biomoléculas, iniciando reações em cascata onde um radical reage com um composto gerando novos radicais. Estudos demonstram que as proteínas também são alvos de ataque dos radicais livres. A oxidação de alguns aminoácidos – como lisina e arginina - resulta na formação de derivados carbonílicos,

tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína. Deste modo, um conteúdo de carbonila significativo no plasma humano pode ser considerado um importante marcador de presença de ERO e conseqüentemente de possível estresse oxidativo. (PINHO, 2006)

3.4 Gases Anestésicos (GA) e Estresse Oxidativo (EO)

Os gases anestésicos são metabolizados primariamente no fígado, mas também o são em outros tecidos, como rins e pulmões. O isoflurano e sevoflurano são metabolizados da mesma forma, sofrem oxidação do alfa-carbono, provavelmente pelo citocromo P-450 2E1 E 3A. (MILLER, 2000 *apud* DAL MOLLIN, 2005)

Os GAs são fortemente lipofílicos, e os danos das suas reações intermediárias podem ocorrer em decorrência do ataque aos ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas plasmáticas, pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante a biotransformação desses agentes. (DAL MOLIN, 2005)

Estudos têm demonstrado que a metabolização dos anestésicos inalatórios está diretamente relacionada com a formação de ERO. A biotransformação hepática dos GAs produz flúor inorgânico e hexafluorisopropanol, que têm potencial nefrotóxico e hepatotóxico (DARLING, 1997; EBERT, 1998; NISHIYAMA, 1998; MAZZE, 2000 *apud* DAL MOLIN, 2005). No fígado, monooxigenases, como a isoforma P-450 2E1, possuem alta atividade NADPH-oxidase, por meio da qual, espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas, como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Conseqüentemente podem induzir lipoperoxidação (LPO) potencialmente lesiva (LUCENA, 2004), enfraquecendo o sistema de enzimas antioxidantes em vários tecidos (TÜRKAN *et al*, 2005).

Considerando que as ERO são responsáveis por diversos danos celulares, o reconhecimento dos agentes que possam promover a formação de ERO e do mecanismo dessa formação se torna essencial para a prevenção do desenvolvimento de patologias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Para a avaliação do perfil das enzimas do sistema antioxidante de residentes de cirurgia e anestesiologia de um Hospital Universitário em Manaus-AM frente a exposição aos gases anestésicos, optou-se por um estudo do tipo Caso-Controle, analítico e prospectivo.

4.2 População de estudo

Residentes da área de anestesiologia e cirurgia do Hospital Universitário Getúlio Vargas em Manaus-AM expostos no período do primeiro ano letivo da residência médica. A saúde e estilo de vida foram analisados, quanto a histórica médica, tempo de exposição ocupacional aos gases anestésicos, tabagismo, consumo de drogas, doenças virais, exames radiodiagnósticos, hábitos alimentares e atividade física.

4.3 Amostragem

Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos com EDTA (anticoagulante) de todos os residentes expostos no início do período do primeiro e segundo anos letivos da residência médica, contabilizando um ano de exposição aos gases anestésicos, no Hospital Universitário Getúlio Vargas, sendo ao todo 15 residentes considerados o grupo exposto. Da mesma forma, amostras de sangue venoso foram coletadas de 30 acadêmicos de farmácia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM como sendo o grupo controle.

4.4 Critérios de elegibilidade

Foram incluídos neste estudo, residentes de cirurgia e anestesiologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas da cidade de Manaus – AM (grupo exposto) e acadêmicos do curso de farmácia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM (grupo controle). Os participantes passaram por uma breve entrevista sobre questões de saúde e estilo de vida, não foram incluídos os portadores de doença maligna, genética, diabetes e os que fazem uso regular de álcool, tabaco, vitaminas antioxidantes e “drogas ilícitas”.

4.5 Informações Éticas

Antes da coleta de sangue, os participantes do projeto foram conscientizados a respeito da finalidade do estudo e na concordância assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UFAM (n. CAE: 0044.0.115.000-10).

Os pesquisadores se responsabilizaram pela confidencialidade das informações fornecidas pelos voluntários.

As amostras de sangue foram identificadas por algarismos arábicos. O volume de sangue coletado foi descartado de acordo com a RDC 306/2004 – ANVISA.

4.6 Coleta de dados

Foi realizada uma breve entrevista sobre questões de saúde, histórica médica, tempo de exposição ocupacional aos gases anestésicos e fatores relacionados ao estilo de vida, como tabagismo, consumo de drogas, doenças virais, vacinações recentes, exames radiodiagnósticos, hábitos alimentares e atividade física.

4.7 Amostra biológica

A amostra biológica utilizada foi o sangue periférico e a coleta realizou-se em tubos contendo EDTA (anticoagulante). Para o teste da Superóxido Dismutase e Catalase utilizou-se o concentrado de hemácias, para o teste da Glutathione Peroxidase utilizou-se o sangue total e para o teste das proteínas carboniladas utilizou-se o plasma.

4.8 Ensaio laboratoriais

A quantificação de estresse oxidativo só pode ser realizada de maneira indireta, uma vez que as ERO são altamente reativas (BURKE *et al*, 2002). Tendo grande instabilidade e meia-vida curta, não se deslocam para longe de seu sítio de formação, interagindo com qualquer biomolécula adjacente para se estabilizarem. Várias manifestações desse processo podem ser utilizadas na estimativa do grau de EO, a realizada neste projeto é a quantificação de substâncias antioxidantes, como Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e

Glutationa peroxidase (GPx), além das proteínas carboniladas, importantes biomarcadores de estresse oxidativo.

4.8.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Sun *et al* (1988). O princípio se dá pela inibição da redução do nitroblue tetrazolium (NBT). A riboflavina na presença de O₂ e da doação de elétrons de aminoácidos - como a metionina - gera ânions superóxidos os quais são utilizados como base no método. A redução do NBT por esses ânions forma uma coloração azul a qual foi mensurada em comprimento de onda de 560 nm no leitor de Elisa (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter).

4.8.2 Catalase (CAT)

A metodologia da CAT foi de acordo com Aebi (1984) e possui como princípio de reação o acompanhamento da decomposição do peróxido de hidrogênio pela diminuição da absorvância em 240 nm, e, ainda, oxidação dos doadores de oxigênio como etanol, metanol, fenol, consumindo 1 mol de peróxido. Caso não haja a decomposição de peróxido de hidrogênio, esse composto pode reagir com metais e se transformar em radical hidroxila, gerando estresse oxidativo ao organismo. Assim, a análise de CAT é um importante marcador de defesa antioxidante. As amostras foram adicionadas à solução tampão e, logo depois, acrescentou-se uma solução de H₂O₂. As amostras foram avaliadas por espectrofotometria no ultravioleta a 240 nm.

4.8.3 Glutationa Peroxidase (GPx)

A metodologia da GPx se deu conforme Paglia e Valentine (1967). Como princípio, a amostra (sangue heparinizado) exposta a Hidroperóxido de cumeno leva a glutaciona peroxidase (GPX) a catalisar a oxidação da glutaciona (GSH). Na presença da glutaciona redutase (GR) e NADPH a glutaciona oxidase (GSSG) é imediatamente convertida na forma reduzida como uma oxidação concomitante da NADPH a NADP⁺. Utilizou-se o kit Ransel da marca Randox. A amostra foi avaliada em espectrofotômetro. A determinação ocorre com a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 340 nm.

4.8.4 Proteínas Carboniladas

As dosagens das proteínas foram feitas de acordo com Bradford (1976). Para determinação de Proteínas Carboniladas utilizou-se como amostra o plasma. De acordo com a ação das espécies reativas de oxigênio (ERO) alguns aminoácidos são modificados - como a lisina e a arginina - fornecendo derivados carbonílicos. O procedimento consistiu em precipitar as proteínas e reagí-las com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formou-se então a base Schiff, produziu-se a hidrazona correspondente, a qual pôde-se analisar espectrofotometricamente no leitor de Elisa (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter) com comprimento de onda de 385 nm.

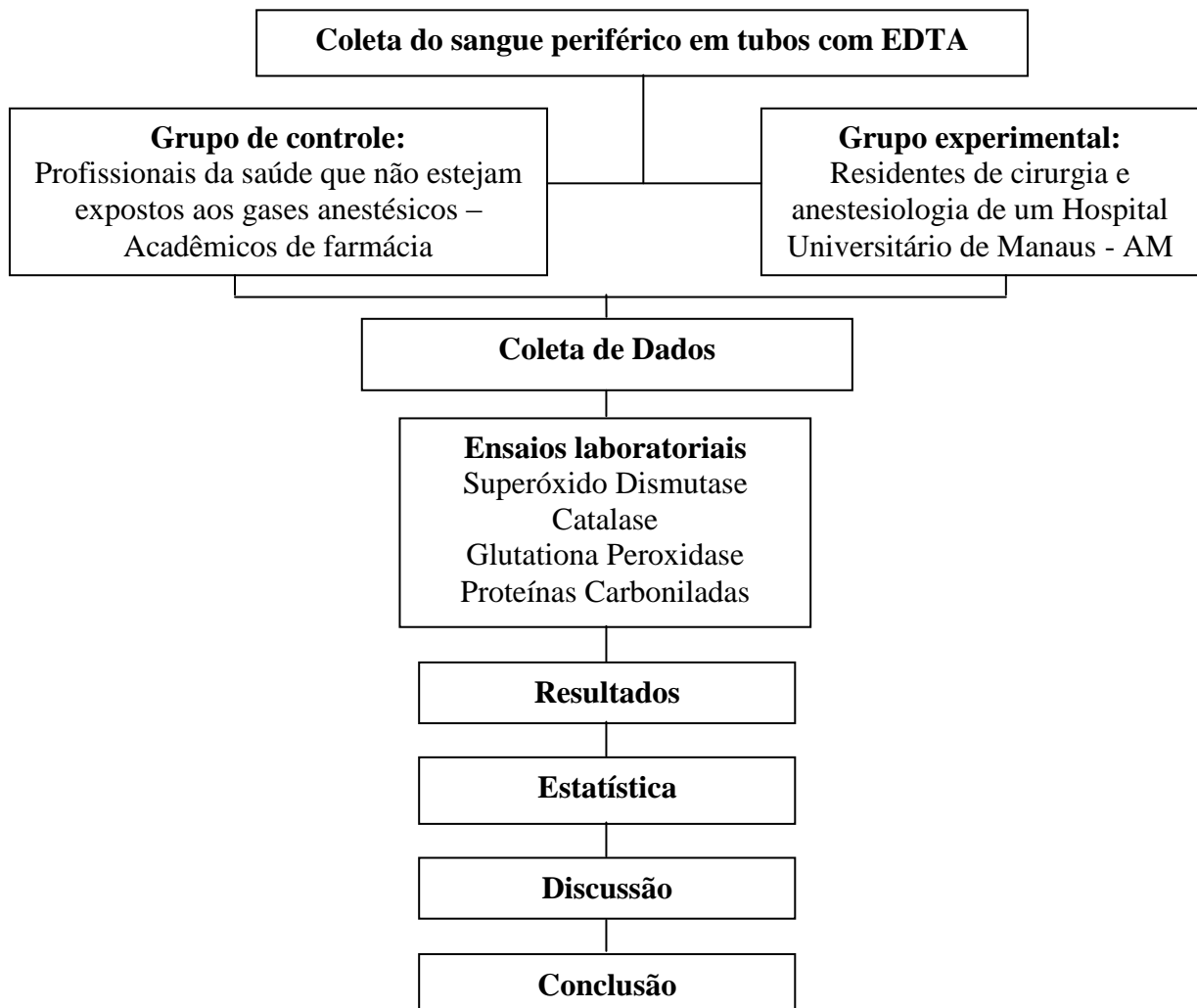
4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por meio do programa BioEstat 5.0 e através do teste de normalidade os dados foram caracterizados. Para as variáveis antropométricas foi utilizada a análise de variância. As variáveis paramétricas (média \pm desvio padrão) foram avaliadas utilizando-se ANOVA – one way, seguida pelo teste de Tukey, enquanto que as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Níveis de significância menores que 5% foram considerados significativos.

4.10 Desenho experimental

Os residentes (grupo exposto) e os acadêmicos de farmácia (grupo controle) que preencheram os critérios determinados pelos pesquisadores foram convidados a participar da pesquisa, em seguida, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado. Amostras de sangue venoso (8 mL) foram coletados e distribuídos em tubos com EDTA no início do período do primeiro e segundo anos letivos de residência médica em anestesiologia e cirurgia, para os testes da Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase e proteínas carboniladas.

Os testes das enzimas do sistema de defesa antioxidante foram realizados no Laboratório de Atividade Biológica I da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

FLUXOGRAMA:

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gases anestésicos podem influenciar a atividade do sistema de enzimas antioxidantes, promovendo a formação de radicais livres e conseqüentemente estresse oxidativo. Estudos têm demonstrado que a exposição ocupacional de anestesiolistas e cirurgiões, levam a um aumento significativo da peroxidação lipídica plasmática (MALEKIRAD *et al*, 2005) e do índice de estresse oxidativo que apresentou correlações positivas com lesões no DNA (BAYSAL *et al*, 2009). De maneira semelhante, outras pesquisas também verificaram, no grupo exposto, diminuição significativa do sistema de defesa antioxidante por um período de três anos, em relação ao grupo controle não exposto (TÜRKAN *et al*, 2005).

O presente estudo inclui 15 residentes de cirurgia e anestesiologia de um Hospital Universitário em Manaus-AM expostos durante o período de um ano aos gases anestésicos, referente ao grupo de estudo (grupo exposto), sendo homens e mulheres com média de idade 28,6±2 anos (média±DP). Foram selecionados, como grupo controle, 30 acadêmicos do curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas saudáveis com média de idade igual a 23,9±4,5 anos (média±DP) de ambos os sexos. (Tabela 1)

Por meio da análise antropométrica, pode-se observar que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre a população de estudo e o grupo controle em relação ao gênero. O grupo de estudo (exposto aos gases anestésicos) apresentou uma porcentagem elevada de homens (86,6%) em comparação ao grupo controle (60%). As variáveis de consumo de bebida alcoólica e passagem recente por estresse também se comportaram da mesma forma, nos dois casos, o grupo exposto apresentou uma porcentagem maior (60%) comparado ao grupo controle (36,7%). Isto pode influenciar diretamente nos resultados da avaliação de estresse oxidativo, já que estudos comprovam que estresse físico, emocional ou misto e consumo de bebida alcoólica em excesso modificam a capacidade antioxidante do organismo, reduzindo tanto a atividade dos mecanismos enzimáticos como a dos não-enzimáticos, levando ao estado de desequilíbrio chamado estresse oxidativo (CARRARD *et al*, 2008; SILVA *et al*, 2006).

	Grupo Controle (n=30)	Grupo Exposto - Residentes (n=15)	P-valor*
Informações Gerais			
Idade	23,9±4,5	28,6±2	0,5166
Sexo Masculino (%)	18/30 (60)	13/15 (86,6)	0,0280
Peso (kg)	72,4±16,6	76,9±12,7	0,7127
Altura (m)	1,7±0,1	1,7±0,1	-
IMC	24,7±4,5	25,4±3,6	0,9212
Fumo (%)	0/30 (0)	0/15 (0)	-
Alimentação Saudável	23/30 (76,6)	9/15 (60)	0,1555
Consumo de bebida alcoólica	11/30 (36,7)	9/15 (60)	0,0178
Consumo de drogas (%)	0/30 (0)	0/15 (0)	-
Histórica Médica			
Faz tratamento quimioterápico ou radioterapia (%)	0/30 (0)	0/15 (0)	-
Faz uso de vitamina/antioxidante (%)	4/30 (13,3)	1/15 (6,6)	0,1331
Possui doença grave (%)	0/30 (0)	0/15 (0)	-
Passou por estresse recentemente (%)	11/30 (36,7)	9/15 (60)	0,0178
Atividade profissional			
Especialidade médica	-	Anestesiologia/ Cirurgia	-
Ano de residência	-	R1 / R2	-
Frequência no centro cirúrgico (horas/semana)	-	40	-

Tabela 1 – Análise antropométrica do grupo de estudo e grupo controle

*Comparação entre o grupo controle e o grupo exposto. Valores significativos em negrito ($p < 0,05$).

Em se tratando da análise do sistema de enzimas antioxidantes, pôde-se observar que não houve aumento significativo ($p > 0,05$) na atividade da CAT ao comparar os residentes de cirurgia e anestesiologia ($5,48 \pm 2,97$ k/ghb/min) expostos durante um ano aos gases anestésicos (grupo exposto R2) com indivíduos sadios não expostos ($4,41 \pm 1,85$ k/ghb/min) (Gráfico 1). Este resultado não significativo é o mesmo apresentado por uma pesquisadora de Porto Alegre que avaliou os valores séricos de CAT em animais submetidos a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com isoflurano ou sevoflurano (MOLIN, 2005).

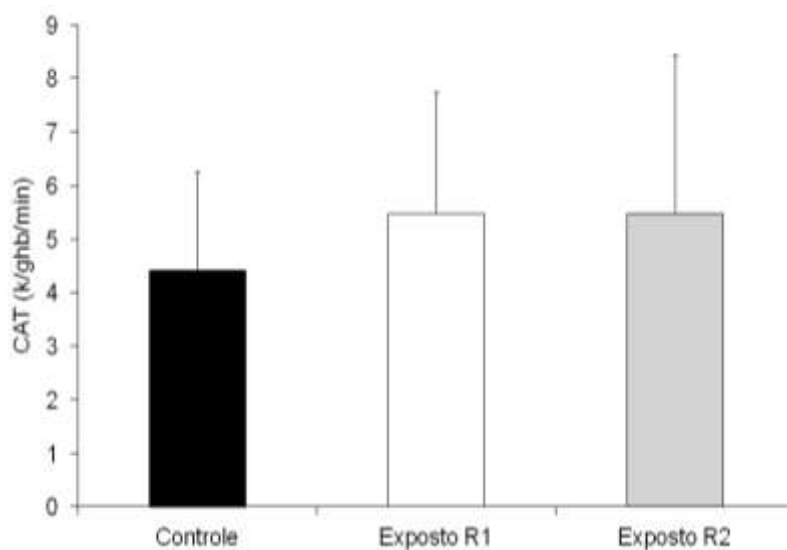


Gráfico 1 - Atividade da Catalase nos eritrócitos dos indivíduos participantes de estudo. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão, considerando os valores do grupo controle (n=4) e grupo exposto (n=6).

A atividade da enzima Superóxido Dismutase, que consiste na dismutação do radical tóxico superóxido formando peróxido de hidrogênio, deve estar acoplada a atividade da catalase. Como esta não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo exposto, era de se esperar que a SOD também se comportasse da mesma forma e foi o que realmente ocorreu. Tanto o grupo exposto R1 quanto o R2 não apresentaram diferença significativa (721,6 \pm 264,63 e 617,07 \pm 183,41 Unid SOD/ml de sangue total, respectivamente) se comparado ao grupo controle não exposto (659,2 \pm 149,09 Unid SOD/ml de sangue total).

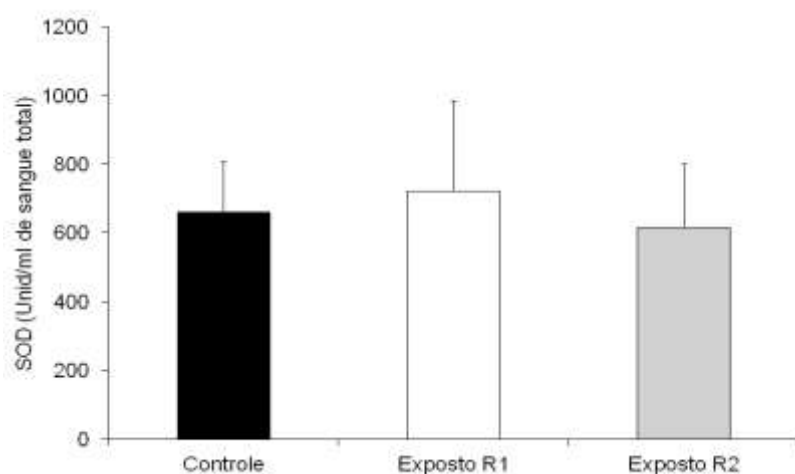


Gráfico 2 – Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) nos eritrócitos dos indivíduos participantes de estudo. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão, considerando os valores do grupo controle (n=30) e grupo exposto (n=15). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Em relação à Glutathiona Peroxidase, este estudo demonstrou que a exposição aos gases anestésicos aumenta significativamente ($p < 0,05$) sua atividade após um ano de exposição comparado ao grupo controle não exposto (Grupo controle $4277 \pm 1678,93$, Grupo exposto R2 $4589,92 \pm 979,41$ – média U/L de GPx \pm DP). A Glutathiona Peroxidase catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água, portanto o aumento da sua atividade indica que quantidade maiores de H_2O_2 estão sendo produzidas (POWERS, 1999). Isto pode ser explicado considerando a hipótese de formação de peróxido de hidrogênio via biotransformação hepática dos gases anestésicos. No fígado, monooxigenases, como a isoforma P-450 2E1, possuem alta atividade NADPH-oxidase, por meio da qual, espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas, como o peróxido de hidrogênio. (LUCENA, 2004),

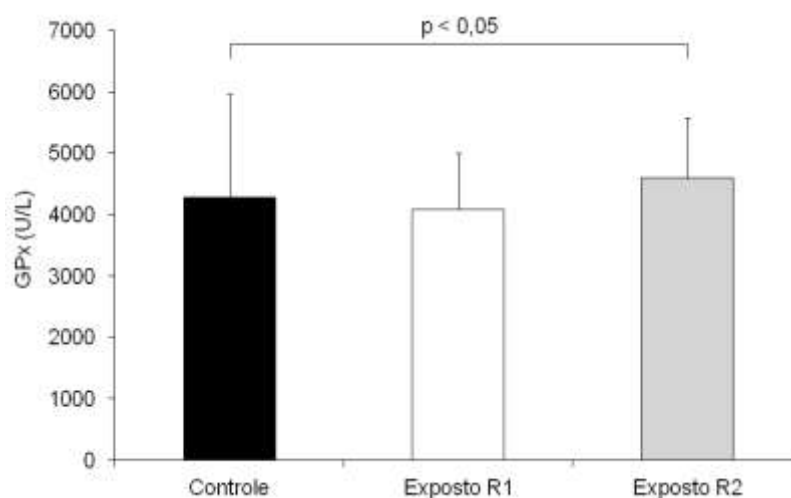


Gráfico 3 - Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx) nos eritrócitos dos indivíduos participantes de estudo. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão, considerando os valores do grupo controle ($n=30$) e grupo exposto ($n=15$). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Em relação às proteínas carboniladas, o grupo controle apresentou significativamente ($p < 0,05$) um maior conteúdo de Carbonila em relação ao grupo exposto no início do primeiro ano de residência representado como Exposto R1 (Grupo controle $1,1 \pm 4,23$; Grupo Exposto R1 $0,727 \pm 0,383$ – η mol/mg de Carbonila \pm DP). (Gráfico 2) Isto pode ser explicado dado a possibilidade de o grupo controle, durante a graduação, terem sido expostos a algum tipo de agravante que possa ter elevado os níveis de produção de ERO, neste momento da pesquisa, e promover o aumento do conteúdo de carbonila, comparado com o grupo exposto R1. De acordo com a análise antropométrica, 36,7% dos integrantes do grupo controle fazem

uso de bebida alcoólica e passaram por estresse físico ou emocional recentemente, podendo justificar o resultado obtido, já que estudos comprovam que esses agravantes podem levar a produção de radicais livres (CARRARD *et al*, 2008; SILVA *et al*, 2006).

O grupo exposto R2, representa a análise após um ano de exposição aos gases anestésicos no centro cirúrgico. Observando o GRÁFICO 4, este grupo apresentou uma diferença significativa ($p < 0,01$) de conteúdo de carbonila comparado ao grupo controle não exposto (Grupo controle $1,1 \pm 4,23$; Grupo Exposto R2 $0,593 \pm 0,234$ – $\eta\text{mol/mg}$ de Carbonila \pm DP). As ERO podem atacar algumas proteínas e promover a oxidação de alguns aminoácidos, resultando na formação de derivados carbonílicos, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína (PINHO, 2006). Contudo, como o grupo controle apresentou um conteúdo de carbonila maior que o grupo exposto, este resultado deve ser descartado e outras análises de biomarcadores de estresse oxidativo devem ser realizadas.

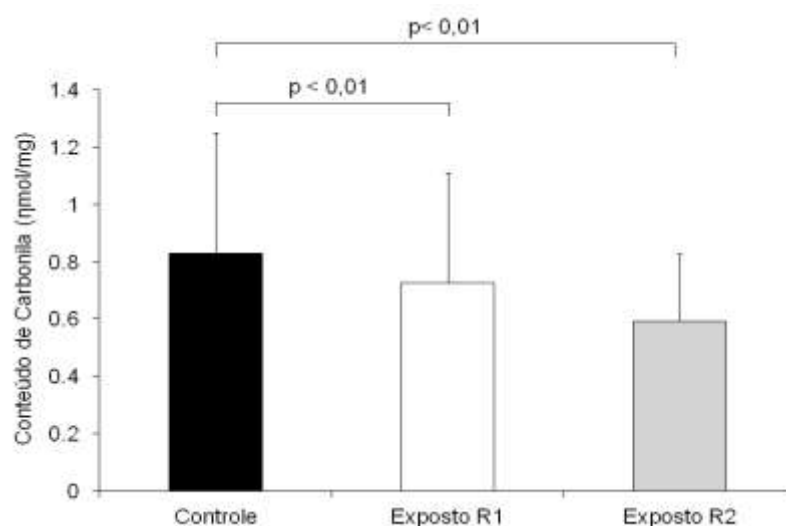


Gráfico 4 - Conteúdo de Carbonila ($\eta\text{mol/mg}$) no plasma dos indivíduos participantes de estudo. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão, considerando os valores do grupo controle ($n=30$) e grupo exposto ($n=15$). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Considerando, que de três enzimas do sistema antioxidante e um biomarcador de estresse oxidativo, proteínas carboniladas, apenas uma enzima, a GPx, apresentou resultado significativo entre o grupo exposto durante um ano aos gases anestésicos e o grupo controle, não é possível dizer com clareza se os gases anestésicos influenciam diretamente a atividade do sistema de enzimas antioxidantes, sendo portanto, necessária a realização de mais estudos que abordem a temática durante um período maior de tempo.

6 CONCLUSÃO

Houve um aumento significativo da atividade da glutathione peroxidase nos residentes no final do primeiro ano (R2), quando comparado ao grupo controle. Contudo, o presente estudo não demonstrou alterações significativas nos níveis das outras enzimas estudadas, apesar de ser observada uma tendência ao aumento da atividade dessas enzimas como resposta ao possível estresse oxidativo causado pela inalação dos gases anestésicos nos indivíduos expostos.

Apesar da obtenção deste resultado significativo, mais estudos que abordem a temática devem ser realizados, afim de esclarecer se a exposição ocupacional aos gases anestésicos alteram não só a atividade do sistema de enzimas antioxidantes, como também outros importantes biomarcadores de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, Capítulo 105, p. 121-126, 1984.
- ANDRADE JUNIOR, Dahir Ramos de; SOUZA, Rodrigo Becco de; SANTOS, Sânia Alves dos e ANDRADE, Dahir Ramos de. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Bras. Pneumol.* [online]. 2005, vol.31, n.1, pp. 60-68. ISSN 1806-3713.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Revista Química Nova*, São Paulo, v. 29, No. 1, p. 113-120, jan./fev. 2006.
- BAYSAL, Z. *et al.* Oxidative status and DNA damage in operating room personnel. *Clin Biochem*, v. 42, p. 189-193, 2009.
- BELLÓ-KLEIN, A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI, N. P. Estresse oxidativo e antioxidantes. Editora da ULBRA. Canoas, 2002. Pág. 15-19.
- BUSQUETS, J. *et al.* Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplant Proc.*, v. 34, p. 252-253, 2002.
- BURKE, A.; FITZ, G.; LUCEY, M. R. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation*, v. 74, p. 217-221, 2002.
- CARRARD, V. C. *et al.* Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 54(1). Porto Alegre, 2008.
- CINNELLA, G. *et al.* Effect of propofol, sevoflurano and desflurane on systemic redox balance. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 20, p. 585-593, 2007.
- COHEN, E. N. *et al.* Occupational disease in dentistry and chronic exposure to trace anesthetic gases. *J Am Dent Assoc*, v. 101, p. 21-31, 1980.

CORBETT, T. H. Cancer and congenital anomalies associated with anesthetics. *Ann N Y Acad Sci*, v. 271, p. 58-66, 1976.

DAL MOLIN, S. Z. F. Anestésicos inalatórios e seu efeito sobre o dano de isquemia e reperfusão: comparação entre isoflurano e sevoflurano em modelo experimental em fígado de ratos. 2005. 72f. Dissertação (Mestrado em Gastroenterologia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Gastroenterologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Faculdade de Medicina, Porto Alegre.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, S. L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica do Brasil*, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, M. B. C. *Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Reacional. Anestésicos Gerais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap 16. Pág. 157-185.

FRANCO, G. *et al.* Behaviour of urinary D-glucaric acid excretion in surgical patients and anaesthesiology staff acutely exposed to isoflurane and nitrous oxide. *Med Lav*, v. 82, p. 572-532, 1991.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, v. 201, p. 875-880, 1978.

GREEN, C. J. Anaesthetic gases and health risks to laboratory personnel: a review. *Lab Anim*, p.397-403, 1981.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.*, v. 1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Oxford University Press, 1999.

ISSA - International Section on the Prevention of Occupational Risks in Health Services (2002) Safety in the use of anesthetic gases ISSA Prevention Series nº 2042 (E). Consensus

paper from the basic German and French documentation working document for occupational safety and health specialists.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43-50.

KELNER, M. J. *et al.* Transfection with human copper-zinc superoxide dismutase induces bidirectional alterations in other antioxidant enzymes, proteins, growth factor response, and paraquat resistance. *Free Radic Biol Med*, v. 18, p. 497-506, 1995.

KENNA *et al.* The organ toxicity of inhaled anesthetics. *Anesthesia Analgesia*, v. 81, p. 51-66, 1995.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide Radical Inhibits Catalase. *J Biol Chem*, v. 257, n. 10, p. 5751-5754, 1982.

LUCCHINI, R. *et al.* Neurotoxicity in operating room personnel working with gaseous and nongaseous anesthesia. *Int Arch Occup Environ Health*, v. 68, p. 188-192, 1996.

LUCENA, F. J.; REZENDE, A. A.; RODRIGUES, S. J.; ALMEIDA, M. G. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos com sevoflurano. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 54, n. 5, p. 640-649, 2004.

MALEKIRAD, A. A. *et al.* Oxidative stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases. *Hum Exp Toxicol*, v. 24, p. 597-601, 2005.

MENEGHINI, R. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. *Mutat. Res.*, p. 215-230, 1988.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. J. *Lab. Clin. Med.*, 1967. Pág. 70-158.

PINHO, R.A. (Org.). *Fundamentação e padronização de ensaios laboratoriais*. Universidade do extremo sul catarinense – UNESC. Criciúma, SC, Brasil. 2006.

POWERS, S. K.; JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.31, p. 987-997, 1999.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Revista Química Nova*, Campinas, v. 24, No. 1, p. 112-119, 2001.

SIES, H. Strategies os antioxidant defense. *European J. Biochem*, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, Adelino S. R.; SANTHIAGO, Vanessa e GOBATTO, Cláudio A.. Compreendendo o overtraining no desporto: da definição ao tratamento. *Rev. Port. Cien. Desp.* [online]. 2006, vol.6, n.2, pp. 229-238. ISSN 1645-0523.

SIMON-GIAVAROTTI, K. A. Estudo do estresse oxidativo hepático induzido por lindano em um modelo de hipertireoidismo experimental. 2001. 159f. Tese de doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SIVACI, R. *et al.* Cytotoxic effects of volatile anesthetics with free radicals undergoing laparoscopic surgery. *Clin Biochem*, v. 39, p. 293-298, 2006.

SLATER, T. F. Free-radical in tissue injury. *Biochem. J.*, v. 222, p. 1-15, 1984.

SUN, I. Y.; OBERLEY, L. W.; VING, U. A simple method for clinical assay of Superoxide Dismutase. *Clinical Chemistry*, v. 4, p. 497-500, 1988.

SWEENEY, B. *et al.* Toxicity of bone marrow in dentists exposed to nitrous oxide. *Br Med J*, v. 291, p. 567-569, 1985.

TÜRKAN, H.; AYDIN, A.; SAYAL, A. Effect of volatile anesthetics on oxidative stress due to occupational exposure. *World J Surg*, v. 29, p. 540-542.