



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Nayara Micarelli de Arruda

Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Anestesiologia, área de Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Mariana Gobbo Braz

Coorientador: Prof. Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz

Botucatu

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Nayara Micarelli de Arruda

**Comparação de marcadores inflamatórios em
pacientes cirúrgicos sob anestesia com
desflurano ou desflurano associado ao óxido
nitroso**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em
Anestesiologia, área de Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Gobbo Braz

Coorientador: Prof. Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Arruda, Nayara Micarelli de.

Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso / Nayara Micarelli de Arruda. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Mariana Gobbo Braz
Coorientador: José Reinaldo Cerqueira Braz
Capes: 40102130

1. Anestésicos inalatórios. 2. Citocinas. 3. Óxido nitroso. 4. Hormônios. 5. Procedimentos cirúrgicos eletivos.

Palavras-chave: Anestésicos inalatórios; Citocinas; Hormônios; Óxido nitroso; Procedimentos cirúrgicos eletivos.

Dedicatória

Ao mestre Jesus, por me iluminar e clarear meus pensamentos em todos os momentos de dúvida, dificuldades, desespero e dor, por me guiar sempre pelo caminho de luz e acalantar meu coração

À minha mãe Maria de Fátima Micarelli (in memorian), mulher forte e guerreira que sempre foi minha fonte de inspiração, que dedicou uma vida toda a mim, trabalhou arduamente, não medindo esforços, para me dar o melhor estudo. Abraçou meus sonhos e me deu asas para conquistar cada um deles. A alegria em concluir esse trabalho é uma vitória não só minha, mas também dela

À minha irmã Noeli Alves Rodrigues Venturelli, segunda mãe, e ao meu cunhado Antonio Cyro Venturelli, por ter me criado como filha. Fontes de orgulho e inspiração sempre, não existe sentimento capaz de expressar tamanha gratidão por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim

À minha sobrinha Natália Venturelli, meu pedacinho de amor mais especial dessa vida, luz para os meus dias, gratidão por ter você

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora

Doutora Mariana Gobbo Braz

Agradeço minha orientadora pela oportunidade de desenvolvimento desse projeto, pela paciência e dedicação com tanto amor ao trabalho, por acreditar em mim e estar sempre disposta a ensinar, agregando imenso conhecimento à minha vida.

Ao meu coorientador

Professor Emérito José Reinaldo Cerqueira Braz

Ao meu coorientador pelos ensinamentos, dedicação ao desenvolvimento desse trabalho, homem de grande sabedoria pelo qual eu tenho tamanha admiração e respeito.

Agradecimentos

A todos os pacientes que se disponibilizarem a participar do trabalho e doaram seu sangue em nome da pesquisa, por acreditarem na ciência, obrigada.

Ao Professor Dr Leandro Gobbo Braz por auxiliar na seleção dos pacientes, nas coletas, e estar sempre disposto a ajudar.

À minha equipe querida do laboratório GENOTOX (FMB/UNESP): Aline Garcia Aun, amiga querida, sempre disposta a ajudar em todos os momentos, compartilhando momentos de alegrias, risadas e bons cafés. Flávia Ribeiro Nogueira, imprescindível na realização desse trabalho, companheira e grande amiga, não media esforços para ensinar e ajudar, esse trabalho tem muito de você e da sua dedicação também. Kátina Meneghetti de Souza, amiga de coração enorme, compartilhou tantos momentos de alegria, foi colo, amor, carinho, sempre com uma palavra doce que acalmava o coração. Youssef Said Abu Lawi, amigo querido que em pouco tempo trouxe tamanha alegria e luz para minha vida, gratidão por toda experiência e momentos juntos. Vivenciamos não só uma rotina de laboratório, mas também experiências que levarei para toda vida, grandes amigos com coração de ouro sempre dispostos a ajudar de inúmeras maneiras, seja com conhecimento, uma palavra de carinho, amor e atenção. Não se conquista nada nessa vida sozinho, esse trabalho também é parte de vocês, obrigada por fazerem a diferença!

Às meninas Laura Miranda Caram, Renata Ferrari e Lorena Mendes de Carvalho Lucio, pela oportunidade de participar de seus respectivos projetos, sempre agregando e compartilhando conhecimento.

À Vickeline Namba Androcioli, técnica do laboratório e também amiga querida, obrigada pelos ensinamentos e paciência dentro do laboratório e também por tantos momentos de alegria, risadas e conselhos fora dele.

A todos os colegas do laboratório OMICs: João Paulo de Castro Marcondes, Juliana Rodrigues Lara, Pablo Bertolini, Leonardo Menezes, Mário Botasso, Jhennifer Rebecca, André Luiz Ventura Sávio, Fábio Henrique Fernandes e Elaine Aparecida de Camargo,

por sua dedicação em ensinar, transformando as jornadas cansativas em momentos mais leves e alegres. À Prof^a Dr^a Daisy Maria F. Salvadori por permitir a utilização de seu laboratório para experimentos de expressão gênica.

A todos os funcionários da UNIPEX (FMB/UNESP), por manterem a limpeza dos laboratórios e demais ambientes, por estarem sempre dispostos a ajudar com equipamentos, materiais, problemas técnicos, auxílio com os *freezers* e amostras. Por compartilharem também cafés, risadas e momentos de alegria.

Aos funcionários André Renato Passaroni e Nelí Aparecida Pavan, obrigada por toda ajuda durante esses anos, sempre sorridentes e alegres, não medindo esforços para solucionar problemas; seres humanos de coração e alma incríveis, humildade e bondade acima de tudo. Agradeço também as funcionárias Joana Jacirene Costa Teixeira e Sônia Maria Martins e Silva por toda ajuda necessária.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da FMB/UNESP Tatiane Pereira Pineiz Biondo por toda orientação, companheirismo e alegria diária nos últimos anos.

Aos docentes do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da FMB/UNESP por acreditarem na pesquisa e darem o seu melhor para desenvolvimento e propagação da ciência.

À Marjorie de Assis Golim, Aline Márcia Marques Braz e toda equipe responsável pelo Laboratório de Citometria de Fluxo do HC-FMB, pelos auxílios nos experimentos, interpretação dos dados e apoio científico.

À Prof^a Dr^a Lídia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu IBB/UNESP, admiração pela dedicação e comprometimento de todas as análises estatísticas.

À toda equipe de profissionais do Laboratório Clínico do HC-FMB pela realização dos testes hormonais.

À Rosemary Cristina da Silva e à Rosangela Aparecida Lobo, funcionárias da Biblioteca do Campus de Botucatu da UNESP, pela revisão das referências e confecção da ficha catalográfica.

Aos meus familiares, tios, primos e todos aqueles que estiveram ao meu lado, torcendo pela minha felicidade e me motivando a cada dia.

À família Bergamini, por tanto amor ao longo desses anos, pessoas de imenso caráter que eu admiro muito. Em especial ao meu grande amigo Denilton Bergamini Junior, companheiro ao longo dessa vida, imenso orgulho e admiração pelo homem que você se tornou, me espelho em você todos os dias, obrigada por todas as palavras de amor e carinho, pelo ombro amigo, pelas risadas e amizade que tanto prezo.

À Tia Cida e Tio Leal, mestres que me incentivam todos os dias a buscar meus sonhos e acreditaram nesse trabalho; exemplos de determinação, coragem e humildade, obrigada pelo apoio, carinho e amor.

Aos meus amigos queridos Raquel Hailer, Maria Fernanda da Fonseca, Ana Paula Rondina, Carolina Barhum, Fernanda Ayumi, Constanza do Val, Maria Amélia Rocha, Maria Eduarda de Lucca Rondina, Barbara Gobbo, Lauana Fogaça, Evelyn Brisola, Ana Carolina Santoro, Beatriz Kase, Milene Dias, Conrado Almeida, Pablo Calistro, Renato Drummond, Rafael Marin, família que Deus me permitiu escolher, compartilhando todos os momentos dessa vida, minha fortaleza diária.

À Andreia Garrote por ser luz e amparo para todos os momentos da vida, amiga e companheira que nunca desistiu de mim e sempre me mostrou o meu melhor, acreditando no meu potencial e à pequena Ana Laura Garrote, amor incondicional da tia.

Aos queridos Tainara B. Ferrari Doiche, Caio Doiche e Larissa Périco, que me receberam em Botucatu com muito amor e carinho, sempre solícitos e dispostos a ajudar, sem palavras para expressar o quanto vocês fizeram a diferença na minha vida, acrescentaram na minha formação profissional e pessoal, compartilhando muitas risadas, alegrias, conselhos, uma amizade para toda vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”

Chico Xavier

Resumo

Arruda NM. **Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso [Dissertação]**. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2018. 68 f.

O presente estudo teve como objetivo comparar diversos marcadores inflamatórios e neuro-endócrinos em pacientes submetidos ao ato cirúrgico sob anestesia mantida com o halogenado desflurano ou desflurano associado ao gás óxido nitroso (N₂O). Adicionalmente, realizou-se a comparação entre os momentos do estudo em cada grupo analisado em relação ao perfil neuro-imune-endócrino. Este estudo clínico prospectivo foi realizado em indivíduos adultos sem comorbidades, de ambos os sexos, que foram submetidos a cirurgia de septoplastia sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao N₂O 60%. Amostras de sangue venoso foram coletadas em três momentos: antes da medicação pré-anestésica na sala de operação (basal), aos 90 minutos após a indução anestésica e no dia posterior ao ato cirúrgico. As citocinas inflamatórias interleucina (IL)-1 β , -6, -8, -10, -17A e o fator de necrose tumoral (TNF)- α foram analisados por citometria de fluxo e a proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR-as) foi analisada por imunoenensaio quimioluminescente. A expressão dos genes *IL-6*, ciclooxigenase-2 (*COX-2*) e fator de transcrição nuclear kappa-B (*NF-kB*), relacionados à inflamação, foi avaliada por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os hormônios adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol e prolactina foram detectados por ensaio imunoenzimático quimioluminescente. Os dois grupos não diferiram quanto aos dados demográficos, intraoperatórios e neuro-imune-endócrinos. Houve aumento de prolactina no intraoperatório e de IL-6 e PCR-as no pós-operatório de maneira semelhante em ambos os grupos. Em conclusão, ambas as técnicas anestésicas não diferiram quanto ao perfil inflamatório ou de resposta neuro-endócrina e tiveram perfil semelhante nos momentos avaliados. Assim, tanto a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano associado a N₂O 60% podem ser opções viáveis para pacientes hígidos submetidos a cirurgia minimamente invasiva.

Abstract

Arruda NM. **Comparison of inflammatory markers in surgical patients maintained with desflurane associated or not with nitrous oxide [Master]**. Botucatu: Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP; 2018. 68 p.

The current study aimed to compare several of inflammatory and neuro-endocrine markers in surgical patients with anesthesia maintained with the halogenated desflurane or desflurane associated with the nitrous oxide (N₂O) gas. In addition, the study compared the neuro-immune-endocrine profile among the time points in each studied group. This prospective clinical trial was conducted in adults with no comorbidities, of both sexes, who underwent septoplasty with desflurane or desflurane anesthesia associated with N₂O 60%. Blood samples were collected at three time points: before the patient received pre-anesthetic medication in the operating room (baseline), 90 minutes after anesthesia induction and the day after surgery. The inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , -6, -8, -10, -17A and tumor necrosis factor (TNF)- α were analyzed by flow cytometry, and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was analyzed in the by chemiluminescent immunoassay. Inflammatory genes *IL-6*, cyclooxygenase-2 (*COX-2*) and nuclear factor -kappa B (*NF-KB*) were detected by quantitative polymerase chain reaction. The adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol and prolactin were detected by chemiluminescent immunoenzymatic assay. Both groups did not differ regarding demographic, intraoperative and neuro-immune-endocrine data. There were similar significant increases of intraoperative prolactin, and post-operative IL-6 and hs-CRP, in both groups. In conclusion, both anesthetic techniques did not differ in relation to inflammatory profile and neuro-endocrine response, and were similar when analyzed at the evaluated time points. Therefore, anesthesia maintained with desflurane or desflurane associated with N₂O 60% can be suitable options for healthy subjects who undergo minimally invasive surgery.

Lista de Figuras

Figura 1. Reação local de distúrbios da homeostase.....	16
Figura 2. Mecanismos de inflamação da via respiratória.....	18
Figura 3. Resposta neuro-imune-endócrina durante o estresse cirúrgico.....	20
Figura 4. Possíveis mecanismos da influência do procedimento anestésico-cirúrgico na resposta inflamatória.....	23
Figura 5. Fluxograma dos pacientes da pesquisa	32
Figura 6. Quantificação gênica do fator nuclear kappa B	38
Figura 7. Quantificação gênica de interleucina-6.....	38
Figura 8. Quantificação gênica de ciclooxygenase-2.....	39

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características dos anestésicos inalatórios.....	19
Tabela 2. Dados demográficos dos pacientes de ambos os grupos.....	33
Tabela 3. Duração da anestesia e dose total dos fármacos utilizados nos grupos avaliados.....	33
Tabela 4. Valores hemodinâmicos de ambos os grupos avaliados	34
Tabela 5. Média dos valores dos grupos ao longo dos tempos de anestesia.....	35
Tabela 6. Concentração sérica de citocinas e de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as) de ambos os grupos avaliados.....	37
Tabela 7. Concentração sérica dos hormônios avaliados em ambos os grupos.....	40

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos Especiais	iii
Agradecimentos	iv
Epígrafe	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Mediadores Inflamatórios.....	13
1.2 Procedimento Anestésico-Cirúrgico x Processo Inflamatório.....	18
1.3 Justificativa do Estudo.....	23
2 OBJETIVOS	25
3 PACIENTES E MÉTODO	26
3.1 Ética e Registro.....	26
3.2 Participantes da Pesquisa.....	26
3.3 Casuística e Aleatorização dos Grupos.....	26
3.4 Monitorização e Procedimento Anestésico.....	27
3.5 Coleta de Material Biológico.....	28
3.6 Avaliação de Citocinas.....	28
3.7 Mensuração Proteica e Hormonal.....	29
3.8 Avaliação da Expressão Gênica.....	29
3.9 Análise Estatística.....	30
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS	48
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética	56
ANEXO B - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos	57
APÊNDICE A - Questionário	58
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62
APÊNDICE C - Protocolo da Pesquisa	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mediadores Inflamatórios

A inflamação é um processo natural e essencial para reparação tecidual e cicatrização (Bilate, 2007). Entretanto, quando exacerbada pode ocasionar várias complicações, como hipotensão arterial, infecções no pós-operatório, sepse, falência de órgãos e até mesmo óbito (Cheng, 2005). A resposta inflamatória é resultante da ativação das vias de sinalização que regulam os níveis dos mediadores inflamatórios em células dos tecidos e em células inflamatórias recrutadas a partir do sangue (Chen *et al.*, 2017).

A ativação de citocinas é o passo inicial para a resposta imune após estímulo de estressores inflamatórios (Chalhoub *et al.*, 2011). Citocinas como as interleucinas (IL)-1 e IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , gerados no local de inflamação, têm papel fundamental na resposta de fase aguda (Garcia *et al.*, 2002). Localmente, as citocinas iniciam e coordenam a resposta inflamatória e, sistemicamente, ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), desencadeando a liberação de catecolaminas e hormônios glicocorticoides (Kurosawa & Kato, 2008).

As citocinas são mediadores responsáveis por gerarem alterações hemodinâmicas, endócrinas, imunológicas, metabólicas e neurais (Sheeran & Hall, 1997). Essas moléculas são extremamente potentes (agem em concentrações picomolares) e influenciam a síntese e ação de outras citocinas. Uma mesma citocina pode apresentar ação pleiotrópica, ou seja, pode desempenhar diferentes efeitos dependendo das condições do microambiente e também pode potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas (sinergismo ou antagonismo, respectivamente) (Bilate, 2007). Essas glicoproteínas agem ligando-se a receptores específicos que estão na superfície da membrana das células-alvo. Esta ligação causa alterações intracelulares por meio da ativação de vias de transdução com proliferação e indução de mudanças na expressão gênica, responsável pela modulação de respostas locais e sistêmicas (Garcia *et al.*, 2002; Bilate, 2007).

As citocinas possuem ação pró-inflamatória ou anti-inflamatória que aumenta ou diminui, respectivamente, a resposta inflamatória. Os mediadores pró-inflamatórios são IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, além do TNF- α enquanto os anti-inflamatórios são IL-4, IL-10 e IL-13 (Sheeran & Hall, 1997; Lin *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2011). Entretanto, uma mesma citocina pode apresentar ambos os efeitos, como a IL-6 (Lin *et al.*, 2000).

A IL-1 possui duas formas distintas, IL-1 α e IL-1 β , sendo que ambas compartilham algumas propriedades biológicas, sendo que a IL-1 β está predominantemente associada às membranas celulares e exerce sua influência por meio de contatos celulares, sendo a forma mais facilmente detectável na circulação (Lin *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2002). A IL-1 β é liberada principalmente por macrófagos ativados, mas também por células endoteliais, neutrófilos e linfócitos B. Também é responsável por induzir resposta inflamatória que estimula a ação de prostaglandina (Garcia *et al.*, 2002).

O TNF- α é produzido basicamente por macrófagos e linfócitos T, atuando no eixo HPA como mediador pró-inflamatório no combate a invasão por microorganismos. É um dos primeiros e mais potentes mediadores que induz a liberação de neutrófilos e ativação de macrófagos (Garcia *et al.*, 2002). Pode ser inibido pela ação da IL-10 por *feedback* negativo (Kurosawa & Kato, 2008).

A IL-6, que atua como a principal mediadora da síntese proteica em hepatócitos na fase aguda da reação inflamatória, é responsável por diversas alterações hormonais e metabólicas envolvidas na resposta ao estresse (Heinrich *et al.*, 1990). Age na liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual estimula a síntese de glicocorticoides, os quais possuem dupla ação: aumentam o efeito das citocinas sobre a síntese de proteínas hepáticas e também inibem a síntese das mesmas citocinas, agindo como contra-regulador. Tanto a IL-1 β quanto o TNF- α podem induzir a produção de IL-6 (Lin *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2002).

A IL-8 é uma quimiocina responsável pela quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Também é responsável pela quimiotaxia de outras células, como basófilos e linfócitos T (Cheng, 2005). Essa interleucina é sintetizada por macrófagos, monócitos, linfócitos T, fibroblastos e células endoteliais. O aumento nas concentrações de IL-8 está relacionado a disfunções da via respiratória (Sheeran & Hall, 1997; Garcia *et al.*, 2002).

A produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) são controladas por outras interleucinas como a IL-10, a qual é um mediador anti-inflamatório produzido por linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, mastócitos e queratinócitos (Cheng, 2005).

A IL-17A é produzida por diversos tipos celulares e estimula células endoteliais e macrófagos produzirem IL-1 β , TNF- α e várias quimiocinas, como a IL-8 (Abbas *et al.*, 2015). A IL-17A exerce importante papel na resposta imunológica, tanto inata quanto

adaptativa, e também está associada a distúrbios respiratórios (Laan *et al.*, 2002). Adicionalmente, está relacionada com a ativação do fator nuclear kappa B ($NF-\kappa B$), que pode resultar no aumento da expressão proteica de mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e IL-8 (Sheeran & Hall, 1997).

A reação inflamatória desencadeia resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda, que se caracteriza por leucocitose e produção de diversos hormônios e proteínas. Mediadores como IL-1 β , IL-6 e TNF- α gerados no local de inflamação têm papel fundamental na resposta de fase aguda, sendo que entre 12 e 24 horas após o início da resposta, essas proteínas atingem o pico de produção (Bilate, 2007). Estes mediadores desencadeiam reação sistêmica, agindo não somente no eixo HPA, mas também no fígado, medula óssea e sistema imunológico (Figura 1).

A proteína C-reativa (PCR), produzida no tecido hepático, é conhecida como importante mediador da resposta inflamatória da fase aguda (Desborough, 2000). O aumento nos níveis dessa proteína está relacionado com o aumento concomitante das concentrações sistêmicas de IL-6 (Kurosawa & Kato, 2008), que é a citocina mais importante na sinalização da resposta inflamatória de fase aguda, na qual desempenha importante papel, induzindo a liberação de outros mediadores além da PCR, assim como ACTH e cortisol, que são liberados via eixo HPA.

O ACTH é um hormônio secretado pela hipófise, responsável por regular a síntese de cortisol. Em situações de estresse, como dor extrema, infecções, traumatismos graves, queimaduras e sepse, há grande aumento nos níveis de ACTH, com consequente aumento de cortisol, hormônio secretado pelas glândulas adrenais, que desempenha papel importante na adaptação do organismo a situações de estresse, sendo que seus valores podem aumentar de 15 a 20 vezes no organismo frente a estímulos estressores; atua por meio de *feedback* inibindo a liberação de ACTH e corticotrofina, a fim de atenuar a resposta inflamatória (Anti *et al.*, 2008; Kurosawa & Kato, 2008).

A prolactina é um hormônio secretado pela adeno-hipófise, que é composta por 199 aminoácidos (Paola *et al.*, 2015), sendo o único hormônio com secreção independente de estímulo hipotalâmico (Tella *et al.*, 2002). O aumento da secreção de prolactina também pode ser em resposta a fatores estressores (Crozier *et al.*, 1994; Graziola *et al.*, 2005; Paola *et al.*, 2015).

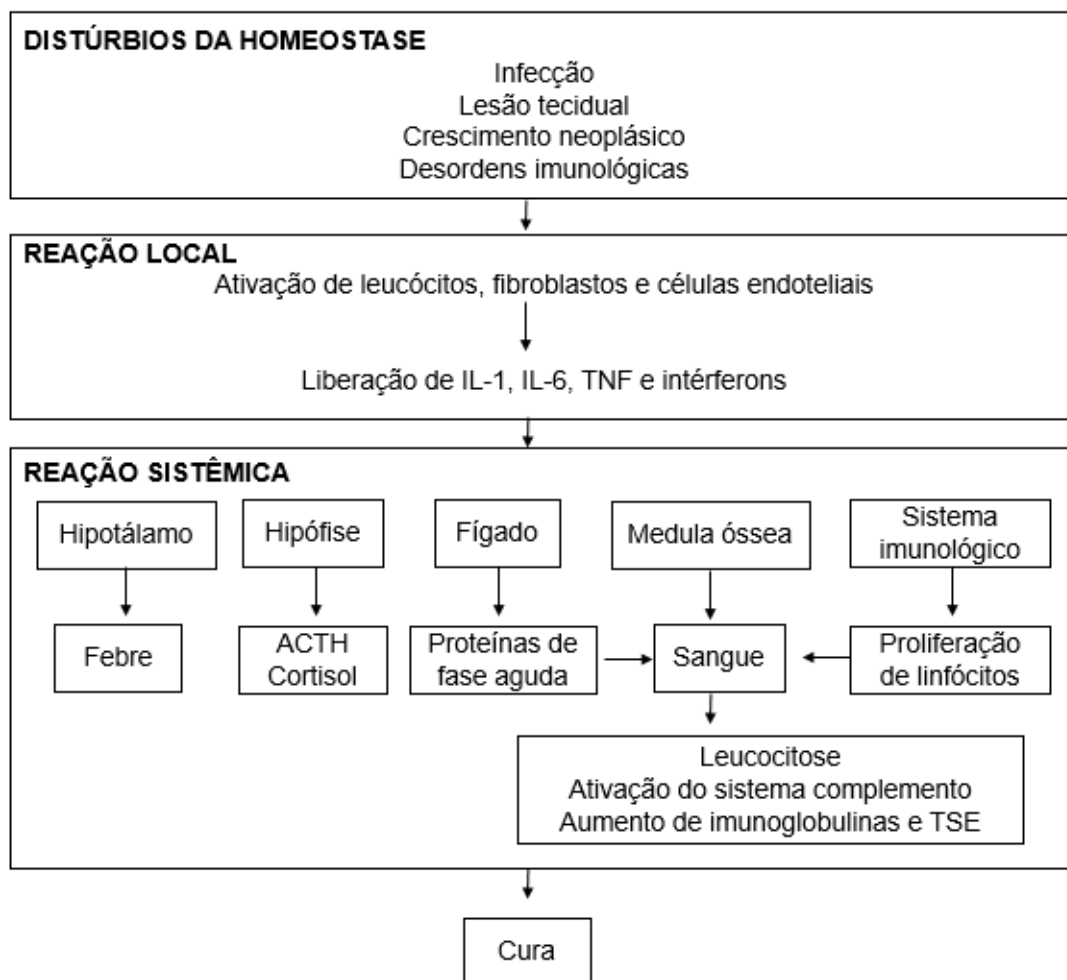


Figura 1. Reação local de distúrbio da homeostase, caracterizada por ativação celular e liberação de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas. Esses mediadores, ao se ligarem a receptores específicos em células alvo diferentes, levam a uma resposta sistêmica, caracterizada por febre, liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol e de proteínas de fase aguda, proliferação de células imunológicas, além de leucocitose, ativação do sistema complemento e aumento da taxa de sedimentação de eritrócitos (TSE). Adaptado de Heinrich *et al.* (1990).

Em relação aos receptores de citocinas, a maioria deles é composta por subunidades distintas: a cadeia α e a β , que recebem estímulos, sendo que estes determinam o tipo de *signal transducers and activators of transcription (STAT)* a ser ativado e assim a citocina é produzida (Bilate, 2007; Chen *et al.*, 2017). Portanto, o acoplamento de citocinas aos receptores específicos resulta na ativação das vias de sinalização intracelular, as quais regulam a transcrição gênica pelas vias de ativação de *janus kinases* (Lin *et al.*, 2000; Anti *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010; Hsing & Wang, 2015; Chen *et al.*, 2017). Um importante fator de transcrição envolvido na inflamação é o *NF- κ B* e sua ativação ocorre frente a diversos estímulos como as citocinas IL-1 e o TNF- α ,

fatores ativadores de linfócitos T e B, proteínas virais e fatores indutores de estresse (Blanco & Neto, 2003). Após a ativação, o *NF- κ B* é translocado para o núcleo, onde atua na regulação gênica de citocinas pró-inflamatórias como *IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-6* e *IL-8* (Tak & Firestein, 2001; Anti *et al.*, 2008), na expressão e atividade de ciclooxigenase-2 (*COX-2*) e também de óxido nítrico-sintase induzida (*iNOS*) (Tak & Firestein, 2001; Kurosawa & Kato, 2008).

O *NF- κ B* é regulador-chave das respostas inflamatórias, por controlar amplo espectro de efeitos biológicos que incluem respostas imune e induzida pelo estresse além de proliferação e diferenciação celulares, tumorigênese, apoptose e remodelação tecidual. Esse gene também pode ser ativado pelo estresse oxidativo, o qual desempenha papel fundamental na modulação da expressão de genes inflamatórios bem como da expressão de proteínas inflamatórias (Lee & Yang, 2013). Um desses genes é o da *COX-2*, cuja expressão pode ser regulada positivamente em muitos tipos de células por citocinas, mitógenos e endotoxina. Esse gene é altamente expresso em tecidos inflamados e produz mediadores como as prostaglandinas envolvidas em processos inflamatórios (Lee & Yang, 2013). O gene *COX-2* mostrou-se expresso também frente a diferentes agentes externos, como por exemplo fumaça de cigarro (Rahman, 2003; Lin *et al.*, 2010), dióxido de nitrogênio e ozônio (Rahman, 2003) além dos anestésicos inalatórios (Lee *et al.*, 2015). Esses agentes estressores estão associados à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que levam ao processo de estresse oxidativo, o qual está intimamente relacionado à inflamação. As ERO também podem atuar pela via inflamatória ativando as proteínas quinases (*Mitogen Activated Protein Kinases - MAPKs*), que são componentes das cascatas de sinalização que respondem aos estímulos extracelulares, agindo na ativação do *NF- κ B* com consequente indução da expressão gênica da *COX-2*, prostaglandina-2 (*PGE₂*) e *IL-6*, como demonstrado na Figura 2.

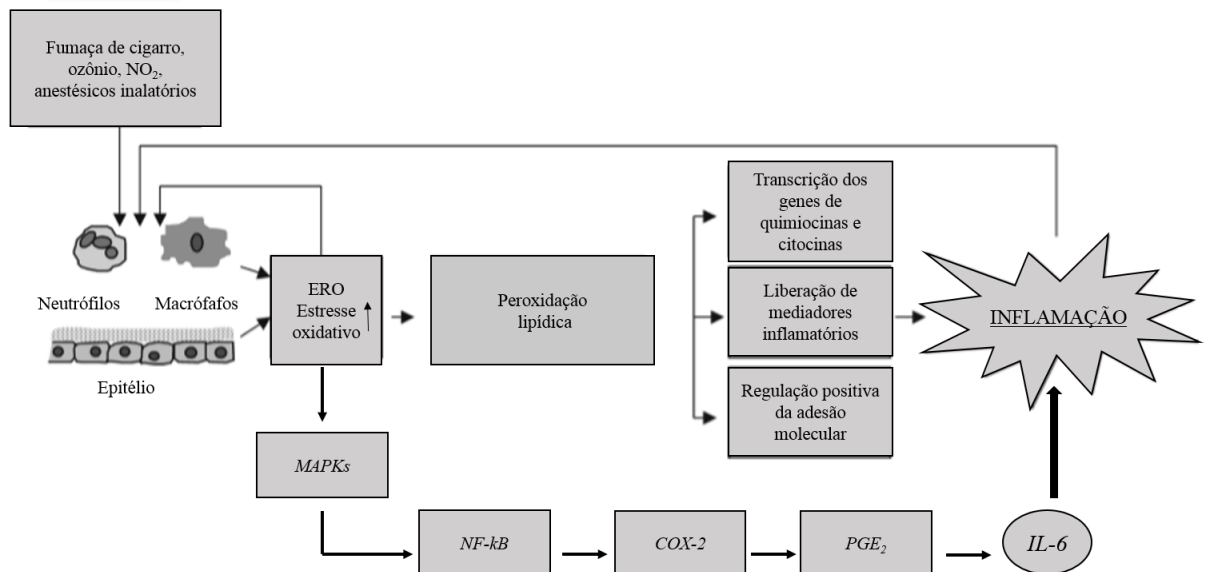


Figura 2. Mecanismos de inflamação da via respiratória mediada por espécies reativas ao oxigênio (ERO). Agentes inalatórios levam à resposta inflamatória mediada pelos neutrófilos ativados e macrófagos alveolares, entre outras células epiteliais, que levam à produção de radicais livre e ERO, o que pode induzir peroxidação lipídica, com consequente efeito na ativação da transcrição de genes pró-inflamatórios além do aumento na liberação de mediadores pró-inflamatórios. O estresse oxidativo também pode ativar as proteínas quinases (*Mitogen Activated Protein Kinases* - *MAPKs*) e toda cascata inflamatória pelo fator de transcrição nuclear kappa B (*NF-κB*), ciclooxigenase-2 (*COX-2*), prostaglandina (*PGE₂*) e interleucina (*IL*)-6. Adaptado de Rahman (2003), Lin *et al.* (2010) e Lee *et al.* (2015).

1.2 Procedimento Anestésico-Cirúrgico x Processo Inflamatório

Anualmente, milhões de pessoas são submetidas a procedimentos cirúrgicos sob anestesia geral. Atualmente, os anestésicos inalatórios mais comumente utilizados, em anestesia geral são os halogenados isoflurano, sevoflurano e desflurano, além do gás óxido nitroso (N₂O). O desflurano (C₃H₂F₆O) é o mais recente dos anestésicos inalatórios halogenados na prática clínica e por isso há preocupação com seus possíveis efeitos no organismo (Saraiva, 2003; Stachnik, 2006; Jakobsson, 2012). No Brasil esse anestésico foi lançado comercialmente somente há poucos anos. Trata-se do anestésico com menor solubilidade sanguínea, sendo rapidamente absorvido e eliminado do organismo (Jakobsson, 2012), o que confere rápida recuperação anestésica, além de ter baixíssima taxa de metabolização (Tabela 1), sendo que a liberação de flúor sérico da sua molécula é insignificante. Essas características farmacológicas lhe conferem como o anestésico inalatório mais bem tolerado pelo organismo na atualidade sob o ponto de vista de toxicidade. Entretanto, é o agente que apresenta a maior concentração alveolar mínima

(CAM) dentre os halogenados (Tabela 1). A CAM de um anestésico é definida como a concentração mínima de anestésico administrada que suprime qualquer movimentação muscular em resposta a um estímulo doloroso em 50% dos pacientes; é uma nomenclatura padronizada na área para comparar a potência dos anestésicos inalatórios (Prielipp, 2010). Além disso, o desflurano é extremamente volátil evaporando-se em temperatura ambiente (Tabela 1), sendo necessário, portanto, um vaporizador especial para sua utilização, o que encarece, ainda mais, o seu uso clínico (Saraiva, 2003). Adicionalmente, o desflurano possui elevada pungência, provocando irritação das vias aéreas, o que impossibilita seu uso como indutor anestésico (Saraiva, 2003).

O N₂O é um dos anestésicos mais antigos utilizados na prática clínica (há mais de 150 anos). É um agente anestésico fraco por apresentar CAM muito elevada (Tabela 1), sendo necessário ser administrado (60% - 70%) em associação com outros anestésicos mais potentes (Sanders *et al.*, 2008). Tem como vantagens seu baixo custo, baixa solubilidade sanguínea além de praticamente não ser metabolizado (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos anestésicos inalatórios

Anestésicos	Solubilidade sanguínea	Degradação metabólica (%)	Concentração alveolar mínima - CAM (%)	Ponto de ebulição (°C)
Óxido Nitroso	0,47	0,004	104,0	-
Halotano	2,4	20,0	0,8	50,2
Isoflurano	1,4	0,2	1,2	48,5
Sevoflurano	0,65	3,0	2,0	58,5
Desflurano	0,45	0,02	6,0	22,8

Adaptado de Saraiva (2003).

O procedimento cirúrgico por si só pode induzir alterações neuro-endócrinas e imunológicas (Figura 3). Os anestésicos também podem contribuir para essas alterações levando à liberação de hormônios e mediadores inflamatórios (Desborough, 2000). Portanto, intervenções cirúrgicas juntamente com a utilização de anestésicos, especialmente os halogenados, podem contribuir para perturbações no período perioperatório, incluindo interações neuro-imune-endócrinas (Paola *et al.*, 2015). Quanto maior o trauma cirúrgico, maior a resposta do organismo ao processo inflamatório (Cruickshank *et al.*, 1990; Kurosawa & Kato, 2008); portanto, a cirurgia minimamente invasiva parece ser menos traumática e estar associada com menor resposta inflamatória quando comparada à cirurgia aberta e mais invasiva (Cheng, 2005).

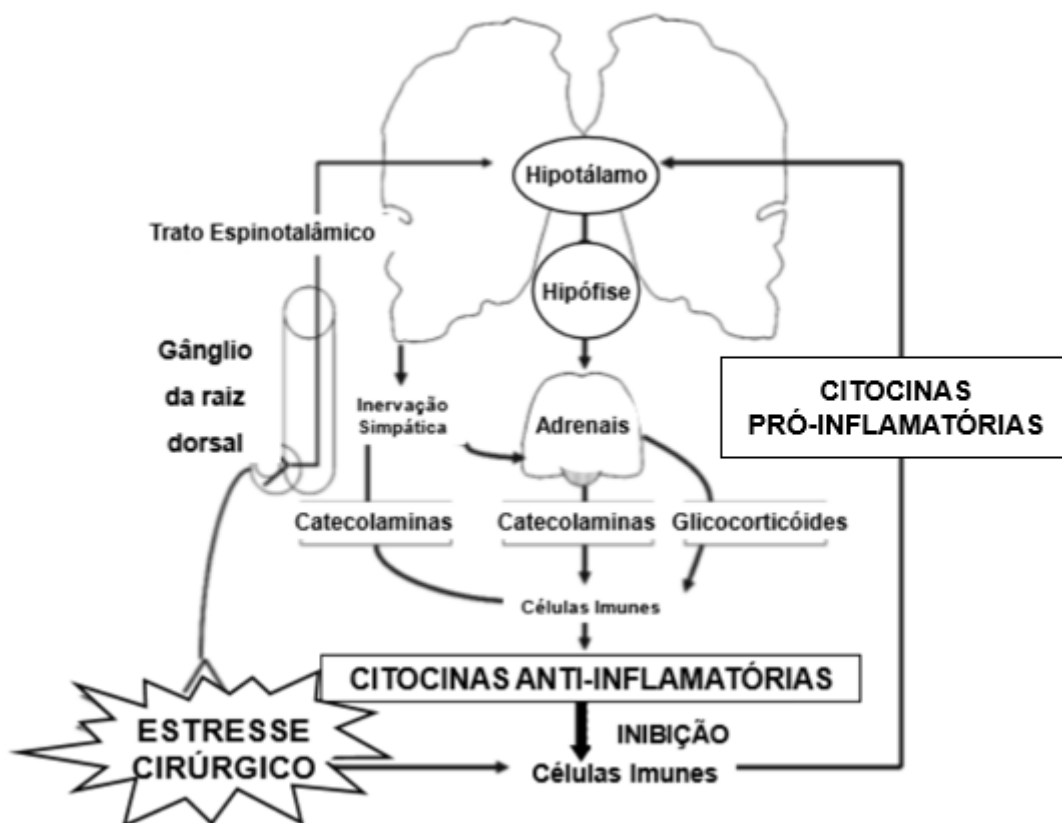


Figura 3. Resposta neuro-imune-endócrina durante o estresse cirúrgico. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), a inervação do sistema nervoso simpático (SNS) e as citocinas representam os componentes periféricos. Citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células imunes estimulam o hipotálamo e ativam o eixo HPA e o SNS. Catecolaminas e glicocorticóides estimulam os linfócitos T *helper* 2 (*Th2*) e células apresentadoras de antígenos a produzirem as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, que inibem a resposta imunológica mediada por células, resultando em imunossupressão. Adaptado de Kurosawa & Kato (2008).

Ainda não existe consenso dos possíveis efeitos nos mediadores neuro-endócrinos ou inflamatórios dos diferentes anestésicos halogenados utilizados na manutenção anestésica em pacientes. Além disso, há escassez de dados na literatura em relação às possíveis alterações neuro-imune-endócrinas em pacientes anestesiados com desflurano associado ou não ao N₂O.

Pacientes submetidas a cirurgia laparoscópica para retirada de cistos ovarianos foram aleatoriamente alocadas sob anestesia mantida com sevoflurano ou desflurano, ambos a 1 CAM (Marana *et al.*, 2013). Observou-se diferentes comportamentos em relação aos hormônios e aos mediadores inflamatórios nas duas técnicas anestésicas. Houve maior liberação de catecolaminas no grupo desflurano no intraoperatório e no pós-operatório quando comparado ao sevoflurano, mas a anestesia com desflurano foi associada a melhor controle dos níveis de ACTH e cortisol no intraoperatório, e nenhum dos anestésicos influenciou a liberação de IL-6, PCR ou glicose. Graziola *et al.* (2005) observaram que pacientes submetidas a cirurgia videolaparoscópica tiveram aumento significativo de cortisol no intraoperatório quando sob anestesia inalatória (isoflurano), mas não sob anestesia venosa (propofol).

Em estudo realizado em pacientes sem comorbidades associadas e submetidos a procedimento minimamente invasivo, observou-se aumento significativo e progressivo da liberação de IL-6 no intraoperatório e no pós-operatório quando os pacientes foram mantidos com anestesia inalatória (isoflurano), diferentemente do que ocorreu em pacientes sob anestesia venosa com propofol, quando houve aumento significativo de IL-6 apenas no pós-operatório (Mazoti *et al.*, 2013). Adicionalmente, em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, verificou-se que pacientes hígidos, submetidos a cirurgias otorrinológicas sob anestesia mantida com sevoflurano, apresentaram aumento de IL-6 no dia posterior ao ato anestésico-cirúrgico, mas não de outras citocinas inflamatórias sistêmicas (Orosz *et al.*, 2012).

Também em cirurgia de pequeno porte, sob anestesia inalatória empregando sevoflurano (2% - 3%) ou desflurano (6% - 9%), foram relatadas elevações significativas, no final da cirurgia, dos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 com os dois halogenados, mas em maior proporção com o desflurano (Koksal *et al.*, 2005). De forma interessante, esses mesmos autores observaram, em pacientes submetidos a colecistectomia laparoscópica eletiva, que a anestesia mantida com desflurano levou a maior estresse oxidativo que a anestesia mantida com sevoflurano (Koksal *et al.*, 2004). Por outro lado, em pacientes submetidos a cirurgia torácica sob anestesia venosa com

propofol ou inalatória com desflurano, houve aumento nas concentrações alveolares de marcadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-8) após ventilação monopulmonar em todos os pacientes, sendo que a resposta inflamatória foi menor no grupo desflurano quando comparado ao grupo propofol (Schilling *et al.*, 2007).

Na literatura ao nosso alcance, há escassez de dados em relação aos marcadores inflamatórios em pacientes que receberam anestesia com N₂O associado a halogenado. Em um trabalho clínico, Kumakura *et al.* (2013) avaliaram o sevoflurano associado ou não ao N₂O e observaram aumento significativo de algumas citocinas pró-inflamatórias no pós-operatório no grupo que recebeu N₂O, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o halogenado. Adicionalmente, a utilização de N₂O já foi associada ao aumento de infecções de ferida cirúrgica no pós-operatório em pacientes submetidos a grande cirurgia (Chen *et al.*, 2013).

A avaliação da expressão de genes em resposta à ação de estressores sobre o sistema biológico possibilita a predição da toxicidade antes mesmo da ocorrência do dano funcional (Zhou *et al.*, 2009). Assim, a alteração em nível transcricional (RNAm) pode ser marcador precoce da resposta inflamatória, a qual também pode ser avaliada por quantificação proteica das citocinas. Um biomarcador pode ser útil na prevenção e na detecção precoce de evento tóxico/doença uma vez que seu nível se altera proporcionalmente à intensidade do efeito (Valente *et al.*, 2016). Nesse sentido, sabe-se que a expressão gênica pode ser influenciada por vários fármacos, incluindo os anestésicos (Braz *et al.*, 2011; Braz *et al.*, 2012). Huitink *et al.* (2010) sugeriram que os anestésicos inalatórios e o gás N₂O modulam a expressão de diversos genes em linhagens celulares de tumor mamário e cerebral de maneira tempo-dependente. Kotani *et al.* (1999a) avaliaram, em lavado pulmonar, a concentração de citocinas e expressão gênica desses mediadores em ratos anestesiados com isoflurano e sevoflurano a 1,5 CAM, sob ventilação mecânica após duas horas de exposição. Os autores encontraram aumento de *macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)*, *IL-1 β* e *TNF- α* para ambos os grupos. Assim, esse estudo indica que a exposição, por 120 minutos aos anestésicos halogenados, induz resposta inflamatória em nível transcricional. De acordo com Boost *et al.* (2006), a exposição a 1 CAM de desflurano em ratos com endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), após quatro horas, mostrou diminuição da liberação plasmática das citocinas IL-1 β e TNF- α e aumento proteico de *iNOS* em macrófagos alveolares. Os autores sugerem que esse anestésico tenha papel modulador na inflamação induzida.

Entretanto, ressaltam que o papel do desflurano, em nível gênico ou proteico da resposta inflamatória, ainda não foi elucidado, especialmente em pacientes hígidos.

Assim, o procedimento cirúrgico em conjunto com os anestésicos pode levar a alterações do eixo HPA, no sistema imune, além de atuar na regulação de genes na resposta inflamatória. Frente a isso, acredita-se que todos esses marcadores possam estar relacionados, conforme mostrado na Figura 4. Frente a escassez de dados na literatura, não se encontrou nenhum estudo que tenha avaliado mediadores neuro-endócrinos e inflamatórios, associados à expressão desses genes inflamatórios, em pacientes anestesiados com desflurano associado ou não ao N₂O, o que ressalta a novidade do estudo proposto.



Figura 4. Possíveis mecanismos da influência do procedimento anestésico-cirúrgico na resposta inflamatória, estimulando a liberação de hormônios, a ativação do fator de transcrição *nuclear factor kappa B* (*NF-kB*), a expressão gênica de marcadores inflamatórios, além da liberação de diversas citocinas e de proteínas hepáticas de fase aguda.

1.3 Justificativa do Estudo

Desde a introdução dos anestésicos na prática clínica, sempre houve a preocupação com a ação farmacológica desses agentes, seus possíveis efeitos colaterais no organismo e a interferência na recuperação dos pacientes. Nosso grupo de pesquisa tem avaliado os efeitos dos anestésicos no perfil inflamatório tanto em pacientes

submetidos a anestesia geral inalatória quanto venosa, além de profissionais expostos ocupacionalmente aos anestésicos inalatórios (Orosz *et al.*, 2012; Braz *et al.*, 2013; Mazoti *et al.*, 2013; Chaoul *et al.*, 2015).

Com a evolução da ciência básica e advento da medicina translacional, é possível realizar estudos em nível molecular e sistêmico relacionados aos anestésicos em pacientes cirúrgicos, contribuindo para maior entendimento dos seus possíveis efeitos na resposta inflamatória/imune e endócrina. Alguns estudos demonstraram que a reação inflamatória pulmonar pós-operatória é exacerbada quando o N₂O 60% é usado em conjunto com o halogenado sevoflurano e que pacientes cirúrgicos submetidos a cirurgia colorretal expostos a 70% de N₂O associado ao sevoflurano apresentaram maior incidência de infecção no pós-operatório quando comparados aos pacientes que receberam somente o halogenado (Kumakura *et al.*, 2008; Kumakura *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013). Adicionalmente, considerando não haver relatos sobre a modulação da resposta inflamatória em pacientes anestesiados com desflurano conjuntamente com o N₂O, o presente estudo contribuiu tanto para verificação de resposta inflamatória sistêmica e gênica quanto para avaliação da resposta neuro-endócrina em pacientes hígidos durante e após procedimento cirúrgico minimamente invasivo, comparando a manutenção anestésica com desflurano ou desflurano associado ao N₂O, o que ressalta a originalidade e a importância desse trabalho.

Assim, a hipótese do estudo é que a manutenção anestésica com o desflurano associado ao N₂O tenha maior aumento da resposta inflamatória e do sistema neuro-endócrino quando comparada aos efeitos da manutenção anestésica somente com o halogenado.

2 OBJETIVOS

Frente ao exposto, considerando-se a escassez de dados na literatura e a relevância da segurança do paciente, o presente estudo teve como objetivo comparar os marcadores inflamatórios sistêmicos, genéticos e de resposta neuro-endócrina em pacientes hígidos submetidos a cirurgia eletiva minimamente invasiva mantida com desflurano ou desflurano associado ao N₂O. Adicionalmente, foi realizada comparação entre os momentos do estudo em cada grupo analisado em relação ao perfil neuro-imune-endócrino.

3 PACIENTES E MÉTODO

3.1 Ética e Registro

O recrutamento de pacientes, de forma consecutiva, ocorreu de julho a dezembro de 2016 no Hospital das Clínicas (HC), Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP) após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMB - UNESP (nº 1.526.007 - Anexo A) e do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (RBR-2f8xhc - Anexo B).

3.2 Participantes da Pesquisa

Todos os pacientes com estado físico classificado pela *American Society of Anesthesiologists* (ASA) I agendados para cirurgia eletiva minimamente invasiva otorrinológica (septoplastia) com duração anestésica mínima de 90 minutos eram elegíveis para o estudo. Não foram incluídos na pesquisa os indivíduos que tinham idade inferior a 18 anos e superior a 50 anos, portadores de inflamação ou condições de infecção, fumantes, usuários de drogas ilícitas, alcoolistas, obesos, gestantes, àqueles que haviam recebido radiação em período inferior a 30 dias, os que estavam sob medicação ou que eram ocupacionalmente expostos a poluentes ambientais.

Cada paciente foi abordado, ao final da visita pré-anestésica, a qual ocorreu no dia anterior ao ato anestésico-cirúrgico, para conhecimento da pesquisa e avaliação dos critérios de elegibilidade. O paciente foi incluído no estudo após responder questionário detalhado sobre dados demográficos, história médica e estilo de vida (Apêndice A), concordar em participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice B).

3.3 Casuística e Aleatorização dos Grupos

Sessenta pacientes foram considerados elegíveis. Entretanto, 16 foram excluídos por não se adequarem aos critérios de inclusão ou por não aceitarem participar do estudo. Assim, 44 pacientes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, os quais se diferenciaram pelo uso de desflurano (grupo desflurano) ou de desflurano associado ao N₂O (grupo desflurano + N₂O 60%).

Previamente ao início do estudo, envelopes opacos foram confeccionados, contendo dentro de cada um deles o nome do grupo a ser avaliado. Os envelopes foram

lacrados, misturados, numerados sequencialmente e fixados no protocolo de pesquisa (Apêndice C). Antes da indução anestésica, um envelope foi aberto pelo anestesiolologista seguindo a ordem sequencial para identificação do grupo de estudo, garantindo assim a aleatorização dos grupos.

3.4 Monitorização e Procedimento Anestésico

Na sala de operação, após oito horas de jejum, um cateter 18G foi inserido em veia do antebraço direito dos pacientes seguido de infusão de solução de Ringer lactato a 4 ml/kg/min. Em seguida, os pacientes receberam medicação pré-anestésica com midazolam intravenoso (IV) (3 mg) e foram monitorados por meio de eletrocardiograma (derivações DII e V5), pressão arterial não invasiva e saturação periférica de oxigênio da oxihemoglobina (SpO₂) usando um biomonitor (Dixtal, Brasil). O bloqueio neuromuscular também foi monitorado (*Tof Guard, Biometer International, Finlândia*) e todos os pacientes receberam aquecimento da parte inferior do corpo e dos membros inferiores, utilizando-se manta e aparelho específico para insuflação de ar aquecido na temperatura de 43°C (*Bair Hugger®*, modelo 750, *Arizant Healthcare, EUA*).

Após pré-oxigenação com 100% de oxigênio (O₂) por meio de máscara facial, a indução de anestesia foi realizada via IV com fentanil (5 µg/kg) e propofol (2 mg/kg), e o brometo de rocurônio (0,6 mg/kg) foi utilizado para facilitar a intubação orotraqueal e manter o bloqueio neuromuscular adequado durante a cirurgia. Os pulmões foram ventilados mecanicamente com volume corrente de 8 ml/kg e a frequência respiratória foi ajustada para manter a pressão expiratória final de dióxido de carbono (P_{ET}CO₂) próxima de 35 milímetros de mercúrio (mm Hg), usando o modo controlado por volume da estação de trabalho de anestesia *Dräger Primus (Dräger Medical, Alemanha)*.

Um fluxo de gás fresco de 2 l/min foi utilizado em ambos os grupos, com O₂ (0,5 l/min) e ar (1,5 l/min) no grupo desflurano e O₂ (0,8 l/min) e N₂O (1,2 l/min) no grupo desflurano/N₂O, utilizando-se de circuito semifechado com cal sodada para absorção de CO₂. Assim, todos os pacientes receberam fração inspirada de 40% de O₂, independentemente da alocação do grupo.

A temperatura central dos pacientes foi monitorada com sensor (90044 *Mon-a-Therm, Mallinckrodt Medical, México*) colocado no esôfago inferior e conectado a um monitor de temperatura (*Mallinckrodt Medical, EUA*). As concentrações inspiradas e expiradas de O₂, N₂O (no grupo desflurano + 60% N₂O) e desflurano, além dos valores de P_{ET}CO₂ foram monitorados pelo monitor incorporado na estação de trabalho de

anestesia *Primus*. Em ambos os grupos, a anestesia foi mantida com concentração inicial expiratória de desflurano de 6% (*Desforane, Baxter Healthcare, Porto Rico*). A concentração de desflurano foi ajustada ao longo da cirurgia para manter pressão arterial e frequência cardíaca entre -10% e -20% dos valores basais. Doses adicionais de fentanil (2 µg/kg) e rocurônio (0,2 mg/kg) foram administradas caso houvesse necessidade.

Analgesia pós-operatória foi realizada 15 minutos antes do final da cirurgia via IV com tramadol (100 mg) e dipirona (1 g), bem como ondansetrona (8 mg), para profilaxia pós-operatória de náuseas e vômitos. O bloqueio neuromuscular foi revertido com sugamadex (2 a 4 mg/kg), se necessário, conforme monitoramento do bloqueio neuromuscular. Após reversão total do bloqueio neuromuscular e resposta adequada à estimulação, realizou-se a extubação traqueal e os pacientes foram imediatamente transferidos para a Sala de Recuperação Anestésica.

Os dados hemodinâmicos foram obtidos no momento basal (antes da indução da anestesia) e após 15, 45, 75 e 90 minutos de anestesia. Os dados de P_{ET}CO₂, concentração final expiratória de desflurano e temperatura esofágica foram registrados após 15, 45, 75 e 90 minutos de anestesia.

3.5 Coleta de Material Biológico

Amostras de sangue venoso, coletadas em tubos com gel separador (*Becton Dickinson - BD, EUA*) e em tubos *PAXgene Blood RNA Tube (PreAnalytix, Suíça)*, foram obtidas de pacientes em jejum em três momentos: antes da medicação pré-anestésica - basal, aos 90 minutos após a indução anestésica e no dia posterior ao ato cirúrgico (aproximadamente 20 horas). As amostras previamente codificadas foram processadas imediatamente e amostras de soro foram obtidas após centrifugação (3500 rpm, 4°C durante 15 minutos), sendo que as alíquotas foram congeladas a -80°C, para posterior análises hormonais, bioquímica e de citocinas. Os tubos *Paxgene* foram mantidos em temperatura ambiente *overnight*, seguindo o protocolo do fabricante, antes de serem congelados a -80°C, para posterior extração de ácido ribonucleico (*RNA*).

3.6 Avaliação de Citocinas

As concentrações séricas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-17A e anti-inflamatória IL-10 foram determinadas utilizando-se o *Cytometric Bead Array (CBA) Human Enhanced Sensitivity Flex Set (BDTM, EUA)* por citometria de fluxo. Os kits da *BDTM* permitem a quantificação de citocinas utilizando diferentes populações

de *beads*, que são microesferas marcadas com diferentes intensidades de fluorescência *PerCP* (complexo proteína peridínina-clorofila), que podem ser detectadas pelo canal FL3 do citômetro. As amostras foram incubadas em solução contendo as *beads*, durante duas horas, em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após esse procedimento, as amostras foram lavadas e anticorpos específicos para cada citocina foram conjugados às amostras, as quais foram incubadas por mais duas horas, sob mesmas condições de luz e temperatura. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas e o complexo formado foi conjugado com ficoeritrina (*PE*), durante uma hora, sob mesmas condições de luz e temperatura anteriormente descritas, para posterior detecção no canal FL2. O citômetro de fluxo *BD FACSCalibur™* foi calibrado com o *software BD FACSComp™* e os dados foram coletados utilizando-se o *software BD CellQuest™*. Os dados foram então adquiridos e plotados nos gráficos FL3 *versus* FL2, indicando as intensidades de fluorescência de cada citocina. Para cada experimento, utilizou-se uma curva padrão com concentração de 0 a 200 pg/ml para cada citocina. Os limites de detecção para cada citocina (pg/ml) foram: IL-10: 0,014, IL-17A: 0,026, IL-1 β : 0,048, TNF- α : 0,067, IL-6: 0,069 e IL-8: 0,07.

3.7 Mensuração Proteica e Hormonal

A PCR de alta sensibilidade (PCR-as) foi detectada no soro por imunoenensaio quimioluminescente segundo instruções do fabricante (*High-Sensitivity CRP, Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics Products, Reino Unido*), sendo o valor de referência inferior a 3 mg/l.

A detecção sorológica dos hormônios ACTH, cortisol e prolactina foi realizada por ensaio imunoenzimático de micropartículas quimioluminescentes (*ACTH assay, Cortisol assay, Prolactin assay*, respectivamente, *Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics Products, Reino Unido*) utilizando-se o equipamento *Immulite 2000 XPi* (Reino Unido). Quanto aos valores de referência: ACTH: < 46 pg/ml; cortisol: 5-25 μ g/dl; prolactina: masculino: 2,5-17 ng/ml e feminino: 1,9-25 ng/ml.

3.8 Avaliação da Expressão Gênica

Após descongelamento dos tubos, em temperatura ambiente durante duas horas, utilizou-se o *kit PAXgene® Blood RNA kit (Qiagen/PreAnalytiX, Suíça)* para extração de *RNA*, conforme instruções do fabricante. As amostras de *RNA* foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, Suécia)*, sendo em seguida

transcritas para *complementary DNA (cDNA)* utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, EUA)*, de acordo com as instruções do fabricante, seguindo o ciclo a 25°C durante 10 minutos e 37°C por duas horas. As amostras de *cDNA* foram armazenadas a -80°C até serem analisadas pela técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (*qPCR*) em termociclador automático (*Applied Biosystems Prism 7500 Fast, EUA*).

Foram utilizados ensaios de *primers* e sondas (*TaqMan FAM-MGB - ThermoFisher Scientific, EUA*) para os genes: *IL-6* (Hs00985639_m1), *COX-2* (Hs00153133_m1) e *NF-kB* (Hs00765730_m1), além do controle endógeno β -actina - *ACTB* (Hs99999903_m1), utilizando-se *TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, EUA)* para realização dos experimentos.

A condição de ciclagem para todos os genes foi de 94°C durante 10 minutos para desnaturação, seguida de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos para anelamento e 60°C durante 60 segundos para extensão. Para garantir a ausência de contaminação, utilizou-se, em cada reação de amplificação, um controle negativo (ausência de *cDNA*) contendo os iniciadores de cada gene amplificado. Como controle da quantificação relativa dos genes, utilizou-se *pool* de amostras de *cDNA* de indivíduos saudáveis que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Portanto, o controle foi utilizado em toda placa de 96 poços, para todos os genes estudados. Para a quantificação gênica foram utilizados os valores do *cycle threshold (Ct)* pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para cada amostra, o valor de ΔCt foi determinado subtraindo-se a média das duplicatas dos valores de *Ct* do gene de interesse da média das duplicatas dos valores de *Ct* do gene referência/endógeno. Após, para determinação do $\Delta\Delta Ct$, o valor de ΔCt de cada amostra foi subtraído do valor da média de ΔCt das amostras controle (*pool*).

3.9 Análise Estatística

O tamanho amostral foi calculado com base em estudo piloto e estudos prévios (Schilling *et al.*, 2007; Mazoti *et al.*, 2013) em relação ao desfecho primário (citocina IL-6) assumindo uma diferença de 1,0% entre os valores médios dos grupos e um desvio padrão de 1,2%. Um mínimo de 20 pacientes por grupo foi necessário para detectar esta diferença utilizando-se teste com probabilidade de erro tipo I (α) de 0,05 e erro tipo II (β) de 0,20, com poder de 80%. Considerando que poderia haver perdas (10%) ao longo do estudo, 22 pacientes foram alocados em cada grupo. As análises estatísticas foram

realizadas com o *Statistical Package for the Social Sciences (Software Windows, versão 17.1, SPSS Inc., EUA)*.

Para os dados demográficos e intraoperatórios, foram avaliadas a relevância clínica bem como a diferença padronizada (diferença das médias ou de proporções dividida pelo desvio padrão combinado) entre os grupos. O desfecho primário (IL-6), os desfechos secundários (outros marcadores inflamatórios sistêmicos e genéticos além dos hormônios) e todos os outros parâmetros foram comparados entre os dois grupos em diferentes momentos por análise de perfil (análise de variância de medidas repetidas). Nesta análise, as seguintes hipóteses foram testadas: houve diferença entre as médias dos grupos ao longo do(s) tempo (momentos) e houve interação entre grupos e momentos. Essa análise foi seguida de determinação dos intervalos de confiança (IC) estabelecidos no nível de 95% com correção de Bonferroni para ajuste das múltiplas comparações dos momentos em cada grupo para minimizar a chance de erro tipo I. O tamanho do efeito foi expresso como as diferenças médias (DMs) entre os grupos e os IC correspondentes. Os valores foram expressos por média \pm desvio padrão ou média e erro padrão seguido por IC 95%. Para as análises, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

4 RESULTADOS

Quarenta e quatro pacientes foram aleatorizados. Entretanto, dois pacientes do grupo desflurano tiveram amostras hemolisadas e no grupo desflurano + 60% de N₂O a cirurgia de um paciente foi cancelada após a aleatorização e a amostra de um paciente hemolisou. Assim, 40 pacientes foram incluídos na análise estatística, sendo 20 de cada grupo (Figura 5).

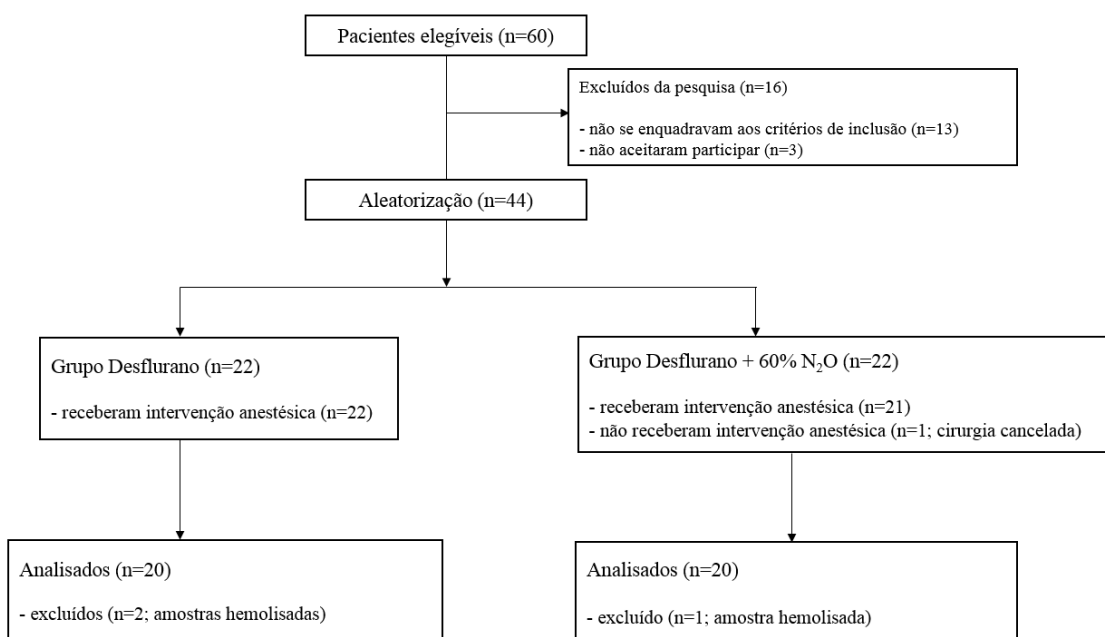


Figura 5. Fluxograma dos pacientes da pesquisa.

Houve semelhança entre os grupos em relação às características demográficas (Tabela 2) e aos dados intraoperatórios (Tabela 3), considerando que todas as diferenças padronizadas das variáveis incluíram o zero nos intervalos de confiança no nível de 95%, e sem diferença clinicamente importante entre os grupos. Nenhum paciente apresentou complicação cirúrgica ou clínica e todos os pacientes receberam alta hospitalar de acordo com o protocolo estabelecido.

Tabela 2. Dados demográficos dos pacientes de ambos os grupos avaliados

Características	Desflurano (n = 20)	Desflurano + N₂O 60% (n = 20)	Diferença Padronizada	IC 95%
Idade (anos)	29,8 ± 11,0	29,1 ± 8,3	0,07	[-0,49;0,63]
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	24,7 ± 4,8	23,5 ± 3,3	0,29	[-0,19;0,77]
Sexo (feminino/masculino)	10 / 10	11 / 9	0,32	[-0,21;1,10]

N₂O = óxido nitroso. Dados apresentados como média ± desvio padrão ou números absolutos seguidos da diferença padronizada e IC = intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3. Duração da anestesia e dose total dos fármacos utilizados nos grupos avaliados

Parâmetros	Desflurano (n = 20)	Desflurano + N₂O 60% (n = 20)	Diferença Padronizada	IC 95%
Duração da anestesia (minutos)	198,0 ± 49,6	184,5 ± 65,0	0,23	[-0,42;0,89]
Propofol (mg)	144,5 ± 25,8	148,0 ± 23,5	0,14	[-0,77;0,49]
Fentanil (µg)	469,0 ± 219,9	416,5 ± 203,3	0,25	[-0,36;0,85]
Brometo de rocurônio (mg)	48,2 ± 20,4	40,3 ± 9,6	0,50	[-0,11;1,10]

N₂O = óxido nitroso. Dados apresentados como média ± desvio padrão seguidos da diferença padronizada e IC = intervalo de confiança.

Referente aos dados hemodinâmicos (Tabela 4), não houve diferença significativa entre as médias dos grupos ao longo do tempo e não houve interação significativa entre tempos e grupos em relação às pressões arteriais sistólica ($P = 0,44$ e $P = 0,47$, respectivamente) e diastólica ($P = 0,78$ e $P = 0,47$, respectivamente), com diminuição

significante dos valores das pressões arteriais sistólica e diastólica durante a anestesia em comparação com o momento anterior à indução anestésica nos dois grupos. Quanto à frequência cardíaca, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos ao longo do tempo de anestesia ($P = 0,77$), mas houve interação significativa entre tempos e grupos ($P = 0,04$), com diminuição significativa de seus valores aos 90 minutos de anestesia em comparação com os do basal e 15 minutos após a anestesia apenas no grupo desflurano.

Tabela 4. Valores hemodinâmicos de ambos os grupos avaliados

Parâmetros	Grupos	Antes da indução anestésica	Tempo após a indução anestésica (minutos)				Média dos grupos ao longo do tempo	Valor de P	
			15	45	75	90		Diferença entre as médias dos grupos	Interação tempo x grupo
PAS (mm Hg)	Desfl	125 ± 18 ^a [114;137]	91 ± 22 ^b [77;105]	97 ± 11 ^b [90;104]	100 ± 11 ^b [93;107]	99 ± 9 ^b [93;105]	102 (1,8) [99;106]	0,44	0,47
	Desfl + N ₂ O 60%	122 ± 14 ^a [113;131]	96 ± 8 ^b [91;101]	103 ± 15 ^b [93;112]	101 ± 12 ^b [93;108]	101 ± 12 ^b [93;109]	104 (1,8) [101;108]		
PAD (mm Hg)	Desfl	74 ± 12 ^a [67;81]	55 ± 9 ^b [49;60]	53 ± 9 ^b [48;58]	56 ± 7 ^b [52;61]	56 ± 9 ^b [50;62]	59 (1,4) [56;62]	0,78	0,47
	Desfl + N ₂ O 60%	73 ± 9 ^a [68;80]	54 ± 7 ^b [50;59]	57 ± 12 ^b [50;64]	57 ± 10 ^b [51;63]	54 ± 9 ^b [49;60]	59 (1,4) [56;62]		
FC (bpm)	Desfl	81 ± 12 ^a [73;88]	80 ± 14 ^a [71;89]	73 ± 12 ^{ab} [65;81]	67 ± 11 ^{ab} [61;74]	66 ± 7 ^b [61;71]	73 (2,0) [69;78]	0,77	0,04
	Desfl + N ₂ O 60%	85 ± 16 [74;95]	75 ± 12 [68;83]	70 ± 13 [62;78]	71 ± 13 [63;79]	71 ± 13 [63;79]	74 (2,0) [70;79]		

n = 20 pacientes por grupo para todos os parâmetros avaliados; Desfl = desflurano; Desfl + N₂O 60% = desflurano associado a 60% de óxido nitroso; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; FC = frequência cardíaca. Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão [intervalo de confiança de 95% usando correção de Bonferroni para cinco tempos dentro de cada variável de resultado] e médias dos grupos ao longo do tempo e erro padrão [intervalo de confiança de 95%] e valores de P para a diferença entre as médias dos grupos ao longo do tempo e os efeitos de interação entre grupos e tempos; tempos seguidos de letras sobrescritas diferentes tiveram diferença significativa dentro de cada grupo.

Os valores da pressão expirada de dióxido de carbono, concentração expirada de desflurano e temperatura esofágica não apresentaram diferença significativa entre as médias dos grupos ao longo do tempo ($P = 0,15$, $P = 0,06$ e $P = 0,16$, respectivamente) e não houve interação significativa entre tempos e grupos ($P = 0,74$, $P = 0,09$ e $P = 0,39$, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5. Média dos valores dos grupos ao longo dos tempos de anestesia, de pressão expirada de dióxido de carbono (P_{ETCO_2}), concentração expirada de desflurano ($DESFL_{EXP}$) e temperatura esofágica (T_{ESOF})

Parâmetros	Grupos	Média dos grupos ao longo dos tempos	Valor de <i>P</i>	
			Diferença entre as médias dos grupos	Interação tempo x grupo
P_{ETCO_2} (mm Hg)	Desfl	33,9 (0,5) [33,0;34,8]	0,15	0,74
	Desfl + N ₂ O 60%	34,9 (0,5) [33,9;35,8]		
$DESFL_{EXP}$ (%)	Desfl	5,2 (0,2) [4,7;5,7]	0,06	0,09
	Desfl + N ₂ O 60%	5,9 (0,2) [5,4;6,4]		
T_{ESOF} (°C)	Desfl	36,2 (0,2) [35,9;36,5]	0,16	0,39
	Desfl + N ₂ O 60%	36,5 (0,2) [36,2;36,9]		

n = 20 pacientes por grupo para todos os parâmetros estudados; Desfl = desflurano; Desfl + N₂O 60% = desflurano associado a 60% de óxido nitroso. Os valores são apresentados como média e erro padrão [intervalo de confiança de 95%] dos grupos ao longo do tempo e valores de *P* para a diferença entre as médias dos grupos ao longo do tempo e os efeitos de interação entre grupos e tempo.

Em relação aos marcadores inflamatórios séricos (Tabela 6), não houve diferença significativa entre as médias dos grupos ao longo dos momentos e não houve interação entre momentos e grupos em relação a IL-6 ($P = 0,30$ e $P = 0,35$, respectivamente), IL-8 ($P = 0,62$ e $P = 0,56$, respectivamente), IL-10 ($P = 0,21$ e $P = 0,23$, respectivamente) e PCR-as ($P = 0,21$ e $P = 0,27$, respectivamente). Houve aumento significativo dos valores de IL-6 um dia após a cirurgia em comparação aos valores do basal e do intraoperatório no grupo desflurano, e em relação ao valor basal no grupo desflurano + 60% de N₂O. De forma semelhante, os valores de PCR-as aumentaram significativamente no período pós-operatório em comparação aos valores do basal e do intraoperatório em ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre os momentos dentro de cada grupo para as citocinas IL-8 e IL-10. Como as concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-17A ficaram abaixo dos valores limites de detecção, os dados não foram analisados.

Com relação à expressão dos genes inflamatórios, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos ao longo dos momentos em relação ao *NF-kB* (DM 0,25 [IC 95%: -0,43; 0,92]; $P = 0,45$), *IL-6* (DM -0,19 [IC 95%: -1,36; 0,98]; $P = 0,74$) e *COX-2* (DM -0,22 [IC 95%: -1,32; 0,88]; $P = 0,69$). Também não houve interação significativa entre grupos e momentos para *NF-kB* ($P = 0,74$), *IL-6* ($P = 0,97$) e *COX-2* ($P = 0,08$), bem como não houve diferença significativa entre momentos em cada grupo em relação aos genes inflamatórios (Figuras 6, 7 e 8).

Tabela 6. Concentração sérica de citocinas e de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as) de ambos os grupos avaliados

Parâmetros	Grupos	Momentos			Média dos grupos ao longo dos momentos	Valor de <i>P</i>	
		Basal	90 minutos após indução anestésica	Dia posterior ao ato cirúrgico		Diferença entre as médias dos grupos	Interação momento x grupo
IL-6 (pg/ml)	Desfl	0,31 ± 0,54 ^a [0,00;0,66]	0,49 ± 0,67 ^a [0,05;0,93]	5,23 ± 4,48 ^b [2,28;8,18]	2,01 (0,53) [0,93;3,09]	0,30	0,35
	Desfl + N ₂ O 60%	0,30 ± 0,79 ^a [0,00;0,86]	0,62 ± 0,83 ^{ab} [0,04;1,21]	7,54 ± 9,31 ^b [0,99;14,09]	2,82 (0,53) [0,43;5,22]		
IL-8 (pg/ml)	Desfl	3,30 ± 1,49 [2,32;4,29]	4,21 ± 2,72 [2,41;6,01]	4,29 ± 2,46 [2,66;5,93]	3,93 (0,45) [3,03;4,84]	0,62	0,56
	Desfl + N ₂ O 60%	3,30 ± 2,36 [1,65;4,95]	3,56 ± 1,95 [2,19;4,92]	4,02 ± 2,19 [2,49;5,55]	3,62 (0,45) [2,72;4,53]		
IL-10 (pg/ml)	Desfl	0,27 ± 0,23 [0,11;0,43]	0,41 ± 0,39 [0,14;0,68]	0,33 ± 0,38 [0,07;0,59]	0,34 (0,08) [0,17;0,51]	0,21	0,23
	Desfl + N ₂ O 60%	0,23 ± 0,18 [0,10;0,35]	0,71 ± 0,83 [0,14;1,29]	0,49 ± 0,29 [0,29;0,69]	0,48 (0,08) [0,33;0,62]		
PCR-as (mg/l)	Desfl	1,0 ± 0,7 ^a [0,5;1,5]	0,8 ± 0,6 ^a [0,4;1,3]	16,1 ± 7,9 ^b [10,4;21,9]	6,0 (1,4) [4,4;7,6]	0,21	0,27
	Desfl + N ₂ O 60%	1,5 ± 2,6 ^a [0,0;3,8]	1,3 ± 2,4 ^a [0,0;3,4]	17,2 ± 8,0 ^b [10,2;24,3]	6,7 (1,4) [4,8;8,6]		

n = 20 pacientes por grupo para todos os parâmetros avaliados; Desfl = desflurano; Desfl + N₂O 60% = desflurano associado a 60% de óxido nítrico; IL = interleucina. Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão [intervalo de confiança de 95% usando correção de Bonferroni para três momentos dentro de cada variável de resultado] e médias dos grupos ao longo do tempo e erro padrão [intervalo de confiança de 95%] e valores de *P* para a diferença entre as médias dos grupos ao longo do tempo e os efeitos de interação entre grupos e momentos; momentos seguidos de letras sobrescritas diferentes tiveram diferença significativa dentro de cada grupo.

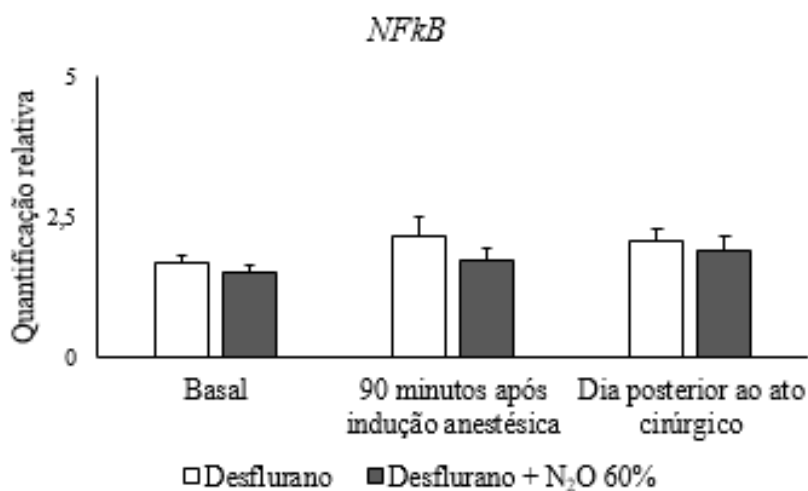


Figura 6. Quantificação gênica do fator nuclear kappa B (média \pm desvio padrão) nos momentos e grupos estudados.

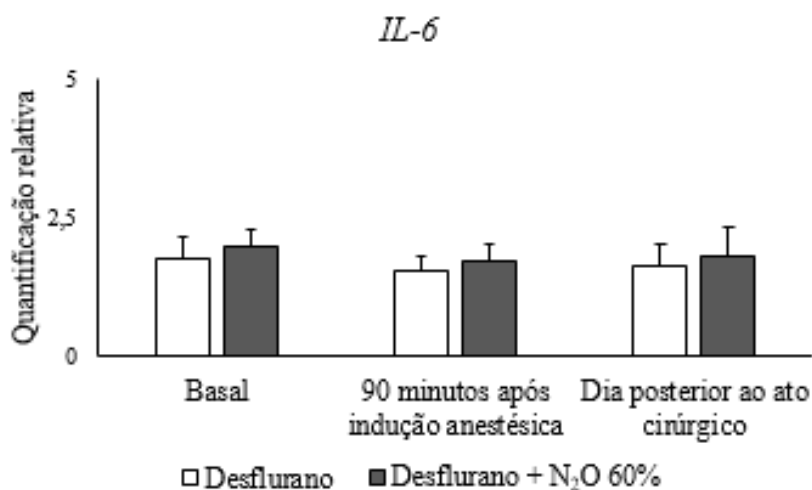


Figura 7. Quantificação gênica da interleucina-6 (média \pm desvio padrão) nos momentos e grupos estudados.

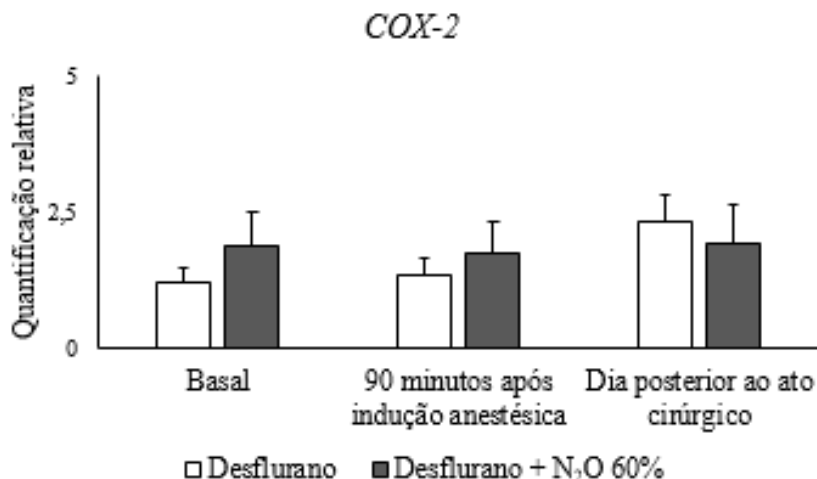


Figura 8. Quantificação gênica da ciclooxygenase-2 (média \pm desvio padrão) nos momentos e grupos estudados.

Em relação ao sistema neuro-endócrino, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos ao longo dos momentos e não houve interação significativa entre momentos e grupos em relação aos valores de ACTH ($P = 0,54$ e $P = 0,60$, respectivamente), cortisol ($P = 0,30$ e $P = 0,81$, respectivamente) e prolactina ($P = 0,89$ e $P = 0,88$, respectivamente). Houve aumento significativo (aproximadamente dez vezes) dos valores de prolactina no período intraoperatório em comparação com os do basal e pós-operatório para ambos os grupos (Tabela 7). Também não houve diferença significativa dos valores de prolactina ao separar os grupos por sexo (dados não apresentados).

Tabela 7. Concentração sérica dos hormônios avaliados em ambos os grupos

Hormônios	Grupos	Momentos			Média dos grupos ao longo dos momentos	Valor de <i>P</i>	
		Basal	90 minutos após indução anestésica	Dia posterior ao ato cirúrgico		Diferença entre as médias dos grupos	Interação momento x grupo
ACTH (pg/ml)	Desfl	10,1 ± 6,5 [5,6;17,4]	5,4 ± 0,1 [4,8;6,0]	7,4 ± 3,0 [5,3;9,5]	7,6 (1,2) [5,3;10,0]	0,54	0,60
	Desfl + N ₂ O 60%	9,3 ± 8,3 [3,7;15,0]	7,2 ± 4,6 [4,1;10,3]	9,4 ± 13,2 [0,4;18,4]	8,7 (1,2) [6,4;11,0]		
Cortisol (µg/dl)	Desfl	13,6 ± 4,9 [9,1;18,1]	7,4 ± 2,8 [4,8;10,0]	13,1 ± 6,7 [6,9;19,4]	11,4 (1,1) [9,0;13,7]	0,30	0,81
	Desfl + N ₂ O 60%	14,3 ± 4,0 [10,0;18,6]	9,9 ± 7,4 [2,0;17,8]	15,3 ± 6,7 [8,2;22,4]	13,2 (1,1) [10,6;15,8]		
Prolactina (ng/ml)	Desfl	10,7 ± 4,6 ^a [7,1;14,3]	104,0 ± 39,4 ^b [72,7;135,2]	10,5 ± 5,3 ^a [6,3;14,7]	41,7 (3,8) [33,9;49,6]	0,89	0,88
	Desfl + N ₂ O 60%	11,6 ± 4,0 ^a [8,9;14,3]	103,3 ± 41,0 ^b [75,4;131,1]	12,4 ± 6,9 ^a [7,8;17,1]	42,4 (3,8) [33,5;49,4]		

n = 20 pacientes por grupo para todos os parâmetros avaliados; Desfl = desflurano; Desfl + N₂O 60% = desflurano associado a 60% de óxido nitroso; ACTH = hormônio adrenocorticotrófico. Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão [intervalo de confiança de 95% usando correção de Bonferroni para três momentos dentro de cada variável de resultado] e médias dos grupos ao longo do tempo e erro padrão [intervalo de confiança de 95%] e valores de *P* para a diferença entre as médias dos grupos ao longo do tempo e os efeitos de interação entre grupos e momentos; momentos seguidos de letras sobrescritas diferentes tiveram diferença significante dentro de cada grupo.

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo clínico prospectivo aleatorizado mostrou resultados que são relevantes para a prática clínica: a comparação da anestesia mantida com desflurano ou desflurano + 60% de N₂O mostrou similaridade dos marcadores inflamatórios e neuroendócrinos avaliados durante e após cirurgia de septoplastia; adicionalmente, houve aumento significativo, em ambos os grupos, de prolactina no intraoperatório e dos mediadores inflamatórios IL-6 e PCR-as no pós-operatório.

Com relação aos dados hemodinâmicos, a diminuição significativa das pressões arteriais durante o procedimento cirúrgico, em ambos os grupos, foi importante na prevenção de sangramento excessivo no campo operatório de cirurgia de septoplastia. A manutenção da temperatura central dos pacientes ao longo da cirurgia foi também fator importante, uma vez que a hipotermia intraoperatória poderia atenuar a resposta inflamatória, influenciando a liberação de citocinas e conseqüentemente o processo inflamatório (Hofstetter *et al.*, 2007).

O desflurano foi inicialmente utilizado em concentração de 6% (1 CAM) para manutenção da anestesia nos pacientes dos dois grupos. Ajustes na concentração do halogenado foram feitas pelo anestesiológico durante a cirurgia de acordo com a resposta hemodinâmica. Esperava-se a utilização de menor concentração de desflurano no grupo desflurano + N₂O 60% em relação à do grupo desflurano, uma vez que o uso associado destes dois anestésicos poderia diminuir a concentração do halogenado (Rampil *et al.*, 1991). No entanto, concentrações semelhantes de desflurano foram utilizadas em ambos os grupos. O desflurano diminui a pressão arterial sanguínea de maneira concentração-dependente por redução da resistência vascular sistêmica, enquanto o N₂O aumenta o tono venoso e diminui a capacitância venosa. Quando a associação dos dois anestésicos é utilizada, existe efeito prevalente do N₂O no sistema cardiovascular, com aumento da resistência vascular sistêmica e conseqüentemente da pressão arterial sanguínea, em comparação com o uso de desflurano isoladamente (Pagel & Farber, 2015). Assim, em nosso estudo, foram necessárias maiores concentrações de desflurano para manutenção hemodinâmica adequada mesmo no grupo desflurano associado ao N₂O.

Em relação à avaliação de citocinas inflamatórias em pacientes cirúrgicos sob anestesia geral, Koksall *et al.* (2005) realizaram estudo em pacientes classificados com estado físico ASA I e II submetidos a cirurgia de timpanoplastia mantida com os halogenados desflurano (6% a 9%) ou sevoflurano (2% a 3%). Os autores observaram

aumento significativo de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no plasma e em lavado broncoalveolar no final da cirurgia, em comparação com os níveis basais, em ambos os grupos, mas com maior liberação de todas as citocinas nos pacientes mantidos com o desflurano, quando comparado com o sevoflurano. Diferentemente, em estudo realizado em pacientes submetidos a cirurgia torácica aberta sob manutenção anestésica com diferentes anestésicos: propofol, sevoflurano (1 CAM) ou desflurano (1 CAM), as concentrações séricas de TNF- α , IL-8 e IL-1 β não se alteraram no pós-operatório, enquanto que a de IL-6 aumentou nos três grupos de forma semelhante (Schilling *et al.*, 2011). Esses achados estão de acordo com aqueles obtidos em nosso estudo em relação à liberação sistêmica de IL-6 no dia posterior à cirurgia e ausência de alterações de IL-8 em ambos os grupos avaliados.

Levando em consideração que, no nosso conhecimento, nenhum estudo foi conduzido comparando os efeitos do N₂O associado ou não ao desflurano na resposta inflamatória, nossos achados contribuem para mostrar semelhança das técnicas anestésicas (desflurano e desflurano + N₂O 60%) em relação aos marcadores inflamatórios séricos no intra e pós-operatórios quando pacientes sem comorbidades associadas são submetidos a cirurgia minimamente invasiva. Esses achados corroboram estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (Nogueira *et al.*, 2018), que ao comparar a anestesia com desflurano associado ou não ao N₂O, não encontrou diferença significativa entre os grupos em relação ao estresse oxidativo, o qual está relacionado ao processo inflamatório. Em contraste, quando outro anestésico halogenado (sevoflurano) foi utilizado isoladamente ou em conjunto com N₂O 60% em pacientes submetidas a mastectomia, observou-se aumento significativo dos marcadores inflamatórios IL-1 β e IL-8 no líquido de revestimento do epitélio das vias aéreas apenas no grupo que recebeu N₂O (Kumakura *et al.*, 2013). Os mesmos autores não verificaram alteração de TNF- α , IL-6 e IL-10 no pós-operatório de ambos os grupos.

Outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa também demonstraram aumento de IL-6 um dia após a cirurgia em pacientes com estado físico ASA I que foram submetidos a cirurgia minimamente invasiva com outros anestésicos halogenados, como sevoflurano (Orosz *et al.*, 2012) e isoflurano (Mazoti *et al.*, 2013), demonstrando que a IL-6 é um dos principais marcadores de resposta inflamatória de fase aguda em pacientes cirúrgicos expostos a anestésicos, o que pode explicar o aumento dessa citocina em ambos os grupos do presente estudo. De fato, o pico das concentrações de muitos mediadores pró-inflamatórios somente é observado após muitas horas após a cirurgia (Zingg *et al.*, 2010),

mas a IL-6 é constantemente detectada no sangue periférico já nas primeiras horas após o ato anestésico cirúrgico devido à sua rápida liberação por leucócitos (Heinrich *et al.*, 1990). Embora não tenham sido observadas complicações pós-operatórias no presente estudo, como esperado, elevadas concentrações de IL-6 nas três primeiras semanas do pós-operatório, em pacientes que sofreram trauma mecânico extenso, foram correlacionadas significativamente com o aparecimento de complicações infecciosas (Ertel *et al.*, 1990).

Outro mediador importante da resposta inflamatória de fase aguda é a PCR-as, que tem valores aumentados conjuntamente com os da IL-6 no pós-operatório (Desborough, 2000; Jakobsson, 2012), conforme demonstrado no presente estudo. No entanto, estudo que verificou os efeitos dos halogenados desflurano e sevoflurano sem estarem associados ao N₂O em mulheres submetidas a cirurgia pélvica laparoscópica para retirada de cisto ovariano, não encontrou diferença significativa nas concentrações intra e pós-operatórias de IL-6 e PCR em relação ao período imediatamente anterior ao ato anestésico-cirúrgico na comparação entre os grupos e em cada um dos grupos (Marana *et al.*, 2013).

Distúrbios no recrutamento de células imunes e nas vias inflamatórias durante o estresse cirúrgico estão relacionados com complicações no pós-operatório, como por exemplo as infecções (Rossaint & Zarbock, 2018). Um estudo clínico realizado em pacientes com estado físico ASA I-IV submetidos a cirurgia colorretal, sob anestesia com sevoflurano associado ou não ao N₂O, demonstrou que a administração de N₂O 70%, mas não o uso isolado do sevoflurano, se correlacionou tanto com o aumento de incidência de infecção pós-cirúrgica como do período de hospitalização (Chen *et al.*, 2013). Diferentemente do que ocorreu em nosso estudo, em que os pacientes eram saudáveis, os quais foram submetidos a cirurgia minimamente invasiva e receberam N₂O 60%, esse anestésico não potencializou o quadro inflamatório nem levou a complicação pós-cirúrgica, mostrando-se seguro, sob as condições avaliadas, diferentemente do que pode ocorrer em cirurgias de grande porte e invasivas sob anestesia com esse anestésico, nas quais os pacientes, geralmente, já apresentam comorbidades associadas.

Considerando que os valores de IL-6 e PCR-as aumentaram apenas no dia seguinte à cirurgia e não durante a anestesia, nossos achados sugerem que uma condição inflamatória tenha ocorrido em resposta ao estresse anestésico-cirúrgico e não devido exclusivamente aos anestésicos utilizados. Além disso, a característica farmacocinética de baixa solubilidade sanguínea do desflurano e do N₂O permite rápida eliminação desses

agentes do organismo. Assim, as concentrações de IL-6 e PCR-as aumentaram apenas no período pós-operatório quando os pacientes já não estavam sob o efeito desses anestésicos ou de outros medicamentos utilizados no estudo durante o ato anestésico-cirúrgico. Adicionalmente, tanto a IL-8 como a IL-10 também não se alteraram durante ou após a cirurgia, independentemente da técnica anestésica. Esses achados estão em concordância com estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa em pacientes hígidos (ASA I) submetidos a cirurgia minimamente invasiva otorrinológica sob anestesia inalatória com sevoflurano (Orosz *et al.*, 2012) ou isoflurano (Mazoti *et al.*, 2013). Além disso, o uso do opióide fentanil pode ter contribuído para os baixos valores encontrados de outras citocinas avaliadas. Ao se ligar aos μ receptores, acredita-se que os opióides podem levar à imunossupressão, incluindo a expressão de citocinas, por causa de seus efeitos inibitórios na resposta celular e humoral (Wu *et al.*, 2009; Mazoti *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2017).

Os anestésicos podem modular o transcriptoma (Braz *et al.*, 2011; Braz *et al.*, 2012; Goto *et al.*, 2014). No que diz respeito aos marcadores moleculares de inflamação, mostramos, pela primeira vez, que não houve alteração nos três genes avaliados nos períodos intraoperatório e pós-operatório quando pacientes sem comorbidades submetidos a septoplastia foram mantidos com desflurano ou desflurano associado ao N₂O. Assim, não se detectou resposta inflamatória precoce ao se avaliar a expressão gênica de possíveis marcadores moleculares, concomitantemente com a avaliação das citocinas. Kotani *et al.* (1999b) observaram regulação positiva dos genes pró-inflamatórios em lavado broncoalveolar, com exceção do gene *IL-6*, ao longo e no final da cirurgia em pacientes com estado físico ASA I e II submetidos a cirurgia com duração superior a seis horas sob anestesia com propofol ou isoflurano. Assim, os autores não verificaram aumento de expressão de *IL-6*, como observado em nosso estudo. Esse mesmo grupo de pesquisadores, ao realizar estudo em ratos ventilados mecanicamente e expostos a diferentes anestésicos halogenados, relatou aumento na expressão de alguns mediadores pró-inflamatórios, mas não de *IL-6*, mas sem que houvesse aumento concomitante dessas citocinas em lavado pulmonar (Kotani *et al.*, 1999a). Assim, esses autores sugerem que a resposta inflamatória em nível transcricional em macrófagos alveolares pode ser modulada pelo tipo e duração de anestesia.

Ressalta-se que, diferentemente, em nosso estudo, a expressão gênica foi detectada em células do sangue periférico apenas em indivíduos com estado físico ASA I, os quais não tiveram longa duração da anestesia. Além disso, foram analisados diferentes

genes, mas, curiosamente, nosso estudo e os estudos realizados por Kotani *et al.* (1999a; 1999b) não observaram alterações de *IL-6* durante ou após anestesia inalatória. De fato, mudanças na expressão gênica não refletem necessariamente mudanças em nível proteico, considerando que algumas citocinas podem ser reguladas em nível translacional ou pós-translacional (Amsen *et al.*, 2009). Além disso, o estresse cirúrgico pode liberar hormônios e citocinas pró-inflamatórias e por *feedback* negativo, os corticosteroides podem inibir a expressão do gene das citocinas (Kurosawa & Kato, 2008). Adicionalmente, o tratamento com opióides também está relacionado com diferentes vias de imunossupressão, atuando por meio de receptores μ -opiáceos, suprimindo a ativação do *NF-kB* (Casellas *et al.*, 1991), que pode levar à menor indução na transcrição de genes dependentes, como é o caso da *COX-2*, o que também pode ter influenciado nossos achados.

Referente ao sistema neuro-endócrino, o aumento na liberação de prolactina secretada pela adeno-hipófise também pode ocorrer em resposta ao estresse cirúrgico e ao procedimento anestésico (Sakic *et al.*, 2009; Junuzovic *et al.*, 2011; Paola *et al.*, 2015). De forma similar aos nossos resultados, mulheres com estado físico ASA I e II submetidas a histerectomia abdominal mantida com anestesia inalatória (isoflurano associado ao N_2O) ou anestesia intravenosa (propofol) tiveram grande elevação da concentração de prolactina imediatamente antes da incisão cutânea, a qual foi mantida no intraoperatório, sendo que esse hormônio voltou às concentrações basais algumas horas após o final da operação, com maior valores de prolactina no grupo intravenoso (Crozier *et al.*, 1994). Outro estudo realizado em pacientes com estado físico ASA I submetidos a colecistectomia laparoscópica, mantidos com isoflurano ou propofol, mostrou prolactina e cortisol aumentados no grupo inalatório após uma hora do início da anestesia, sendo que ambos os hormônios retornaram aos valores basais após 24 horas do ato operatório (Graziola *et al.*, 2005).

De forma interessante, pacientes submetidas a cirurgia laparoscópica mantida com desflurano tiveram perfil de cortisol no intra e pós-operatório (Marana *et al.*, 2013) semelhante ao nosso estudo. Esses mesmos autores também mostraram que o desflurano foi associado a melhor controle de ACTH intraoperatório que o sevoflurano. Semelhantemente ao presente estudo, os estudos anteriormente mencionados (Crozier *et al.*, 1994; Graziola *et al.*, 2005; Marana *et al.*, 2013) também relataram o uso do opióide fentanil, o qual pode inibir a secreção de ACTH e cortisol quando administrado antes da incisão cirúrgica, assim como também pode estimular a secreção de prolactina via

receptores μ -opiáceos (Bent *et al.*, 1984; Pan & Teo, 1989; Paola *et al.*, 2015). Portanto, o fentanil possivelmente influenciou a resposta neuro-endócrina nos pacientes avaliados. No entanto, os opióides são importantes para evitar a dor, são seguros e comumente utilizados para indução e manutenção anestésicas, e doses moderadas e semelhantes foram usadas em ambos os grupos.

Assim, este estudo preencheu importante lacuna científica relacionada ao uso associado de anestésicos na prática clínica, contribuindo para elucidar os efeitos do desflurano e de sua associação com o N₂O na resposta inflamatória e neuro-endócrina. Dessa forma, tentou-se, ao máximo, minimizar possíveis vieses (critérios de não inclusão rigorosos, temperatura central adequada e manutenção hemodinâmica adequada) que poderiam alterar a resposta neuro-imune-endócrina em pacientes hígidos submetidos a cirurgia minimamente invasiva. Portanto, ambas as técnicas anestésicas foram semelhantes em relação aos efeitos neuro-imune-endócrinos e podem ser opções para pacientes hígidos submetidos a cirurgia minimamente invasiva. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar nossos achados e expandir a investigação em pacientes com comorbidades e/ou cirurgias invasivas.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, contrariamente à hipótese do estudo, pacientes submetidos a septoplastia que receberam anestesia com desflurano associado ao N₂O não apresentaram diferença no perfil inflamatório e na resposta neuro-endócrina quando comparados aos pacientes que receberam apenas o desflurano, mesmo com o halogenado sendo utilizado em concentrações similares em ambos os grupos. Houve aumento de prolactina no intraoperatório e de IL-6 e PCR-as no pós-operatório de maneira similar em ambos os grupos.

7 REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade inata: resposta inflamatória. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. p. 72-4.

Amsen D, de Visser KE, Town T. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. *Methods Mol Biol*. 2009;511:107-42.

Anti S, Giorgi R, Chahade W. Antiinflamatórios hormonais: glicocorticóides. *Einstein*. 2008;6:159-65.

Bent JM, Paterson JL, Mashiter K, Hall GM. Effects of high-dose fentanyl anaesthesia on the established metabolic and endocrine response to surgery. *Anaesthesia*. 1984;39:19-23.

Bilate A. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas Reumatol Clin*. 2007;8:47-51.

Blanco ML, Neto AC. O fator nuclear kappa B: Uma nova perspectiva para o estudo de drogas anti-inflamatórias. *Rev Cienc Med*. 2003;12:341-9.

Boost K, Hofstetter C, Flondor M, Betz C, Homann M, Pfeilschifter J, *et al*. Desflurane differentially affects the release of proinflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar fluid of endotoxemic rats. *Int J Mol Med*. 2006;17:1139-44.

Braz MG, Mazoti MÁ, Giacobino J, Braz LG, Golim MA, Ferrasi AC, *et al*. Genotoxicity, cytotoxicity and gene expression in patients undergoing elective surgery under isoflurane anaesthesia. *Mutagenesis*. 2011;26:415-20.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2017 [last updated 2017 Dec 28; cited 2018 Apr 10]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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

Braz MG, Braz LG, Braz JR, Pierine DT, Correa CR, Ferreira AL, *et al.* Comparison of oxidative stress in ASA physical status I patients scheduled for minimally invasive surgery under balanced or intravenous anesthesia. *Minerva Anesthesiol.* 2013;79:1030-8.

Casellas AM, Guardiola H, Renaud FL. Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. *Neuropeptides.* 1991;18:35-40.

Chalhoub V, Pottecher J, Asehnoune K, Mazoit J, Duranteau J, Benhamou D. Cytokine response and reactive oxygen species production after low- and intermediate – risk surgery. *Acta Anesthesiol Scand.* 2011;55:549-57.

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

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

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng K, *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017;9:7204-18.

Cheng CR. Inflammatory response to anesthesia and ways to attenuate it. *Adv Anesth.* 2005;23:107-41.

Crozier TA, Müller JE, Quittkat D, Sydow M, Wuttke W, Kettler D. Effect of anaesthesia on the cytokine responses to abdominal surgery. *Br J Anaesth.* 1994;72:280-5.

Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)*. 1990;79:161-5.

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

Ertel W, Faist E, Nestle C, Hueltner L, Storck M, Schildberg FW. Kinetics of interleukin-2 and interleukin-6 synthesis following major mechanical trauma. *J Surg Res*. 1990;48:622-8.

Garcia J, Issy A, Sakata R. Citocinas e anestesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52:86-100.

Goto G, Hori Y, Ishikawa M, Tanaka S, Sakamoto A. Changes in the gene expression levels of microRNAs in the rat hippocampus by sevoflurane and propofol anesthesia. *Mol Med Rep*. 2014;9:15-22.

Graziola E, Elena G, Gobbo M, Mendez F, Colucci D, Puig N. Study on the stress, hemodynamic and immunological response of two techniques (inhalation and intravenous) in videolaparoscopic cholecystectomies. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*. 2005;52:208-16.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin 6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265:621-36.

Hofstetter C, Boost KA, Flondor M, Basagan-Mogol E, Betz C, Homann M. Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mildhypoxemia in endotoxemic rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2007;51:893-9.

Hsing CH, Wang JJ. Clinical implication of perioperative inflammatory cytokine alteration. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2015;53:23-8.

Huitink J, Heimerikxs M, Nieuwland M, Loer S, Brugman W, Velds A, *et al.* Volatile anesthetics modulate gene expression in breast and brain tumor cell. *Anesth Analg.* 2010;111:1411-5.

Jakobsson J. Desflurane: a clinical update of a third-generation inhaled anaesthetic. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012;56:420-32.

Junuzovic D, Celic-Spuzic E, Hasanbegovic M. The correlation between type of anesthesia and the hormones levels during and after transvesical prostatectomy. *Acta Inform Med.* 2011;19:216-9.

Koksal GM, Sayilgan C, Aydin S, Uzun H, Oz H. The effects of sevoflurane and desflurane on lipid peroxidation during laparoscopic cholecystectomy. *Eur J Anaesthesiol.* 2004;21:217-20.

Koksal GM, Sayilgan C, Gungor G, Oz H, Sen O, Uzun H, Aydin S. Effects of sevoflurane and desflurane on cytokine response during tympanoplasty surgery. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005;49:835-9.

Kotani N, Takahashi S, Sessler DI, Hashiba E, Kubota T, Hashimoto H, *et al.* Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. *Anesthesiology.* 1999a;91:187-97.

Kotani N, Hashimoto H, Sessler D, Yasuda T, Ebina T, Muraoka M, *et al.* Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia. *Anesth Analg.* 1999b;89:1250-6.

Kumakura S, Kikuchi T, Yamaguchi K, Kugimiya T, Inada E. Exposure to nitrous oxide may increase airway inflammation during sevoflurane anesthesia. *Masui.* 2008;57:1200-6.

Kumakura S, Yamaguchi K, Sugawara Y, Murakami T, Kikuchi T, Inada E. Effects of nitrous oxide on the production of cytokines and chemokines by the airway epithelium during anesthesia with sevoflurane and propofol. *Mol Med Rep.* 2013;8:1643-8.

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

Laan M, Palmberg L, Larsson K, Lindén A. Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways. *Eur Respir J.* 2002;19:534-7.

Lee IT, Yang CM. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. *Mediators Inflamm.* 2013:1-12.

Lee YM, Song BC, Yeum KJ. Impact of volatile anesthetics on oxidative stress and inflammation. *Biomed Res Int.* 2015:1-8.

Lin C, Lee I, Yang Y, Lee C, Kou Y, Yang C. Induction of COX-2/PGE₂/IL-6 is crucial for cigarette smoke extract-induced airway inflammation: Role of TLR-4-dependent NADPH oxidase activation. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:240-54.

Lin E, Calvano S, Lowry S. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000;127:117-25.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods.* 2001;25:402-8.

Marana E, Russo A, Colicci S, Polidori L, Bevilacqua F, Viviani D, *et al.* Desflurane versus sevoflurane: a comparison on stress response. *Minerva Anesthesiol.* 2013;79:7-14.

Mazoti MA, Braz MG, de Assis Golim M, Braz LG, Dias NH, Salvadori DM, *et al.* Comparison of inflammatory cytokine profiles in plasma of patients undergoing otorhinological surgery with propofol or isoflurane anesthesia. *Inflamm Res.* 2013;62:879-85.

Nogueira FR, Braz LG, Souza KM, Aun AG, Arruda NM, Carvalho LR, *et al.* Comparison of DNA damage and oxidative stress in patients anesthetized with desflurane associated or not with nitrous oxide: a prospective randomized clinical trial. *Anesth Analg.* 2018;126:1198-205.

Oliveira C, Sakata R, Issy A, Gerola L, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61:255-65.

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

Pagel PS, Farber NE. Inhaled anesthetics: cardiovascular pharmacology. In: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL. *Miller's Anesthesia.* 8th ed. Philadelphia: Elsevier-Sanders; 2015. p. 706-51.

Pan JT, Teo KL. Fentanyl stimulates prolactin release through mu-opiate receptors, but not the serotonergic system. *Endocrinology.* 1989;125:1863-9.

Paola A, Carlo L, Cinzia DR, Valter P, Pierluigi N. Stress response to surgery, anesthetics role impact on cognition. *J Anesth Clin Res.* 2015;6:1-5.

Prielipp RC. An anesthesiologist's perspective on inhaled anesthesia decision-making. *Am J Health Syst Pharm.* 2010;67:13-20.

Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36:95-109.

Rampil IJ, Lockhart SH, Zwass MS, Peterson N, Yasuda N, Eger EI, *et al.* Clinical characteristics of desflurane in surgical patients: minimum alveolar concentration. *Anesthesiology.* 1991;74:429-33.

Rossaint J, Zarbock A. Perioperative inflammation and its modulation by anesthetics. *Anesth Analg.* 2018;126:1058-67.

Sakic K, Zura M, Sakic M, Vrbancic V, Bagatin D. Neuroimmunomodulation by regional or general anesthesia. *Period Biol.* 2009;111:209-14.

Sanders R, Weimann J, Maze M. Biologic effects of nitrous oxide. *Anesthesiology*. 2008;109:707-22.

Saraiva R. Desflurane: physicochemical properties, pharmacology and clinical use. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003;53:214-26.

Schilling T, Kozian A, Kretzschmar M, Huth C, Welte T, Buhling F, *et al*. Effects of propofol and desflurane anaesthesia on the alveolar inflammatory response to one-lung ventilation. *Br J Anaesth*. 2007;99:368-75.

Schilling T, Kozian A, Senturk M, Huth C, Reinhold A, Hedenstierna G, *et al*. Effects of volatile and intravenous anesthesia on the alveolar and systemic inflammatory response in thoracic surgical patients. *Anesthesiology*. 2011;115:65-74.

Seo KH, Choi JW, Jung HS, Yoo H, Joo JD. The effects of remifentanyl on expression of high mobility group box 1 in septic rats. *J Korean Med Sci*. 2017;32:542-51.

Sheeran P, Hall G. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1997;78:201-19.

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

Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001;107:7-11.

Tella Jr OI, Herculano MA, Delcello R, Aguiar PH. Prolactinomas: aspectos neurocirúrgicos. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2002;60:106-12.

Valente D, Costa-Amaral IC, Carvalho LV, Santos MV, Castro VS, Rodrigues DR, *et al*. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Rev Bras Saude Ocup*. 2017;42, suppl.1:e2s.

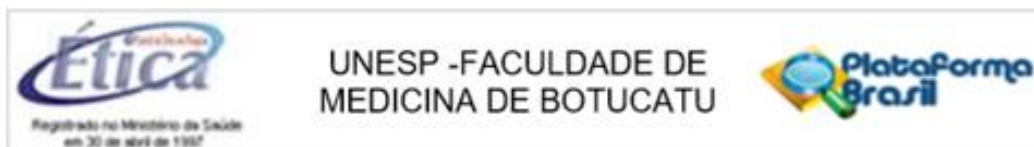
Wu Y, Wang Y, Zhan J. Effects of remifentanyl and fentanyl on LPS-induced cytokine release in human whole blood in vitro. *Mol Biol Rep*. 2009;36:1113-7.

Zhou T, Chou J, Watkins PB, Kaufmann WK. Toxicogenomics: transcription profiling for toxicology assessment. *EXS* 2009;99:325-66.

Zingg U, Forberger J, Frey DM, Esterman AJ, Oertli D, Beck-Schimmer B, *et al.* Inflammatory response in ventilated left and collapsed right lungs, serum and pleural fluid, in transthoracic esophagectomy for cancer. *Eur Cytokine Netw.* 2010;21:50-7.

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso

Pesquisador: nayara micarelli de arruda

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54861816.6.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Anestesiologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.526.007

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 03 de Maio de 2016

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

ANEXO B

REGISTRO BRASILEIRO DE ENSAIOS CLÍNICOS

The screenshot shows the top section of the RBR website. At the top left, there is a logo for 'Saúde Ministério da Saúde'. The main header is green and features the RBR logo and the text 'REGISTRO BRASILEIRO DE Ensaios Clínicos'. To the right of the header is a login section with fields for 'USUÁRIO' and 'SENHA', an 'ENTRAR' button, and links for 'Esqueceu a senha?' and 'Registrar-se'. Below the header is a navigation bar with links for 'NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO' and a search bar with a 'Buscar ensaios' button and a link for 'BUSCA AVANÇADA'. At the bottom of the header area, there is a breadcrumb trail: 'HOME / ENSAIOS REGISTRADOS /'.

RBR-2f8xhc**Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso**

Data de registro: 8 de Junho de 2016 às 10:15

Last Update: 7 de Nov. de 2017 às 10:27

Tipo do estudo:

Intervenções

APÊNDICE A**QUESTIONÁRIO****Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso**

Registro hospitalar do paciente:

Código do indivíduo no estudo:

Data: ____/____/____

I - Identificação

01-Nome:

02-Sexo: () masculino () feminino

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

04-Data nascimento ____/____/____

05-Idade:

06-Peso:

07-Altura:

08-IMC (índice de massa corpórea):

09-Origem (cidade):

10-Profissão:

II - Informações gerais

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

Consome:

Alimento	Sim	Não	Frequência
Frutas			
Verduras e legumes			
Carboidratos			
Frituras			
Leite e derivados			
Carnes			
Açúcares e doces			

- 12- Quantos copos de água ingere por dia?
- 13-Faz exercícios regularmente? () sim () não
- 14-Se sim, qual tipo (musculação, caminhada, etc)?
- 15-Quantas vezes por semana?
- 16-Fuma? () sim () não
- 17-Se sim, há quanto tempo?
- 18-Quantos cigarros/dia?
- 19-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, etc)?
- 20-Já fumou? () sim () não
- 21-Há quanto tempo deixou de fumar?
- 22-Quantos cigarros/dia fumava?
- 23-Durante quanto tempo fumou?
- 24-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, etc)?
- 25-Consome bebida alcoólica? () sim () não
- 26-Se sim, quanto por semana (copos)?
- 27-Tipo de bebida (cachaça, cerveja, uísque, vinho, etc)?
- 28-Já consumiu bebida alcoólica? () sim () não
- 29-Há quanto tempo deixou de beber?
- 30-Consome drogas? () sim () não Qual?
- 31-Há quanto tempo?
- 32-Tem contato com substâncias tóxicas? () sim () não
- 33-Se sim, qual (produtos de limpeza, agrotóxicos, gasolina, tinta)?
- 34-Há quanto tempo?
- 35-Foi submetido a raio X recentemente (dentário ou antes da cirurgia)?
() sim () não Quando?
- 36-Sabe quantas chapas de RX foram feitas?
- 37- Foi submetido a ressonância magnética nos últimos 30 dias?
() sim () não Quando?
- 38- Já fez tratamento com quimioterápico ou radioterapia? () sim () não
- 39-Se sim, qual?

40-Há quanto tempo?

41-Tem alguma doença (asma, hipertensão, diabetes, hepatite, lúpus, artrite, câncer)?
() sim () não

42-Qual?

43-Já teve alguma doença grave? () sim () não Qual?

44-Há quanto tempo?

45-Passou por algum estresse ultimamente? () sim () não Qual?

III - História Médica

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

47-Se sim, qual?

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

() sim () não

49-Se sim, qual (is)?

50-Frequência/dia:

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

52-Se sim, qual (is)?

53-Frequência/dia:

54-Há quanto tempo?

55-Tomou alguma medicação no último mês (remédio para pressão, antibiótico, tranquilizantes, remédio para tirar a dor, antiácidos, anti-histamínicos, corticóides, anti-inflamatórios)? () sim () não

56-Se sim, qual (is)?

57-Frequência/dia:

58-Há quanto tempo parou?

59- Teve alguma infecção ou inflamação no último mês? () sim () não

60- Se sim, qual (is)?

61- Há quanto tempo parou?

62- Está resfriado ou gripado? () sim () não

63-Já fez alguma cirurgia? () sim () não

64-Se sim, quantas?

65-Há quanto tempo foi a última?

66-Já foi submetido à anestesia? () sim () não

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

68-Há quanto tempo?

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

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

O(a) sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso” que pretende estudar se o anestésico desflurano (via inalatória) junto ou não ao óxido nitroso (via inalatória), os quais serão utilizados durante a cirurgia, têm algum efeito sobre o sistema imunológico (responsável pela defesa do organismo) e endócrino (hormônios). Será, portanto, avaliado se esses anestésicos podem causar alguma alteração nesses sistemas. Deve ser ressaltado que os anestésicos desflurano e óxido nitroso já são utilizados durante o procedimento cirúrgico não só no Brasil, mas em vários países no mundo.

O(a) sr(a) foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa por ter o estado físico classificado pela Sociedade Americana de Anestesiologistas como ASA I (indivíduos saudáveis, que não apresentam outra doença a não ser a condição cirúrgica). Serão adultos entre 18 e 50 anos, submetidos a cirurgia eletiva minimamente invasiva.

O questionário consta de algumas perguntas sobre a vida pessoal (nome, data de nascimento, sexo, peso, altura, etc), algumas informações gerais (alimentação, exercício, exposição a substâncias tóxicas, uso de bebida alcoólica e cigarro e drogas ilícitas, etc) e a história médica (uso de medicamentos e suplementos vitamínicos, doenças, etc). O questionário será aplicado pelo próprio pesquisador e não será gravado, e as respostas ao questionário terão duração de aproximadamente 15 minutos. O questionário é de caráter confidencial e será aplicado antes da realização da cirurgia. Sua identificação será preservada e somente os pesquisadores envolvidos no trabalho terão conhecimento de suas informações, com o comprometimento de mantê-las em sigilo. Na apresentação e publicação dos resultados da pesquisa não haverá identificação dos pacientes selecionados.

Dessa forma, solicitamos seu consentimento para que sejam coletadas 3 amostras de 20 ml de sangue periférico: a primeira será realizada no momento imediatamente antes do início da cirurgia, a segunda durante a cirurgia e a terceira um dia após a cirurgia (pós-operatório). A quantidade de sangue que será coletada não afetará sua recuperação pós-cirúrgica, pois o volume a ser coletado é muito pequeno em relação ao volume total de sangue do seu organismo. A coleta será realizada por profissional experiente e o procedimento pode causar desconforto pela picada da agulha, mas com risco mínimo ou quase inexistente, já que será utilizado material estéril e descartável. Ao participar desta pesquisa o(a) senhor(a) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a ação do anestésico desflurano associado ou não ao óxido nitroso no sistema imunológico e endócrino. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

O projeto contribuirá para melhor entendimento do papel do anestésico inalatório óxido nítrico e do desflurano no sistema de defesa do organismo dos pacientes submetidos a anestesia.

Caso você não queira participar da pesquisa, isto não trará nenhum prejuízo no seu tratamento médico. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa por meio do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário, por meio do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa. Você poderá retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido total sigilo do seu nome, do questionário aplicado ou dos resultados dos testes em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609. Endereço: Chácara Butignoli s/n, Rubião Júnior - Botucatu - São Paulo CEP: 18618-970, horário de funcionamento de 2ª à 6ª feira das 8:00 às 11:30 e das 14:00 às 17 horas.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome: _____ Assinatura: _____

Pesquisadora: Nayara Micarelli de Arruda

Data: ____/____/____ Assinatura: _____

E-mail: nayara_micarelli@hotmail.com

Orientadora: Mariana Gobbo Braz, Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu-SP. Fone: (14) 3880-1650

E-mail: mgbraz@fmb.unesp.br

APÊNDICE C**PROTOCOLO DA PESQUISA**

Comparação de marcadores inflamatórios em pacientes cirúrgicos sob anestesia com desflurano ou desflurano associado ao óxido nitroso

Data:

Número do paciente:

Anestesia (de acordo com o protocolo): () **Desflurano**

() **Desflurano + Óxido nitroso**

NOME:

RG DO HOSPITAL:

ASA:

SEXO:

IDADE:

ALTURA:

PESO:

NÚMERO DO LEITO HOSPITALAR:

Participarão deste estudo pacientes com indicação de anestesia para septoplastia eletiva com duração de, pelo menos, 90 minutos

Crítérios de Inclusão: pacientes ASA I, de ambos os sexos, entre 18-50 anos de idade e não fumantes

Crítérios de exclusão: recusa em participar, portadores de inflamação ou condições de infecção, usuários de drogas ilícitas, alcoolistas, obesos, gestantes, àqueles que receberam radiação em período inferior a 30 dias, os que estão sob medicação ou que são ocupacionalmente expostos a poluentes ambientais (ver questionário)

Aparelho de Anestesia: Primus (Dräger) / Monitor de Gás (Dräger)

Monitorização: incluir também o BNM

Etiquetagem dos tubos e coleta de punção venosa: codificar todos os tubos de coleta (números), datar e colocar a quantidade de sangue exata nos tubos e homogeneizá-los por 10 vezes. Após as duas coletas de sangue (puncionar veia em membro oposto ao da infusão de líquidos antes da medicação pré-anestésica e 90 min após a indução anestésica), avisar a Nayara M. de Arruda (3880-1632) para vir buscar os tubos de sangue. Qualquer dúvida conversar com o Dr Braz (99682 3026) ou Dr Leandro (99739 1712) ou Dra Mariana (99775 7936).

Após a coleta de sangue:

MPA: midazolam (3 mg) IV

Hidratação: RL - 4 ml/kg/h

GRUPO DESFLURANO

Indução

propofol: 2 mg/kg

fentanil: 5 µg/kg (indução) e manutenção com doses adicionais (s/n) de 1 a 2 µg/kg

rocurônio: 0,6 mg/kg (indução) e manutenção com 0,2 mg/kg (s/n) – de acordo com o BNM

Manutenção

fentanil: 1 a 2 µg/kg s/n

rocurônio: 0,2 mg/kg s/n (de acordo com o BNM)

desflurano: 1 CAM (6%) inicialmente e alterando de acordo com a necessidade do paciente

Fluxo de gases frescos: 2 l/min, fixando 40% de O₂ - **NÃO USAR N₂O!**

VC: 8 ml/kg **P_{ET}CO₂:** ~ 35 mm Hg

GRUPO DESFLURANO + ÓXIDO NITROSO

Indução

propofol: 2 mg/kg

fentanil: 5 µg/kg

brometo de rocurônio: 0,6 mg/kg

Manutenção

fentanil: 1 a 2 µg/kg s/n

rocurônio: 0,2 mg/kg s/n (de acordo com o BNM)

desflurano: 1 CAM (6%) inicialmente e alterando de acordo com a necessidade do paciente

Fluxo de gases frescos: 2 l/min, fixando 40% de O₂ e 60% de N₂O

VC: 8 ml/kg **P_{ET}CO₂:** ~ 35 mm Hg

Final da cirurgia:

Analgesia pós-operatória: tramadol (100 mg) e dipirona (1 g) IV

Anti-emético: ondansetrom (8 mg) IV

Descurarização: sugamadex (2 a 4 mg/kg), se houver necessidade, de acordo com a resposta ao BNM

Início da anestesia:-----

Início da cirurgia:-----

Fim da anestesia:-----

Fim da cirurgia:-----

Duração (min) da anestesia:-----

Duração (min) da cirurgia: -----

Dose total de propofol (mg):-----

Dose total de sugamadex (mg) -----

Dose total de fentanil (μ g):-----

Dose total de rocurônio (mg):-----

Medicações no pré-operatório (fármaco e dose):

Medicações no intra-operatório (fármaco e dose):

*** 3ª coleta de sangue venoso (20 ml) - dia seguinte à cirurgia, de manhã (paciente em jejum) – ver informação na página 1**

Medicações no pós-operatório (fármaco e dose):

Atributos Momentos	Hora	Pexp. desflurano (%)	PA sist. (mm Hg)	PA diast. (mm Hg)	FC (bpm)	SpO ₂ (%)	P _{ET} CO ₂ (mm Hg)	Temp. Central (°C)
Antes da indução		-					-	
Após a indução		-						
Após a intubação traqueal								
15 min. após a indução								
45 min. após a indução								
75 min. após a indução								
90 min. após a indução								