



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

Thalita Leone Alves Rocha

**Avaliação do status antioxidante, das citocinas
inflamatórias e metaloproteinases em ratos
anestesiados com isoflurano ou sevoflurano**

Orientador: Prof.Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

Botucatu
2018

Thalita Leone Alves Rocha

**Avaliação do status antioxidante, das citocinas
inflamatórias e metaloproteinases em ratos
anestesiados com isoflurano ou sevoflurano**

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em
Anestesiologia

Orientador: Prof.Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

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

Rocha, Thalita Leone Alves.

Avaliação do status antioxidante, das citocinas inflamatórias e metaloproteinases em ratos anestesiados com isoflurano e sevoflurano / Thalita Leone Alves Rocha.
- Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Carlos Alan Candido Dias Junior
Capes: 40102130

1. Éter (Anestésico). 2. Isoflurano. 3. Estresse oxidativo. 4. Aorta. 5. Metaloproteinases da Matriz.

Palavras-chave: Isoflurano ; Sevoflurano; aorta; estresse oxidativo.

Thalita Leone Alves Rocha

**Avaliação do status antioxidante, das citocinas
inflamatórias e metaloproteinases em ratos
anestesiados com isoflurano ou sevoflurano**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de doutor.

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior
Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP

Profa. Dra. Patrícia de Souza Rossignoli
Faculdade de Filosofia e Ciências/UNESP

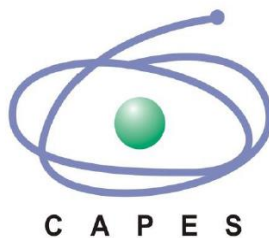
Profa. Dra. Cristina Antoniali Silva
Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez
Universidade de Ribeirão Preto/UNAERP

Botucatu, 03 de Dezembro de 2018

Financiamento



(Bolsa CAPES- doutorado: Período de vigência 03/2016 – 11/2018)



**Proc. 16/18782-3
(Auxílio regular à pesquisa)**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, meu mestre e guia nessa caminhada terrena. Aos meus pais, **Mônica e Ricardo** e ao meu “segundo pai” **Sérgio**, pela dedicação absoluta a minha educação e por sempre acreditarem no meu potencial.*

*Ao meu marido, **Leonardo**, e minha filha **Mainá**, por estarem comigo, ensinando-me e apoiando-me em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A toda minha família pelo carinho e amor incondicional. Por me ajudarem a superar os momentos difíceis e por sempre torcerem por mim nos períodos de transformação e novos desafios.

Ao Prof. Carlos Alan Candido Dias Junior, pelos cinco anos de orientação. Por toda a confiança em mim depositada. Por exigir sempre o melhor de mim, apostando no meu crescimento e no meu potencial. Gratidão eterna pelos ensinamentos e apoio.

Ao meu marido Leonardo, pelo companheirismo, amor, carinho, dedicação, compreensão, alegria e bom humor. Muito obrigada por tornar minha vida mais leve e feliz.

A minha filha Mainá por me mostrar o verdadeiro sentido da palavra amor. Por auxiliar-me na reconexão com minha criança interna. Pelos ensinamentos diários e por trazer a tona meus maiores medos, minhas sombras e frustrações, para que dessa forma pudessem ser superadas, Muito obrigado por ter escolhido a mim como sua mãe. Te amo incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

*Aos meus queridos amigos de laboratório **Jéssica** (Jess), **Regina** (Regis), **José Sérgio** (Zezito), **Ediléia** (Léia) e **Leticia** (Létis), **Gabriela** (Gabis), **Teubislete** (Bila), **André Miller** e **Hélio** por fazerem parte da minha vida nesses últimos anos. Por toda amizade, companheirismo, trabalho em equipe, trapalhadas e risadas. Vocês foram e sempre serão importantes na minha vida.*

*Aos meus amigos de pós-graduação: **Nathalia** (Nati) e **Brayan** agradeço pela amizade, apoio e ajuda imprescindível.*

*A **Profª Drª Elen Rizzi**, e as colegas **Giselle F. Bonacio**, e **Katiussia Pinho da Silva** pela imensa colaboração durante a realização desse trabalho .*

*A **Tatiane**, por se demonstrar sempre muito prestativa e disposta em ajudar no que fosse preciso.*

*A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro durante o mestrado.*

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concretizado.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

Resumo

ROCHA, T. L. A. **Avaliação do status antioxidante, das citocinas inflamatórias e metaloproteinases em ratos anestesiados com isoflurano e sevoflurano.** Botucatu, 2018. Tese (Doutorado em Anestesiologia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

O presente estudo teve por objetivo investigar e comparar as alterações relacionadas à reatividade vascular e aos biomarcadores de estresse oxidativo e da inflamação em ratos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano. Para alcançar nossos objetivos, ratos Wistar machos adultos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: não anestesiado (grupo controle) e anestesiados com isoflurano (grupo Iso) ou sevoflurano (grupo Sevo). A responsividade vascular à fenilefrina (PHE) e acetilcolina (ACh) na presença ou ausência de éster N-nitro-L-arginina-metilico (L-NAME) foram avaliadas em anéis de aorta torácica com endotélio intacto (E +) e endotélio desnudo (E-). Os metabólitos do óxido nítrico (NO) (NOx), a peroxidação lipídica, a função antioxidante, os níveis de citocinas e a atividade das metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) também foram avaliados. Nenhuma diferença significativa foi observada com relação aos dados hemodinâmicos e temperatura entre os grupos anestesiados. Nos anéis com endotélio intacto, a anestesia com o sevoflurano reduziu a vasoconstrição induzida pela PHE e pelo KCL quando comparado ao grupo controle e Iso, respectivamente ($P < 0.05$). O isoflurano aumentou significativamente a vasoconstrição induzida pela PHE e pelo KCl, nos anéis com endotélio desnudo ($P < 0.05$). Níveis de NO reduzidos foram observados após a anestesia com sevoflurano ($P = 0.01$), mas não com isoflurano. O estresse oxidativo foi significativamente aumentado em ambos os grupos anestesiados quando comparado com o grupo Control ($P < 0.05$). O isoflurano aumentou os níveis de IL-1 β , enquanto o sevoflurano reduziu a IL-10 e IL1 β . Aumentos da atividade de MMP-2 na aorta foram observados somente no grupo anestesiado com sevoflurano ($P < 0.05$). Os resultados demonstram que 150 minutos de

anestesia com sevoflurano, mas não com isoflurano, prejudicam a responsividade vascular aos agentes vasoconstritores. Além disso, enquanto os dois anestésicos aumentam o estresse oxidativo, apenas o sevoflurano reduz os níveis de NO e citocinas e aumenta da atividade das MMPs.

Palavras Chave: isoflurano, sevoflurano estresse oxidativo, metaloproteinases de matriz extracelular.

Abstract

ROCHA, T. L. A. **Evaluation of the antioxidant status of inflammatory cytokines and metalloproteinases in rats anesthetized with isoflurane and sevoflurane.** 2018. Tese (PhD in Anesthesiology) – School of Medicine, São Paulo State University, “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2018.

The current study aimed to investigate and compare the changes on vascular reactivity, biomarkers of oxidative stress and inflammation of rats anesthetized with isoflurane or sevoflurane. Adult Wistar rats were assigned to three experimental groups (n = 6 per group): Non-anesthetized (Control group) and anesthetized with isoflurane (Iso group) or sevoflurane (Sevo group). Vascular responsiveness to phenylephrine (PHE) and acetylcholine (ACh) in the presence or absence of N ω -nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) was evaluated in thoracic aortic rings with intact endothelium (E+) and denuded endothelium (E-). Nitric oxide (NO) metabolites (NOx), lipid peroxidation, antioxidant function, cytokines levels and matrix metalloproteinases (MMPs) activity were also assessed. In intact endothelium-aortic rings sevoflurane impairs PHE-induced vasoconstriction versus control group and reduces KCl-induced vasoconstriction versus Iso group (P < 0.05). In denuded endothelium-aortic rings isoflurane increases vasoconstriction induced by both PHE and KCl (P < 0.05). Sevoflurane, but not isoflurane, reduces NO (P = 0.01). Oxidative stress was increased in Sevo and Iso groups (P < 0.05). While sevoflurane reduced IL-10 and IL-1 β , isoflurane increased IL-1 β . MMP-2 activity in aorta was increased in Sevo (P < 0.05), but not in Iso group. We concluded that 150 minutes of anesthesia with sevoflurane, but not with isoflurane, impairs vascular responsiveness to vasoconstrictors agents. Also, while both anesthetics increased oxidative stress, only sevoflurane reduced NO and cytokines and increased MMPs activity.

Keywords: isoflurane, sevoflurane, oxidative stress, extracellular matrix metalloproteinases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação do óxido nítrico na célula muscular lisa.....	22
Figura 2. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular.....	35
Figura 3. Representação da contração induzida por KC a 96 mM e das curvas concentração-resposta ao KCl e a PHE determinadas em preparações isoladas de aorta torácica.....	47
Figura 4. Representação gráfica das curvas concentração-resposta a ACh na ausência e presença do L-NAME em preparações isoladas de aorta torácica.....	48
Figura 5. Representação dos valores de Total NOx na aorta	50
Figura 6. Representação dos valores de MDA no plasma.....	51
Figura 7. Representação dos valores de citocinas na aorta	52
Figura 8. Representação do gel de zimograma e dos valores de densitometria das MMP-2 e MMP-9 no plasma.....	53
Figura 9. Representação do gel de zimograma e dos valores de densitometria das MMP-2: 75, 72 e 64 kDa e total na aorta.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis hemodinâmicas e temperatura de ratos anestesiados com 2-2,5% de isoflurano (grupo Iso) ou 3-3,5% de sevoflurano (grupo Sevo).....	45
Tabela 2. Valores de E_{max} e pEC_{50} para KCl , PHE e ACh na ausência ou na presença de L-NAME, obtidos de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - acetilcolina

°C- graus centígrados

cGMP - guanosina monofosfato cíclica

ELISA - ensaio de imuno adsorção enzimática

E_{max} - efeito máximo

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EROs - espécies reativas de oxigênio

ERN - espécies reativas de nitrogênio

FC - frequência cardíaca

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

GCs - guanilato ciclase solúvel

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

KCl - cloreto de potássio

LDL - *low density lipoprotein*

L-NAME - N ω -nitro-L-arginina-metil éster

MDA - malondialdeído

MLV – músculo liso vascular

MMP - metaloproteinases de matriz extracelular

mmHg - milímetros de mercúrio

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PAD - pressão arterial diastólica

PAM - pressão arterial média

PAS- pressão arterial sistólica

pEC₅₀ - logarítmo negativo da EC₅₀

PHE - fenilefrina

PKG - proteína quinase G

RL - radical livre

rpm - rotação por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TBA - Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
1.1 Anestésicos Voláteis	19
1.2 Anestésicos voláteis e endotélio	20
1.3 Anestésicos voláteis e estresse oxidativo.....	23
1.4 Anestésicos voláteis e inflamação	25
1.5 Metaloproteinases da matriz extracelular (MMP)	27
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	30
MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Preparo dos animais e anestesia	32
3.3 Isolamento e montagem das preparações de aorta torácica	34
3.3.1 Curvas concentração-resposta	36
3.3.2 Análise de parâmetros farmacológicos	37
3.4 Determinação de nitrito / nitrato (total NOx)	37
3.5 Determinação da peroxidação lipídica.....	38
3.6 Determinação da capacidade oxidante total.....	39
3.7 Determinação de citocinas em amostras de aorta	39
3.8 Atividades das MMPs em amostras de plasma e aorta	40
3.9 Análise estatística	41
RESULTADOS	44
4.1 Efeitos do isoflurano e sevoflurano sobre a temperatura e parâmetros hemodinâmicos	44
4.2 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na reatividade vascular em aorta torácica com endotélio intacto e desnudo.....	46
4.3 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na produção de óxido nítrico, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total.....	50
4.4 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na liberação de citocinas em aorta	51
4.5 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na atividade de MMP-9 e MMP-2 em plasma e aorta	52

DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	65

Introdução

INTRODUÇÃO

Estima-se que, anualmente, aproximadamente 100 milhões de pessoas sejam submetidas a procedimentos cirúrgicos, sendo que a maior parte desses procedimentos é realizada sob anestesia geral inalatória (Eckenhoff *et al.*, 2004). Por essa razão, tem-se discutido amplamente quais seriam os possíveis danos à saúde ocasionados pelo uso dos anestésicos voláteis (Karabıyık *et al.*, 2001).

Estudos prévios *in vitro* têm demonstrado que os agentes halogenados, como o isoflurano e o sevoflurano, podem interferir na resposta vasomotora (Nakamura *et al.*, 1994; Kazuma *et al.*, 2018), entretanto, existem poucas pesquisas avaliando os efeitos do uso desses anestésicos após administração por via inalatória (Samarska *et al.*, 2009).

Além disso, embora estudos experimentais e epidemiológicos tenham associado o emprego dos anestésicos voláteis a aumentos dos níveis de estresse oxidativo e imunossupressão pós-operatória, esses resultados ainda se apresentam controversos (Kurosawa, Shin e Kato, Masato, 2008; Türkan *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013).

1.1 Anestésicos Voláteis

Os anestésicos voláteis têm sido utilizados há mais de 150 anos para fornecer anestesia geral (Capey, 2007). O emprego desses agentes inalatórios teve como marco histórico a demonstração pública bem sucedida do uso do dietil éter por William Morton, em meados dos anos 1840 (Chang *et al.*, 2015). Desde então,

a anestesiologia passou por grandes transformações, à medida que novos anestésicos, como o óxido nitroso (N₂O), o clorofórmio e o tricloroetileno, foram se consagrando (Campagna, Miller e Forman, 2003).

A síntese e a introdução dos agentes halogenados, pós-segunda guerra mundial, representou outro profundo avanço no desenvolvimento da anestesia, dando início a era moderna da anestesiologia (Stachnik, 2006).

Dentre os anestésicos inalatórios contemporâneos mais utilizados, para indução e manutenção da anestesia, na rotina cirúrgica atual estão o isoflurano e o sevoflurano (Eger, 1994). Esse fato se deve à vantagem dos dois anestésicos terem baixos coeficientes de partição sangue-gás, o que lhes confere uma rápida indução e recuperação da anestesia, sobretudo quando comparados a anestésicos halogenados mais antigos como o halotano (Eger Ei, 2004).

Apesar da eficácia e da segurança demonstradas por algumas décadas de uso clínico do isoflurano e do sevoflurano, ainda há inúmeros questionamentos a serem respondidos referente a potencial influência desses anestésicos na resposta vascular, no equilíbrio redox e no perfil inflamatório.

1.2 Anestésicos voláteis e endotélio

O conhecimento sobre a função do endotélio vascular, antes considerado apenas uma barreira física, mudou consideravelmente depois que Furchgot e Zawadski demonstraram sua participação na regulação do tônus vascular (Furchgott e Zawadzki, 1980). Desde então, tem sido implicado às células

endoteliais vasculares inúmeras funções específicas, que ultrapassam a modulação do tônus vascular, como: controle da coagulação e fibrinólise, remodelamento vascular, participação na resposta inflamatória e imune, entre outras (Khazaei, Moien-Afshari e Laher, 2008).

O endotélio é responsável por sintetizar e liberar, em resposta a estímulos fisiológicos e neuro-humorais, uma variedade de substâncias vasoativas que contribuem para a manutenção da homeostase vascular (Sandoo *et al.*, 2010). Dentre essas substâncias liberadas pela célula endotelial a que possui maior relevância é o óxido nítrico (NO). Esse gás, cuja meia vida é extremamente curta, é sintetizado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina por ação de uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (Förstermann e Sessa, 2012). Existem atualmente três isoformas de NOS reconhecidas: a NOS neuronal (nNOS ou NOS 1), a NOS indutível (iNOS ou NOS 2) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS 3). No leito vascular, a principal responsável pela produção de NO é a eNOS (Alderton, Cooper e Knowles, 2001).

Em condições fisiológicas, a força de arraste e a tensão de cisalhamento (*shear stress*) exercida pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais leva a formação basal de NO (Vallance e Chan, 2001). O NO produzido a partir da eNOS difunde-se do endotélio para o músculo liso vascular e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) causando um aumento do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Palmer *et al.*, 1988). Este, por sua vez, ativa a proteína quinase G (PKG) iniciando uma cascata de sinalização celular que resulta em redução do cálcio intracelular e, conseqüentemente, em relaxamento vascular

denominado como disfunção endotelial (Vallance e Chan, 2001; Endemann e Schiffrin, 2004)

Sabe-se que grande parte dos anestésicos gerais, incluindo os inalatórios, podem influenciar mecanismos celulares e moleculares que participam da regulação do tônus vascular (Akata, 2007). Os anestésicos voláteis tem demonstrado promover alteração na resistência vascular periférica por ação direta na musculatura lisa vascular (MLV) e/ou nas células endoteliais em vários leitos vasculares (Akata, Izumi e Nakashima, 2000; Toda, Toda e Hatano, 2007). Diversos estudos *in vitro*, mostraram que os halogenados, como o isoflurano e o sevoflurano, interferem no relaxamento dependente do endotélio por meio de diferentes mecanismos, os quais ainda não estão completamente elucidados (Toda *et al.*, 1992; Blaise *et al.*, 1997; Kazuma *et al.*, 2018). Enquanto o isoflurano inibe a formação de NO no endotélio, possivelmente por atuação nos receptores muscarínicos, proteína G, canais de cálcio ou na atividade da eNOS (Nakamura *et al.*, 1994), o sevoflurano parece prejudicar a vasodilatação por inativação do NO, via liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Yoshida e Okabe, 1992).

1.3 Anestésicos voláteis e estresse oxidativo

Sabe-se que os radicais livres (RL), as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são constantemente produzidas pelo organismo como resultado do metabolismo aeróbio normal (Birben *et al.*, 2012). Em condições fisiológicas, a produção de EROs e ERN é baixa e o sistema antioxidante endógeno é capaz de

neutralizar de maneira efetiva esses agentes. Contudo, quando a produção de RL e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes há a instalação de um processo denominado “estresse oxidativo” (Schieber e Chandel, 2014). Esse processo, por sua vez, pode ocasionar a oxidação de biomoléculas e/ou desequilíbrio homeostático, resultando na perda de diversas funções celulares (Incalza *et al.*, 2018). Por causa disso, o estresse oxidativo possui um papel importante na etiologia de várias patologias, como as doenças neurodegenerativas, doenças vasculares, cardíacas e câncer (Uttara *et al.*, 2009; Sosa *et al.*, 2013; Incalza *et al.*, 2018).

A produção elevada de EROs pode induzir disfunção e remodelamento vascular por meio de danos oxidativos (Xu e Touyz, 2006). A formação das EROs, no leito endotelial, é mediada por algumas enzimas vasculares que incluem a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, eNOS desacoplada, isoenzimas da citocromo P450, lipooxigenase, ciclooxigenase, heme oxigenase e glicose oxidase. Entretanto, a principal fonte de EROs no endotélio vascular parece ser a NAD(P)H oxidase (Cai e Harrison, 2000).

Além disso, as EROs foram reconhecidas como moléculas sinalizadoras por mediar respostas celulares específicas na vasculatura, incluindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios e a ativação de MMPs (Taniyama e Griendling, 2003). A esse respeito, as EROs podem provocar a ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1, fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1), que estão diretamente envolvidos na resposta inflamatória. O NF- κ B regula a expressão de vários genes que participam da

resposta imune, entre eles a IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral- α (FNT- α), IL-8 e várias outras moléculas de adesão (Forrester *et al.*, 2018).

Estudos tem demonstrado que os anestésicos halogenados podem induzir estresse oxidativo por meio da formação de compostos reativos ou liberação de EROs (Jaloszynski *et al.*, 1999; Alleva *et al.*, 2003). Cerca de 5% do volume de sevoflurano inalado é metabolizado no fígado pela isoenzima citocromo P450, (Kharasch, 1995), o que pode desencadear a formação de peroxinitrito e aumentar peróxidos intracelulares e óxido nítrico, elevando a produção de EROs (Brozovic *et al.*, 2008).

Embora, nas últimas décadas, uma série de estudos *in vitro*, em animais e em humanos, tenham sido realizados para determinar os efeitos do isoflurano e sevoflurano no estresse oxidativo, os resultados ainda se mostram contraditórios, o que reforça a necessidade da realização de mais pesquisas envolvendo o assunto (Lee, Y.-M., Song, B. C. e Yeum, K.-J., 2015).

1.4 Anestésicos voláteis e inflamação

A inflamação é um processo fisiológico que tem como função proteger o organismo de estímulos nocivos, como infecção por agentes patogênicos ou injúria mecânica (Medzhitov, 2008). O processo inflamatório desempenha um papel fundamental na reparação tecidual e na cicatrização, no entanto uma reação inflamatória exacerbada pode causar inúmeras complicações, principalmente em

situações pós-operatórias. (Dąbrowska e Słotwiński, 2014; Eming, Wynn e Martin, 2017).

Sabe-se que a anestesia geral, assim como o estresse oriundo do ato cirúrgico, pode influenciar as respostas inflamatórias essenciais para a manutenção do estado homeostático (Stollings *et al.*, 2016). Esse fato se deve a atuação dos anestésicos sobre a imunidade celular, uma vez que alteram tanto as funções de células imunocompetentes como a expressão de genes responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios (Kurosawa, S. e Kato, M., 2008).

Em indivíduos saudáveis submetidos à cirurgia eletiva ou pouco invasiva os efeitos causados pela anestesia nas células imunológicas parece não oferecer grandes prejuízos, entretanto pacientes com disfunção pré-existente do sistema imune, sepse e falência múltipla de órgãos, bem como em pacientes com alto risco de complicações perioperatórias, o tipo de anestésico usado e o método de anestesia podem ter implicações clínicas importantes (Cheng, 2005).

Os efeitos imunomoduladores dos anestésicos voláteis têm sido estudados há várias décadas (Mcbride, Armstrong e Mcbride, 1996). Embora muitos estudos tenham se concentrado nos efeitos imunossupressores desses agentes, evidências também apontam para a imunoativação (Stollings *et al.*, 2016).

Considerando que a imunossupressão pode aumentar a possibilidade de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos apresentarem infecções no pós-operatório (Dąbrowska e Słotwiński, 2014), é de suma importância que qualquer efeito promovido pelos anestésicos voláteis sobre as células que participam na regulação do sistema imune seja esclarecido.

Atualmente, ainda não existe um consenso a respeito da ação dos diferentes anestésicos halogenados nos mediadores inflamatórios, uma vez que o perfil das citocinas envolvidas nesse processo parece diferir conforme o tipo de cirurgia, ou anestésico empregado (Cheng, 2005; Markovic-Bozic *et al.*, 2016).

1.5 Metaloproteinases da matriz extracelular (MMP)

As MMPs constituem uma família de enzimas proteolíticas zinco dependentes, que se apresentam distribuídas em várias tecidos, incluindo células da musculatura lisa vascular, células endoteliais, fibroblastos e células inflamatórias (Ohbayashi, 2002). Essas enzimas são essenciais para o remodelamento tecidual e estão envolvidas na degradação de vários componentes da matriz extracelular (Bonnans, Chou e Werb, 2014).

Baseado em sua afinidade por determinados substratos degradados por elas, as MMPs podem ser classificadas em collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMPs de membrana (Geurts, Opendakker e Van Den Steen, 2012). Em geral, elas são compostas por uma mesma estrutura, contendo pré e pós-domínios, seguidos de um domínio catalítico e uma porção C terminal. O domínio catalítico é uma região altamente conservada, onde ocorre a ligação de íons de zinco, essencial para a manutenção da atividade enzimática (Nagase, 1997; Spinale, 2007).

Em condições normais, há uma regulação da secreção das MMPs, as quais são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas, chamadas de zimógenos, que

permanecem adormecidas até serem ativadas e tornarem-se proteolíticas (Woessner, 1991). Em tecidos saudáveis, os níveis de MMPs são relativamente baixos, e aumentos excessivos ou desequilibrados dos níveis dessas enzimas podem predispor o organismo a várias doenças como aterosclerose, aneurisma e outras doenças cardiovasculares (Visse e Nagase, 2003). Além disso, o aumento de MMPs pode estar associado a processos inflamatórios (Galis e Khatri, 2002). Dentre essas enzimas proteolíticas, as MMP-2 e MMP-9 são as que apresentam um papel mais importante nas doenças citadas acima (Dollery, Mcewan e Henney, 1995) (Spinale *et al.*, 2000).

A atividade das MMPs pode ser regulada por vários fatores como: estresse oxidativo, citocinas, hormônios, fatores de crescimento e estresse de cisalhamento (Chen *et al.*, 2013). Os RL/EROs, e o resultante estresse oxidativo, podem afetar diretamente e indiretamente a atividade das MMPs. No processo direto, pode haver o envolvimento da oxidação ou nitrosilação das MMPs, resultando em sua ativação (Jian Liu e Rosenberg, 2005). No processo indireto, as EROs atuam sobre elementos redox-sensíveis existentes em fatores de transcrição, como NF κ B ou AP-1, conhecidos por terem sítios de ligação em diversos genes de MMPs (Sen e Packer, 1996; Jian Liu e Rosenberg, 2005). Portanto, situações que suscitam o estresse oxidativo podem fazer com que as MMPs sejam ativadas.

Até o momento, há na literatura ao nosso alcance poucos relatos sobre a atividade das MMPs após exposição aos anestésicos voláteis (Müller-Edenborn *et al.*, 2012).

Justificativa e Objetivos

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Levando-se em consideração a escassez de estudos de reatividade vascular após administração dos anestésicos voláteis, assim como a divergência de dados encontrados na literatura a respeito do impacto do uso desses anestésicos no balanço redox e nos mediadores inflamatórios, o presente estudo teve como objetivo investigar e comparar os efeitos de 150 minutos de anestesia com isoflurano ou sevoflurano na resposta vasoconstritora à fenilefrina (PHE) e vasodilatadora à acetilcolina (ACh), bem como avaliar os determinantes bioquímicos da biodisponibilidade do NO, os níveis de peroxidação lipídica, a capacidade antioxidante, as citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias e a atividade das MMPs.

Por esse motivo, este estudo se propôs a fornecer mais evidências à literatura a respeito das alterações promovidas pelo isoflurano e sevoflurano no organismo, por meio do uso de um modelo experimental animal, utilizando os anestésicos inalatórios, de forma isolada, minimizando as possíveis influências de outros fármacos amplamente utilizados na rotina cirúrgica e que poderiam ser um viés para as análises dos dados.

Materiais e métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O protocolo e os procedimentos empregados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Botucatu (CEUA, IBB-UNESP), com o protocolo número 967/2017.

Foram utilizados 18 ratos Wistar machos adultos (22 semanas \pm 2 semanas) com peso médio de 400-450g, provenientes do Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP), em gaiolas coletivas contendo no máximo cinco animais, em condições controladas de iluminação (fotoperíodo: 12 horas) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e com acesso à ração e água filtrada “*ad libitum*”.

3.2 Preparo dos animais e anestesia

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: não anestesiado (grupo Controle, $n = 6$) e anestesiados com dois anestésicos inalatórios diferentes, isoflurano¹ (grupo Iso, $n = 6$) ou sevoflurano² (grupo Sevo, $n = 6$).

¹ Isoflurano - Isoforine®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

² Sevoflurano - Sevocris®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

A indução da anestesia, nos grupos Iso e Sevo, foi realizada por meio de uma câmara de vidro acoplada ao aparelho de anestesia³ com as concentrações de 3% de isoflurano ou 4% sevoflurano, em um fluxo contínuo de oxigênio (2 L / min). Após confirmação da imobilidade e perda do reflexo de endireitamento, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica, e o plano anestésico ajustado para as concentrações de 2-2,5% e 3-3,5% de isoflurano ou sevoflurano, respectivamente. A manutenção da anestesia foi realizada por meio de uma máscara facial e as concentrações anestésicas registradas por meio de um analisador de gases⁴. Para a obtenção da medida direta da pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (DAP), com também da frequência cardíaca (FC), um cateter de polietileno (PE50) foi introduzido na artéria carótida esquerda. Os dados cardiovasculares foram registrados nos intervalos de 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 min após a indução da anestesia, empregando um sistema de aquisição de dados⁵ conectado a um computador. A temperatura corporal foi medida por um sensor retal, ligado a um monitor multiparamétrico⁶. A fim de evitar hipotermia, uma lâmpada incandescente foi utilizada durante todo o protocolo com o intuito de fornecer calor suplementar aos animais. A adequação do plano anestésico, durante os 150 minutos de experimento, foi realizada com

³ Insight, Ribeirão Preto, Brasil.

⁴ Vamos Plus; Dräger, Lübeck, Alemanha.

⁵ MP150CE; Biopac Systems Inc., Goleta, CA.

⁶ DX monitor 2023; Dixtal Biomedica, São Paulo, Brasil.

base nas respostas hemodinâmicas e ausência de reflexos somáticos motores em resposta ao pinçamento da cauda (Rocha *et al.*, 2015).

Ao chegar ao fim da coleta de dados, os ratos dos grupos anestesiados foram submetidos à eutanásia, ainda sob anestesia, por exsanguinação da artéria carótida, enquanto que os animais do grupo controle foram submetidos à eutanásia por decapitação. As amostras sanguíneas coletadas, em tubos contendo heparina liofilizada⁷, foram centrifugadas e posteriormente o plasma separado foi armazenado a -80 ° C até a realização das análises bioquímicas propostas.

3.3 Isolamento e montagem das preparações de aorta torácica para estudo de reatividade vascular

Imediatamente após a eutanásia dos animais, a aorta torácica descendente foi removida e transferida para uma placa de Petri, recoberta com parafina, contendo solução de Krebs-Henseleit (NaCl 130; KCl 4,7; CaCl₂ 1,6; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 15; glicose 11,1; em mmol / L). A aorta torácica foi então cuidadosamente manipulada para retirada do tecido conectivo e adiposo perivascular e posteriormente seccionada em segmentos de aproximadamente 3-4 mm de comprimento. Anéis de aorta com endotélio intacto e com endotélio removido mecanicamente foram preparados e, em seguida, suspensos verticalmente entre dois ganchos de metal (inseridos no lúmen de cada anel), em cubas de 10 mL para estudos de órgãos isolados. Nesse ambiente, os anéis foram

⁷ Vacuntainer Becton Dickinson, Oxford, Reino Unido.

mantidos imersos em solução nutritiva de Krebs-Henseleit, com pH ajustado para 7.4, continuamente aerada com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e aquecida a 37°C. Um dos ganchos foi ligado a um suporte fixo à base da cuba e o outro a uma haste móvel conectada a um transdutor de tensão isométrica⁸. As variações do diâmetro do vaso foram captadas e registradas pelos transdutores de tensão conectados a um amplificador⁹ e a um sistema de aquisição de dados¹⁰ (Figura 2).

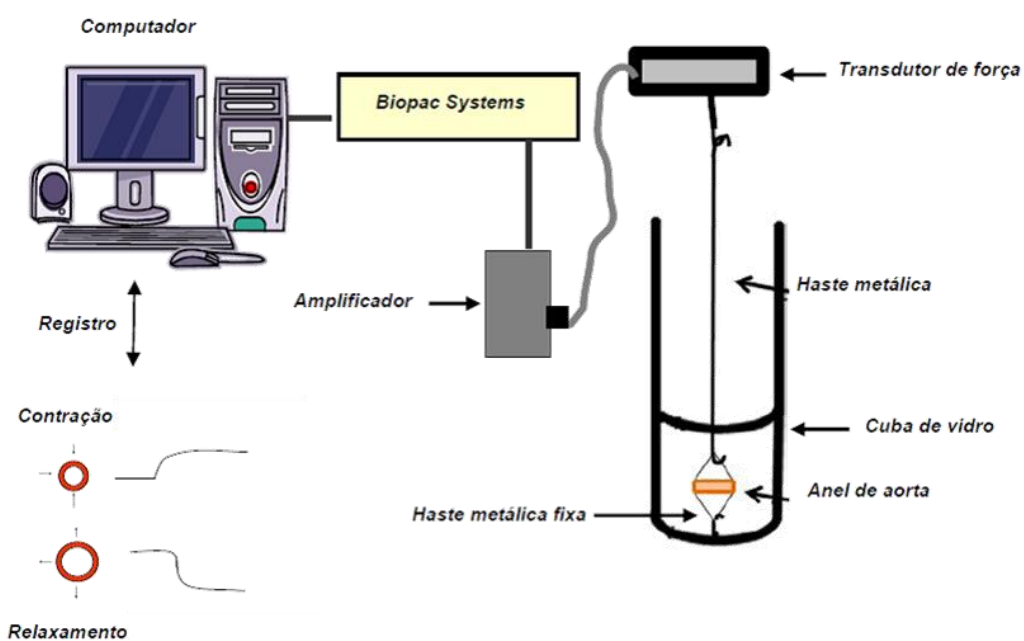


Figura 2. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular (Adaptado de Dias, 2007).

⁸ FORT10, WPI, EUA.

⁹ Transdutor Transbridge 4M, WPI, EUA.

¹⁰ Biopac Systems Inc., U.S.A.

Antes da determinação das curvas concentração-resposta, os anéis foram mantidos em repouso, sob uma tensão basal de 1,5g, por 45 minutos. Durante esse período e durante todo o experimento, a solução nutritiva foi substituída a cada 15 minutos.

A fim de verificar a atividade contrátil induzida por despolarização e, dessa maneira, avaliar a viabilidade do músculo liso vascular, foi realizada, após o período de estabilização, uma contração controle ao cloreto de potássio (KCl) com a concentração de 96 mM. Uma vez atingido um platô no registro da contração induzida pelo KCl, os anéis foram lavados por aproximadamente cinco vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar à tensão basal. Anéis que não foram responsivos ao KCl foram descartados do estudo.

3.3.1 Curvas concentração-resposta

Após a realização do teste de integridade do músculo liso vascular e um novo período de estabilização de 30 minutos, iniciou-se o protocolo experimental.

Os anéis foram primeiramente desafiados com concentrações cumulativas de KCl (10-120 mM) e, posteriormente de PHE (10^{-9} a 10^{-4} M).

A função endotelial foi investigada pelo grau de relaxamento induzido por concentrações crescentes de ACh (10^{-9} a 10^{-4} M) em anéis pré-contraídos com PHE na concentração de 10^{-6} M em anéis com endotélio intacto (E +) e 10^{-7} M em anéis com endotélio desnudo (E-).

A influência da vasodilatação dependente do endotélio também foi verificada por meio da construção de uma curva concentração-resposta à ACh em anéis pré-contraídos com PHE (10^{-6} M em E+ e 10^{-7} M em E-), obtida na presença do éster N-nitro-L-arginina-metilico (L-NAME, 3×10^{-4} M).

3.3.2 Análise de parâmetros farmacológicos

Os valores de pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração que evocou 50% da resposta máxima) foram obtidos a partir da regressão não linear (slope variável), conforme descrito anteriormente (Possomato-Vieira *et al.*, 2018). Os efeitos contrátil/relaxante máximo provocado pelos desafios realizados sobre os anéis, denominado E_{max} , também foram determinados. Esse parâmetro corresponde ao efeito máximo que um agonista pode desencadear em um tecido sob determinadas condições experimentais.

As curvas concentração-resposta à ACh, na presença ou ausência de L-NAME, foram expressas como % de relaxamento frente a contração induzida pela PHE.

3.4 Determinação de nitrito / nitrato (total NOx)

As concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato foram avaliadas por meio da técnica de Griess como previamente descrito (Miranda, Espey e Wink, 2001). Resumidamente, as amostras de plasma foram colocadas em uma placa com 96 poços, com 50 μ L de solução de sulfanilamida a 2% diluída em ácido fosfórico a

5%. Em seguida, foram adicionados 50 µl de solução de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina a 0,1%, seguido de 100 µl de solução saturada de cloreto de vanádio III. A placa foi incubada por três horas a 37°C, sob agitação e protegida da luz. A concentração de NOx foi calculada utilizando uma curva padrão de nitrito de sódio (1,56-100 µM) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro¹¹ a um comprimento de onda de 535 nm. Os níveis de NOx do plasma foram expressos em µmol / L.

3.5 Determinação da peroxidação lipídica

Os níveis plasmáticos de peroxidação lipídica foram determinados pela reação entre o malondialdeído (MDA) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e medido por espectrofotômetro no comprimento de onda de 532 nm (Perico *et al.*, 2015). Para esse ensaio, 100 µL de água destilada, 50 µL de dodecil sulfato de sódio a 8,1% (SDS), 375 µL de ácido acético a 20% e 375 µL de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,8% (TBA) diluído em 20% de ácido acético foram adicionados a 100 µL de amostra. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 95°C por uma hora e posteriormente centrifugada a 15.000 rpm por 10 minutos. A curva padrão foi preparada de maneira semelhante, substituindo as amostras por 25 µl de concentrações conhecidas de MDA. Os resultados de MDA foram expressos em nmol/mL.

¹¹ Synergy 4, BIOTEK, Winooski, VT.

3.6 Determinação da capacidade oxidante total

A capacidade antioxidante total foi determinada pela técnica *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) conforme descrito anteriormente (Benzie e Strain, 1996). Essa técnica se baseia na rápida redução da triazina trifluídrica férrica (FeIII-TPTZ) pelos antioxidantes presentes na amostra formando triazina de ferro-tripiridila (FeII-TPTZa), substância de intensa coloração azul. Em primeiro lugar, a solução de FRAP foi preparada usando 300 mmol / L de tampão acetato, 10 mmol / L de solução TPTZ / HCL e 20 mmol / L de cloreto férrico. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 10 µL de amostras de plasma com 290 µL de solução de FRAP. Soluções padrão de sulfato de ferro (II) variando na concentração de 0,0625 a 4 mmol foram feitas e a placa foi incubada por 4 minutos. A absorbância foi lida a 593 nm.

3.7 Determinação de citocinas em amostras de aorta

Para determinação da IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 presentes na aorta foram utilizados kits comerciais de ensaio imunoenzimático¹². Em resumo, placas de 96 poços foram cobertas com 50 µL/poço dos anticorpos específicos para cada citocina. Os anticorpos foram diluídos em solução de ligação (*binding buffer*) com pH 9,0 e incubados por 18-24 horas, a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 50µL de PBS/BSA 1% durante 2 horas em temperatura

¹² Pharmigen, San Diego, CA, EUA).

ambiente. Posteriormente as amostras e o padrão (curva padrão) foram adicionadas às placas (50 µL) e incubadas por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50µL dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados. Após 1 hora, as placas foram novamente lavadas com PSB/Tween e o conjugado avidina-peroxidase (diluição de 1:5000) adicionado a cada poço. Tendo decorrido 30 minutos de incubação, uma nova lavagem foi realizada com PBS/Tween e 100µL do substrato OPD (o-fenilenediaminadihidrocloro). As placas então foram incubadas por mais 15 a 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ (1M) e a densidade óptica foi medida a 490 nm por meio de espectrofotômetro¹³. Os limites de detecção dos Kits foram de 10-20 pg. Os resultados foram expressos em picogramas / µg de proteína (pg / µg de proteína).

3.8 Atividades das MMPs em amostras de plasma e aorta

A técnica de zimografia foi usada para determinar a atividade das MMP-2 e MMP-9 no plasma e na aorta (Rizzi *et al.*, 2013). Resumidamente, amostras aórticas congeladas foram homogeneizadas em tampão RIPA (Sigma Aldrich) contendo inibidores de protease (Sigmafast™, Sigma Aldrich) e centrifugada a 10.000 rpm durante 15 min. As concentrações de proteínas da aorta foram medidas utilizando o ensaio de Bradford (Sigma Aldrich). As amostras de proteína

¹³ Spectra Max-250, Molecular Devices.

da aorta (20 µg) ou do plasma (1 µL) foram diluídas 1: 1 com tampão de amostra (concentração final: 2% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol). Posteriormente foram submetidas à electroforese em gel de poliacrilamida a 12% SDS copolimerizado com gelatina (0,05%) como substrato. Após a eletroforese ter sido completada, o gel foi lavado e incubado a 37 °C por 18 horas em tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 10 mmol / L de CaCl₂. Os géis foram corados com 0,05% de Coomassie Brilliant Blue G-250 e depois corados com 30% de metanol e 10% de ácido acético. As atividades gelatinolíticas foram detectadas como bandas não coradas contra o fundo de gelatina corada com azul de Coomassie. A atividade enzimática foi avaliada por densitometria e medida como intensidade de pixel x mm² utilizando o software ImageJ. A densidade de atividade da protease integrada foi normalizada para a intensidade do soro bovino fetal, utilizada como padrão, para permitir a análise e comparação integrais. As isoformas de MMP-2 foram identificadas como bandas 75, 72 e 64 kDa e as de MMP-9 como banda 92 KDa. A MMP-2 total foi tomada como a soma das diferentes isoformas. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando um software estatístico comercial (Graph Pad Prism 6.0)¹⁴. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo que todos os dados apresentaram distribuição

¹⁴ GraphPad Prism 6.0 para Windows, San Diego, CA.

normal. Os resultados hemodinâmicos e de temperatura foram comparados entre os grupos por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo teste Bonferroni, e as diferenças entre os momentos dentro de um mesmo grupo foram avaliadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Dunnet. As curvas concentração-resposta foram construídas para os experimentos de reatividade vascular e o método dos mínimos quadrados foi utilizado para ajustar as curvas em forma sigmoide. As comparações dos dados bioquímicos, valores de E_{max} e pEC_{50} foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelos teste de Tukey ou Bonferroni. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

RESULTADOS

4.1 Efeitos do isoflurano e sevoflurano sobre a temperatura e parâmetros hemodinâmicos

Os grupos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano não apresentaram diferenças significativas nos dados de temperatura retal e parâmetros hemodinâmicos entre os grupos anestesiados ($P > 0.05$; Tabela 1). A administração do sevoflurano reduziu significativamente os valores de PAS, PAM e PAD em alguns momentos ao longo do tempo em comparação com o momento T₃₀ ($P < 0,05$; Tabela 1). No grupo Iso, houve redução nos valores de FC apenas no momento T₁₅₀ quando comparado ao T₃₀, ($P = 0,04$; Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis hemodinâmicas e temperatura de ratos anestesiados com 2- 2,5% de isoflurano (grupo Iso) ou 3-3,5% de sevoflurano (grupo Sevo). Os dados foram registrados em 30 (T_{30}), 45 (T_{45}), 60 (T_{60}), 75 (T_{75}), 90 (T_{90}), 105 (T_{105}), 120 (T_{120}), 135 (T_{135}) e 150 min (T_{150}) após o início da anestesia. Os dados estão apresentados como média \pm S.E.M. FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média.

Variáveis	Grupos	Momentos								
		T_{30}	T_{45}	T_{60}	T_{75}	T_{90}	T_{105}	T_{120}	T_{135}	T_{150}
FC (bat./min)	Iso	374 \pm 15	366 \pm 7.6	361 \pm 5.8	357 \pm 6.2	360 \pm 8.0	358 \pm 7.9	343 \pm 14	341 \pm 11	340 \pm 6.9*
	Sevo	337 \pm 13	362 \pm 4.0	362 \pm 5.1	340 \pm 13	341 \pm 11	336 \pm 7.7	340 \pm 12	336 \pm 13	336 \pm 14
Temperatura (°C)	Iso	34.7 \pm 0.5	35.7 \pm 0.5*	36.4 \pm 0.4*	37.1 \pm 0.3*	37.1 \pm 0.1*	37.1 \pm 0.1*	37.0 \pm 0.1*	37.0 \pm 0.1*	36.8 \pm 0.1*
	Sevo	35.3 \pm 0.5	36.3 \pm 0.6*	36.9 \pm 0.1*	37.0 \pm 0.2*	37.0 \pm 0.2*	36.9 \pm 0.2*	36.9 \pm 0.2*	36.8 \pm 0.2*	37.0 \pm 0.2*
PAS (mmHg)	Iso	127 \pm 5.5	119 \pm 9.1	118 \pm 6.4	119 \pm 8.2	117 \pm 7.6	117 \pm 6.9	113 \pm 7.7	112 \pm 7.9	113 \pm 7.2
	Sevo	135 \pm 8.8	128 \pm 5.3	129 \pm 6.3	119 \pm 5.0*	119 \pm 6.5*	119 \pm 6.7*	123 \pm 9.7	117 \pm 8.1*	114 \pm 6.6*
DAP (mmHg)	Iso	100 \pm 4.0	90 \pm 9.7	90 \pm 6.2	92 \pm 6.6	90 \pm 7.0	88 \pm 6.1	84 \pm 8.2	85 \pm 7.4	87 \pm 7.5
	Sevo	107 \pm 7.5	109 \pm 5.9	107 \pm 6.4	95 \pm 5.1	100 \pm 8.3	94 \pm 9.4	101 \pm 9.1	91 \pm 7.4*	98 \pm 5.2*
MAP (mmHg)	Iso	114 \pm 5.4	104 \pm 9.2	104 \pm 5.8	103 \pm 7.3	104 \pm 7.1	104 \pm 6.8	98 \pm 7.5	100 \pm 7.3	101 \pm 6.5
	Sevo	123 \pm 6.9	122 \pm 5.6	119 \pm 6.5	109 \pm 5.2	110 \pm 7.7	107 \pm 8.6	113 \pm 9.2	104 \pm 8.0*	99 \pm 6.2*

* P < 0,05 entre momentos dentro de um mesmo grupo;

4.2 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na reatividade vascular em aorta torácica com endotélio intacto e desnudo

A contração máxima induzida por KCl em anéis E+ e E- foi significativamente reduzida no grupo Sevo quando comparada ao grupo Iso ($P = 0,03$ e $P = 0,04$, em E + e E-, respectivamente), mas não quando comparada ao grupo controle (Fig. 3A e B e Tabela 2). Da mesma forma, diferenças significativas foram obtidas nas curvas concentração-resposta ao KCl no grupo Sevo em relação ao grupo Iso nos anéis E+ ($P = 0,04$; Figura 3 C e Tabela 2). Entretanto, nos anéis E-, o KCl causou uma contração, dependente da concentração, que foi maior no grupo Iso quando comparado ao grupo Controle ($P = 0,02$; Figura 3 D e Tabela 2).

Enquanto os valores de pEC_{50} , na contração induzida pela PHE, não mostraram diferenças entre os grupos ($P = 0,05$; Tabela 2), a E_{max} foi significativamente reduzida no grupo Sevo quando comparada aos grupos Iso ($P = 0,01$) e Controle ($P = 0,004$; Figura 3 E e Tabela 2). Por outro lado, a remoção do endotélio causou um aumento da E_{max} no grupo Iso em comparação com os grupos Sevo ($P = 0,0002$) e Controle ($P = 0,005$) e a uma diminuição dos valores de pEC_{50} no grupo Sevo comparado ao grupos Iso ($P = 0,03$) e controle ($P = 0,04$; Fig 3 F e Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significativas no relaxamento induzido pela ACh entre os grupos ($P > 0,05$; Fig. 4 A e B e Tabela 2). Como já esperado, a

inibição da NOS pelo L-NAME aboliu o relaxamento induzido pela ACh em todos os grupos estudados (Fig. 4 C e D e Tabela 2).

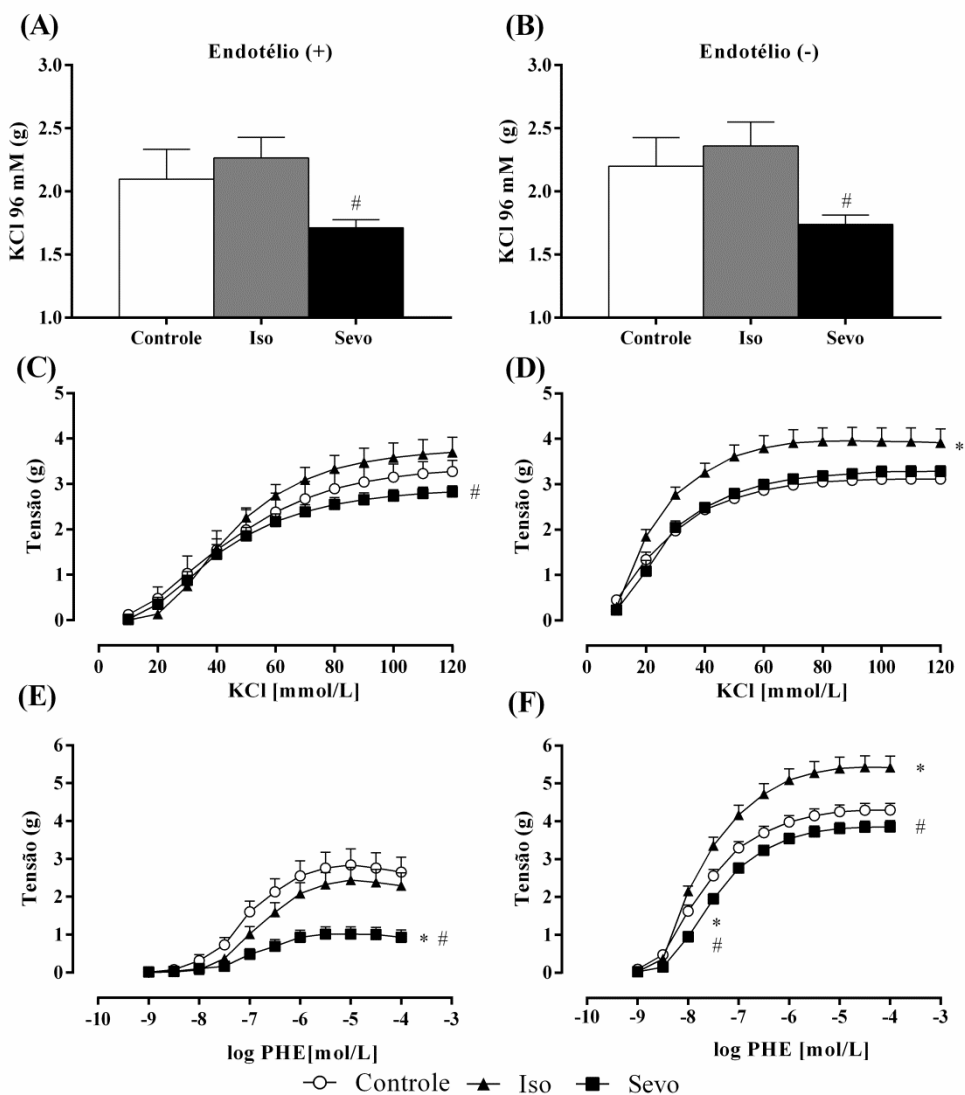


Figura 3. Representação da contração induzida por KC a 96 mM e das curvas concentração-resposta para KCl e PHE determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com endotélio intacto (+) e desnudo (-), obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo. * $P < 0,05$ versus grupo controle e # $P < 0,05$ versus grupo Iso.

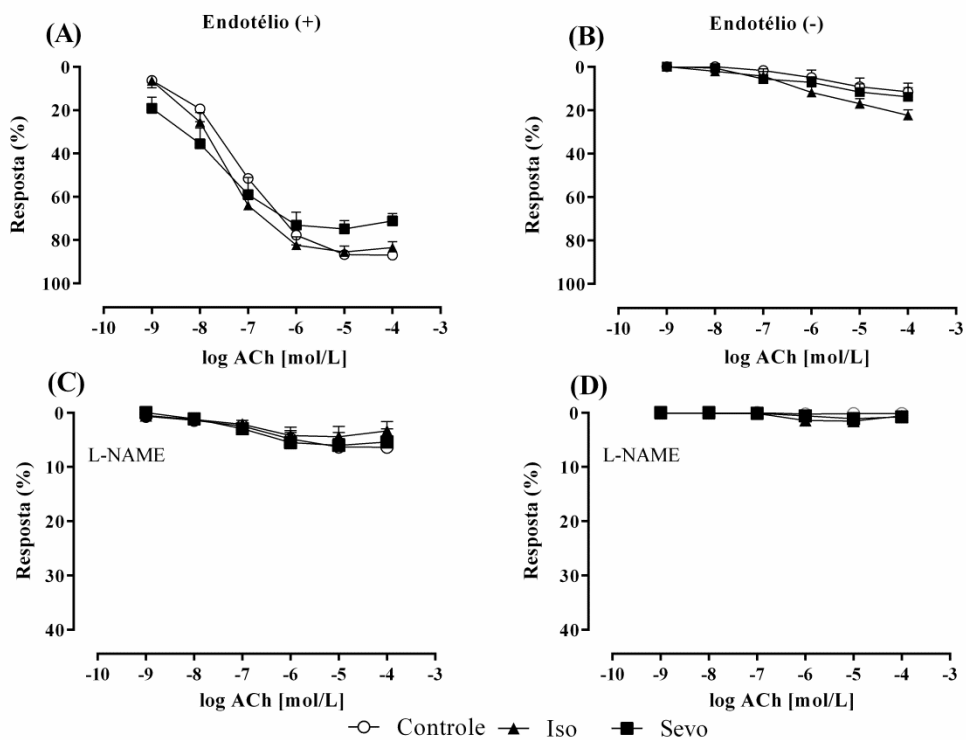


Figura 4. Representação gráfica das curvas concentração-resposta (relaxamento expresso como % da pré-contracção induzida por fenilefrina) para ACh na ausência e presença do L-NAME determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com endotélio intacto (+) e desnudo (-), obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo. * $P < 0,05$ versus grupo controle e # $P < 0,05$ versus grupo Iso.

Tabela 2. Valores de E_{max} e pEC_{50} para KCl, PHE e ACh na ausência ou na presença de L-NAME, obtidos de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo.

	Controle		Iso		Sevo	
	E+	E-	E+	E-	E+	E-
KCl 96 mM E_{max} (g)	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.1 [#]	1.7 ± 0.1 [#]
KCl Curva E_{max} (g)	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.7 ± 0.3	4.0 ± 0.3*	2.8 ± 0.1 [#]	3.3 ± 0.1
PHE E_{max} (g)	2.8 ± 0.4	4.3 ± 0.2	2.44 ± 0.3	5.4 ± 0.3*	1.1 ± 0.2* [#]	3.8 ± 0.2 [#]
PHE pEC_{50} (-log M)	7.1 ± 0.1	7.9 ± 0.1	6.8 ± 0.1	7.9 ± 0.1	6.8 ± 0.2	7.6 ± 0.1* [#]
ACh E_{max} (%)	87.6 ± 1.9	11.6 ± 4.0	86.7 ± 2.7	22.8 ± 2.7	83.8 ± 2.7	13.8 ± 4.1
ACh pEC_{50} (-log M)	7.2 ± 0.2	5.8 ± 0.4	7.5 ± 0.1	6.1 ± 0.4	7.5 ± 0.2	6.3 ± 0.3
ACh + L-Name E_{max} (%)	16 ± 4.0	0.7 ± 0.5	12 ± 4.5	5.0 ± 2.1	16 ± 6.0	2.6 ± 1.0

Dados apresentados como média ± erro padrão da média. * P <0,05 versus grupo controle e [#] P <0,05 versus grupo Iso.

4.3 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na produção de óxido nítrico, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total

Enquanto o sevoflurano reduziu significativamente os níveis plasmáticos de NO quando comparados aos níveis presentes do grupo Controle ($P = 0,01$), o isoflurano não apresentou nenhum efeito significativo nesse parâmetro (Fig. 5).

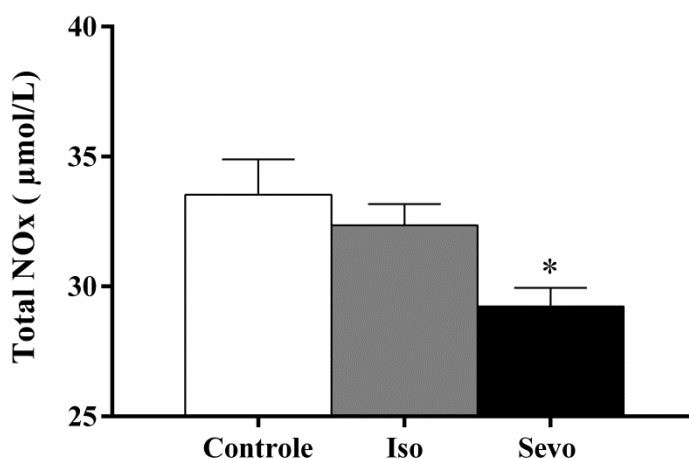


Figura 5. Representação dos valores plasmáticos de Total NOx, obtidos de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ versus grupo controle e # $P < 0,05$ versus grupo Iso.

Os níveis plasmáticos de MDA foram maiores nos grupos Sevo e Iso em quando comparados aos níveis presentes no grupo Controle ($P = 0,0001$ e $P < 0,0001$, respectivamente; Fig. 6A). Além disso, os grupos Sevo e Iso apresentaram menor capacidade antioxidante quando comparados ao grupo Controle ($P = 0,003$ e $P = 0,0009$, respectivamente; Fig. 6B).

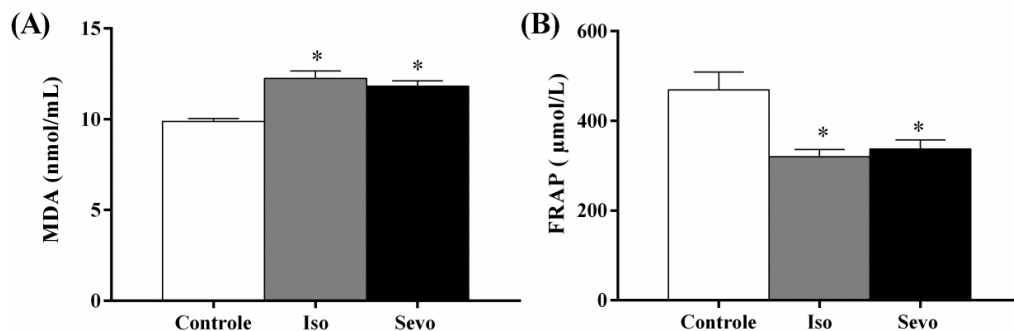


Figura 6. Representação dos valores plasmáticos (média \pm erro padrão da média) de MDA (A) e FRAP (B), obtidos de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo. * P < 0,05 versus grupo controle e # P < 0,05 versus grupo Iso.

4.4 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na liberação de citocinas em aorta

Os níveis de IL-6 em todos os grupos estiveram abaixo dos limites de detecção (dados não mostrados). Não houve diferenças significativas do nível de TNF- α no grupo Iso quando comparado ao grupo controle (Fig. 7A). O grupo Sevo apresentou valores reduzidos de IL-1 β na aorta em comparação aos valores presentes nos grupos Iso e Controle (P = 0,003 e P = 0,0001, respectivamente; Fig. 7B). Por outro lado, o grupo Iso apresentou valores de IL-1 β significativamente maiores em comparação aos valores do grupo Controle (P = 0,001; Fig 7B). A IL-10 foi menor no grupo Sevo quando comparada aos demais grupos (P = 0,001 e P = 0,01, Iso e Controle, respectivamente; Fig.7C).

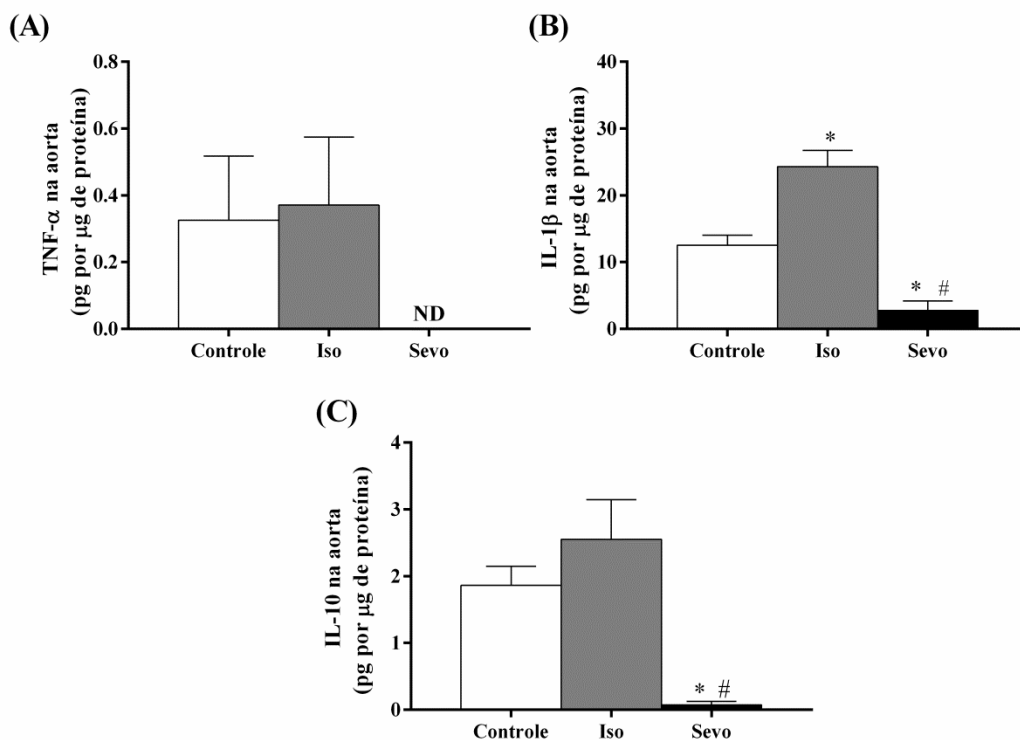


Figura 7. Representação dos valores (média \pm erro padrão da média) de citocinas TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) na aorta, obtidos de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo. * P < 0,05 versus grupo controle e # P < 0,05 versus grupo Iso.

4.5 Efeitos do isoflurano e sevoflurano na atividade de MMP-9 e MMP-2 em plasma e aorta

O zimograma representativo do plasma é mostrado na Figura 8, que mostra as bandas correspondentes de MMP-9 e MMP-2. As atividades totais de MMP-9 e MMP-2 nos grupos Sevo e Iso não diferiram do grupo Controle (P > 0,05, Fig. 8A e B).

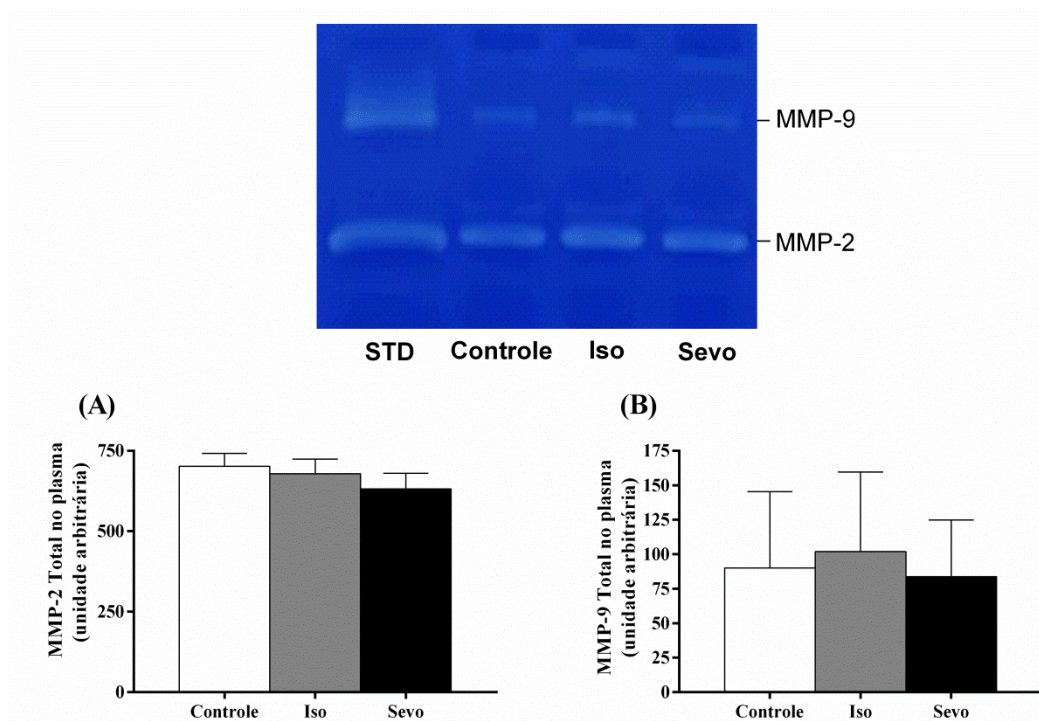


Figura 8 Representação do gel de zimograma e dos valores (média \pm erro padrão da média) de densitometria das MMP-2 (A) e MMP-9 (B) no plasma, obtidos de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo. * $P < 0,05$ versus grupo controle e # $P < 0,05$ versus grupo Iso.

O zimograma representativo do homogeneizado da aorta está mostrado na Figura 9. Nenhuma banda correspondente a 92 KDa pro-MMP-9 apareceu no gel, por esse motivo, o zimograma mostra três isoformas de MMP-2: 75, 72 e 64 kDa. A atividade de MMP-2 aumentou significativamente no grupo Sevo nas isoformas 75 ($P = 0,03$), 72 ($P = 0,02$) e 64 ($P = 0,01$) KDa e na total ($P = 0,02$) quando comparada ao grupo Controle (Fig. 9A-D).

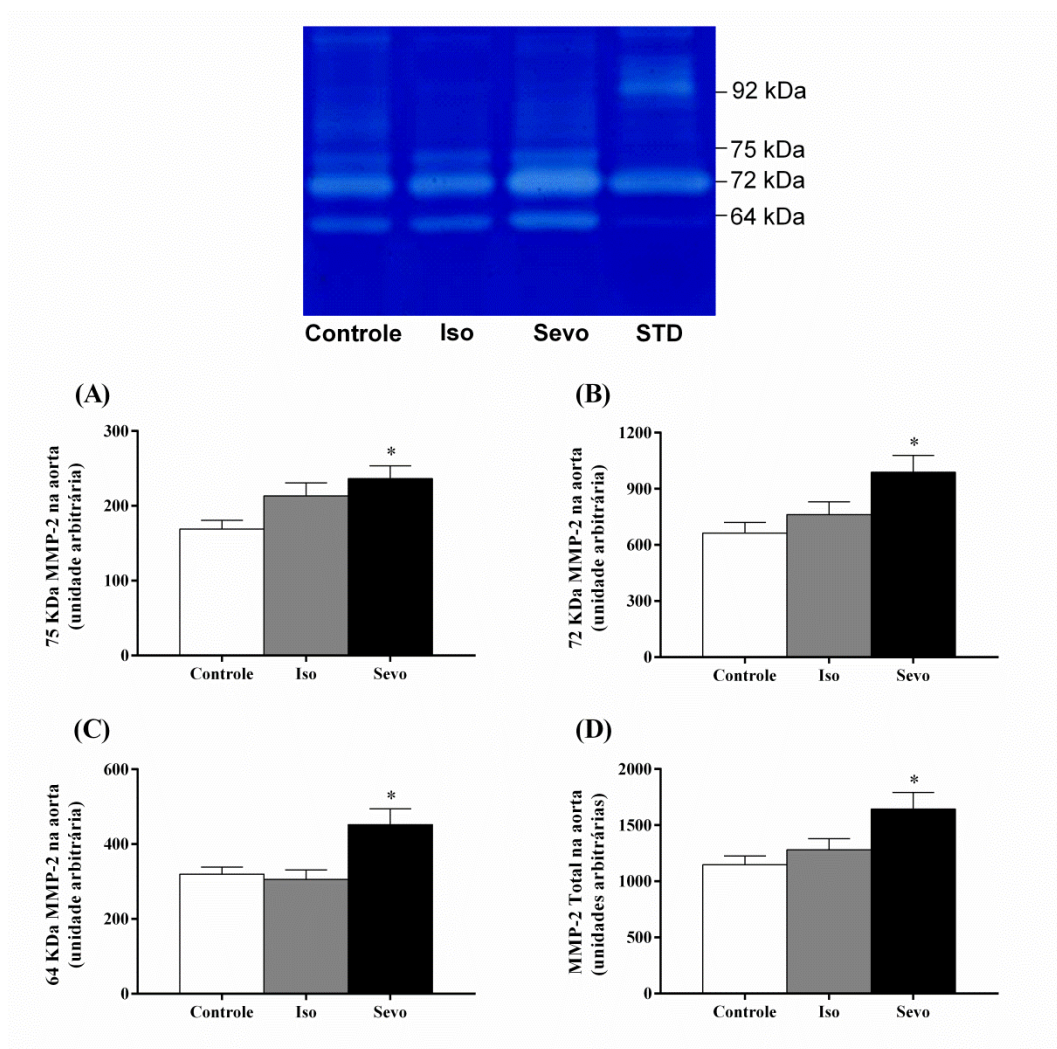


Figura 9. Representação do gel de zimograma e dos valores (média \pm erro padrão da média) de densitometria das MMP-2: 75 (A), 72 (B) e 64 (C) kDa e total (D) na aorta, obtidos de animais pertencentes aos grupos Controle, Iso e Sevo. * $P < 0,05$ versus grupo controle e # $P < 0,05$ versus grupo Iso.

Discussão

DISCUSSÃO

A preocupação relacionada com ação farmacológica dos anestésicos voláteis e seus possíveis efeitos colaterais no organismo existe desde a sua introdução na prática clínica (Eger, 1994). De fato, inúmeros estudos tem demonstrado que os agentes halogenados podem promover importantes alterações na vasculatura, no estresse oxidativo e nos mediadores inflamatórios (Nakamura *et al.*, 1994; Lee, Y.-M., Song, B. C. e Yeum, K.-J., 2015). A esse respeito, o presente estudo propôs-se a contribuir para a construção do conhecimento acerca das repercussões da exposição aos anestésicos halogenados isoflurano e sevoflurano.

A utilização de um modelo experimental animal nos permitiu isolar o papel dos anestésicos voláteis, eliminando a interferência de outros fármacos nas análises de dados propostas, o que contribuiu para uma melhor compreensão dos efeitos sistêmicos desses agentes. Além disso, a manutenção da estabilidade hemodinâmica observada durante todo o protocolo anestésico foi de fundamental importância para a confiabilidade dos dados, visto que alterações nesses parâmetros poderiam influenciar os resultados aqui apresentados.

.Em nosso estudo houve uma redução da magnitude da resposta vasoconstritora induzida pela PHE na aorta torácica de ratos anestesiados com sevoflurano. O fato desse anestésico não ter prejudicado a contração promovida pelo KCL, quando comparado ao grupo Controle, sugere que sua ação não esteja relacionada a alterações no influxo de cálcio (Karakı, Urakawa e Kutsky, 1984).

Apesar do mecanismo pelo qual o sevoflurano reduz a vasoconstrição induzida pela PHE não esteja totalmente esclarecido em nosso estudo, é possível

que um efeito anti-contrátil do H_2O_2 possa estar envolvido na resposta vascular promovida pela PHE. Relato prévio sugeriu que o H_2O_2 parece ser a principal EROs liberada durante a anestesia com sevoflurano (Wong *et al.*, 2006). Além disso, nossos achados fornecem fortes evidências de que a perda de tensão contrátil poderia ser realmente causada pelo H_2O_2 , uma vez que foram observados aumentos significativos do estresse oxidativo nos ratos do grupo Sevo. Adicionalmente, o H_2O_2 tem se mostrado capaz de desempenhar função tanto vasodilatadora como vasoconstritora que dependerão do leito vascular, da presença do endotélio ou das condições experimentais (Lucchesi, Belmadani e Matrougui, 2005; Bretón-Romero e Lamas, 2014) Estudos prévios mostraram que o aumento do H_2O_2 nas células endoteliais contribui para diminuir a resposta contrátil induzida pela PHE na aorta torácica de ratos com hipertensão renal (Silva *et al.*, 2013).

Nossos achados sugerem ainda que uma possível disfunção dos α_1 adrenoreceptores também pode estar relacionada aos efeitos causados pelo sevoflurano na resposta contrátil a PHE, uma vez que foi observada uma redução significativa da E_{max} nos anéis de aorta com endotélio intacto. Ademais, apesar de não haver nenhuma diferença estatística nesse mesmo parâmetro nos anéis com endotélio desnudo, após a anestesia com sevoflurano, foram observados decréscimos nos valores de pEC_{50} quando comparados aos valores do grupo Controle, o que enfatiza uma provável disfunção dos α_1 adrenoreceptores.

Levando-se em consideração que na prática anestésica atual, vários tipos de agentes vasoativos são frequentemente usados, para controlar o tônus vascular e manter o fluxo sanguíneo adequado nos tecidos, em pacientes de alto risco e / ou

instabilidade hemodinâmica, esses resultados são de grande relevância para os anesthesiologistas, pois apresentam evidências consistentes da interferência do anestésico na responsividade vascular e possível influência na eficácia terapêutica das drogas vasoativas.

Em nossas mãos, a anestesia com isoflurano não afetou a vasoconstrição induzida pela PHE e pelo KCl, quando comparada a vasoconstrição induzida no grupo controle, nos anéis com endotélio intacto. No entanto, nos anéis com o endotélio desnudo, esse anestésico aumentou a resposta vasocontrátil tanto da PHE como do KCl. Esse efeito pode ter sido causado por aumento do influxo de cálcio por meio de canais de cálcio operados por receptores, como sugerido anteriormente por Hirata et al., 1998 (Hirata *et al.*, 1998). Além disso, é provável que o influxo de cálcio por meio de canais de cálcio dependentes de voltagem também esteja envolvido na resposta hiperreativa causada pelo isoflurano (Ratz *et al.*, 2005).

Enquanto estudos prévios observaram prejuízo na vasodilatação induzida por ACh com o isoflurano e o sevoflurano (Yoshida e Okabe, 1992; Nakamura *et al.*, 1994; Blaise *et al.*, 1997; Kazuma *et al.*, 2018), em nosso estudo não foi observado esse efeito. A discordância entre os nossos achados e os relatos anteriores pode estar relacionada às diferentes metodologias empregadas. No nosso caso os anestésicos foram administrados pela via convencional, ou seja, a inalatória, enquanto que nos demais estudos os anestésicos foram vaporizados diretamente no banho de órgãos (Nakamura *et al.*, 1994; Yamaguchi e Okabe, 1995; Kazuma *et al.*, 2018). Em nosso conhecimento, a influência do sevoflurano na reatividade vascular em anéis da aorta torácica isolada não foi explorada dessa maneira até o momento.

Embora o relaxamento induzido pela ACh não tenha sido significativamente afetado pelo sevoflurano, reduções plasmáticas nos níveis de NO foram encontradas no grupo Sevo. Essa diminuição do NO circulante reflete uma repercussão sistêmica que não necessariamente resulta em uma alteração funcional da responsividade da aorta torácica. Entretanto, existe a possibilidade de que o efeito relaxante do H₂O₂ possa estar envolvido, uma vez que foi sugerido por estudos prévios que sua ação anti-contrátil no endotélio pode ocorrer como uma resposta compensatória da diminuição na biodisponibilidade de NO (Cai, 2005).

Apesar de uma série de estudos terem indicado que os anestésicos inalatórios podem gerar estresse oxidativo, os resultados ainda são contraditórios (Bezerra *et al.*, 2010; Erbas *et al.*, 2015; Lee, Y. M., Song, B. C. e Yeum, K. J., 2015; Ni *et al.*, 2017). Neste estudo, nós demonstramos que o sevoflurano e o isoflurano, em concentrações clínicas, induzem estresse oxidativo. Esta afirmação se baseia nos aumentos dos níveis de peroxidação lipídica associados à diminuição da capacidade antioxidante observada nos dois grupos anestesiados. Resultados semelhantes foram descritos na literatura. Sato et al. 1994 relataram que sevoflurano tem o potencial de causar peroxidação lipídica *in vivo* e *in vitro* (Sato, Fujii e Yuge, 1994). Adicionalmente, níveis significativamente maiores de peroxidação lipídica foram encontrados no plasma, medula óssea, baço, e fígado de ratos expostos ao isoflurano (Kim *et al.*, 2006).

Em contrapartida, existem estudos mostrando que o sevoflurano não induz estresse oxidativo, bem como não altera o sistema antioxidante de ratos. (Allaouchiche *et al.*, 2001; Lee, Y. M., Song, B. C. e Yeum, K. J., 2015). Além

disso, foram observados aumentos da capacidade antioxidante sistêmica após anestesia com isoflurano em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (Rocha *et al.*, 2015). Essa divergência de dados em relação ao estresse oxidativo e ao perfil antioxidante entre os estudos podem ser explicados por diferenças no tempo de exposição, concentração anestésica utilizada, idade dos animais e, principalmente, metodologias empregadas.

Tem sido relatado que as EROs e o resultante estresse oxidativo podem afetar direta e indiretamente a atividade das MMPs (Jian Liu e Rosenberg, 2005). Nossa hipótese era de que, com base nos resultados encontrados por nós nos níveis de estresse oxidativo, o isoflurano e o sevoflurano poderiam aumentar a atividade das MMPs. Essa hipótese foi parcialmente confirmada no presente estudo, uma vez que foram observadas diferenças significativas nas atividades da MMP-2 na aorta do grupo Sevo. Nós sugerimos que esses resultados possam estar relacionados, novamente, a ação do H_2O_2 no leito vascular, visto que já foi descrito que ele desempenha um papel relevante na mediação do remodelamento vascular por meio do aumento da expressão da MMP-2 no endotélio (Belkhiri *et al.*, 1997).

Além dos mecanismos propostos acima, nós observamos que os ratos anestesiados com sevoflurano apresentaram redução na biodisponibilidade de NO e aumento na atividade da MMP-2. Estes achados corroboram estudos anteriores sugerindo que o NO pode regular negativamente as MMPs (Eberhardt *et al.*, 2000; Demacq *et al.*, 2008; Metzger, Sandrim e Tanus-Santos, 2012; Meschiari *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2018).

Sabe-se que o trauma cirúrgico e a anestesia afetam muitas funções do sistema imunológico (Kurosawa, S. e Kato, M., 2008). Relatou-se que os anestésicos voláteis apresentam efeitos imunossupressores em várias células imunológicas (Stollings *et al.*, 2016). Em nosso estudo a anestesia com sevoflurano levou a significativa redução dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , e anti-inflamatória, IL-10. Esses resultados estão em conformidade com outros achados *in vitro* relacionados ao sevoflurano (Mitsuhata, Shimizu e Yokoyama, 1995). Por outro lado, os aumentos encontrados por nós nos níveis de IL-1 β nos animais anestesiados com isoflurano não estão de acordo com relato anterior, em que esse anestésico reduziu a liberação dessas citocinas pró-inflamatória (Cheng, 2005).

Conclusão

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que a anestesia com sevoflurano, mas não com isoflurano, atenua a contração mediada por agonista α_1 adrenoceptor em anéis de aorta torácica de ratos. Além disso, apesar de o sevoflurano e o isoflurano terem o potencial de aumentar o estresse oxidativo, apenas o sevoflurano reduz significativamente a liberação de NO e citocinas e aumenta a atividade da MMP-2.

Referências

REFERÊNCIAS

AKATA, M. D. P. D. T. General Anesthetics and Vascular Smooth Muscle Direct Actions of General Anesthetics on Cellular Mechanisms Regulating Vascular Tone. **Anesthesiology**, v. 106, n. 2, p. 365-391, 2007.

AKATA, M. D. P. D. T.; IZUMI, M. D. K.; NAKASHIMA, M. D. P. D. M. The Action of Sevoflurane on Vascular Smooth Muscle of Isolated Mesenteric Resistance Arteries (Part 2) Mechanisms of Endothelium-independent Vasorelaxation. **Anesthesiology**, v. 92, n. 5, p. 1441-1453, 2000.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.

ALLAOUCHICHE, B. et al. Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. **Anesth Analg**, v. 93, n. 4, p. 981-5, Oct 2001.

ALLEVA, R. et al. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. **Mutagenesis**, v. 18, n. 5, p. 423-8, Sep 2003.

BELKHIRI, A. et al. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure. **Lab Invest**, v. 77, n. 5, p. 533-9, Nov 1997.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996/07/15/ 1996.

BEZERRA, F. J. et al. Evaluation of antioxidant parameters in rats treated with sevoflurane. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 60, n. 2, p. 162-9, 93-7, Mar-Apr 2010.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BLAISE, G. et al. Do enflurane and isoflurane interfere with the release, action, or stability of endothelium-derived relaxing factors? **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 44, n. 5, p. 550-558, May 01 1997.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 786-801, 2014.

BRETÓN-ROMERO, R.; LAMAS, S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. **Redox biology**, v. 2, p. 529-534, 2014.

BROZOVIC, G. et al. Evaluation of DNA damage in vivo induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. **Eur J Anaesthesiol**, v. 25, n. 8, p. 642-7, Aug 2008.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 1, p. 26-36, 2005.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, n. 10, p. 840-4, Nov 10 2000.

CAMPAGNA, J. A.; MILLER, K. W.; FORMAN, S. A. Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 21, p. 2110-2124, 2003.

CAPEY, S. Inhalation Anesthetics. In: ENNA, S. J. e BYLUND, D. B. (Ed.). **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. New York: Elsevier, p.1-4, 2007.

CHANG, C. Y. et al. Ether in the developing world: rethinking an abandoned agent. **BMC anesthesiology**, v. 15, p. 149-149, 2015.

CHEN, Q. et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 928315-928315, 2013.

CHENG, C.-R. Inflammatory Response to Anesthesia and Ways to Attenuate It. **Advances in Anesthesia**, v. 23, p. 107-141, 2005.

DĄBROWSKA, A. M.; SŁOTWIŃSKI, R. The immune response to surgery and infection. **Central-European journal of immunology**, v. 39, n. 4, p. 532-537, 2014.

DEMACQ, C. et al. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. **Clin Chim Acta**, v. 394, n. 1-2, p. 72-6, Aug 2008.

DOLLERY, C. M.; MCEWAN, J. R.; HENNEY, A. M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 77, n. 5, p. 863-8, Nov 1995.

EBERHARDT, W. et al. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. **Kidney Int**, v. 57, n. 1, p. 59-69, Jan 2000.

ECKENHOFF, M. D. RODERIC G. et al. Inhaled Anesthetic Enhancement of Amyloid- β Oligomerization and Cytotoxicity. **Anesthesiology**, v. 101, n. 3, p. 703-709, 2004.

EGER EI. Characteristics of anesthetic agents used for induction and maintenance of general anesthesia. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 61, n. suppl 4, p. S3-S10, 2004.

EGER, M. D. EDMOND I. New Inhaled Anesthetics. **Anesthesiology**, v. 80, n. 4, p. 906-922, 1994.

EMING, S. A.; WYNN, T. A.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, v. 356, n. 6342, p. 1026-1030, 2017.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial Dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 8, p. 1983-1992, 2004.

ERBAS, M. et al. [Comparison of effects on the oxidant/antioxidant system of sevoflurane, desflurane and propofol infusion during general anesthesia]. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 65, n. 1, p. 68-72, Jan-Feb 2015.

FORRESTER, S. J. et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. **Circ Res**, v. 122, n. 6, p. 877-902, Mar 16 2018.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837d, 2012.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373, 11/27/online 1980.

GALIS, Z. S.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ Res**, v. 90, n. 3, p. 251-62, Feb 22 2002.

GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacol Ther**, v. 133, n. 3, p. 257-79, Mar 2012.

HIRATA, S. et al. Effects of isoflurane on receptor-operated Ca²⁺ channels in rat aortic smooth muscle. **Br J Anaesth**, v. 81, n. 4, p. 578-83, Oct 1998.

INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1-19, 2018/01/01/ 2018.

JALOSZYNSKI, P. et al. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. **Mutat Res**, v. 439, n. 2, p. 199-206, Feb 19 1999.

JIAN LIU, K.; ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 1, p. 71-80, Jul 1 2005.

JIN, Y. et al. Effects of sevoflurane and propofol on the inflammatory response and pulmonary function of perioperative patients with one-lung ventilation. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 6, n. 3, p. 781-785, 2013. ISSN 1792-0981
1792-1015.

KARABıYıK, L. et al. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 492, n. 1, p. 99-107, 2001/05/31/ 2001.

KARAKI, H.; URAKAWA, N.; KUTSKY, P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. **Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi**, v. 20, n. 6, p. 427-44, Dec 1984.

KAZUMA, S. et al. Desflurane inhibits endothelium-dependent vasodilation more than sevoflurane with inhibition of endothelial nitric oxide synthase by different mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 217-222, 2018/01/01/ 2018.

KHARASCH, E. D. Biotransformation of sevoflurane. **Anesth Analg**, v. 81, n. 6 Suppl, p. S27-38, Dec 1995.

KHAZAEI, M.; MOIEN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. **Pathophysiology**, v. 15, n. 1, p. 49-67, 2008.

KIM, H. et al. Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. **Toxicology**, v. 220, n. 2-3, p. 169-78, Mar 15 2006.

KUROSAWA, S.; KATO, M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. **Journal of Anesthesia**, v. 22, n. 3, p. 263-277, August 01 2008.

KUROSAWA, S.; KATO, M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. **J Anesth**, v. 22, n. 3, p. 263-77, 2008.

LEE, Y.-M.; SONG, B. C.; YEUM, K.-J. Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 8, 2015.

LEE, Y. M.; SONG, B. C.; YEUM, K. J. Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 242709, 2015.

LUCCHESI, P. A.; BELMADANI, S.; MATROUGUI, K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. **J Hypertens**, v. 23, n. 3, p. 571-9, Mar 2005.

MARKOVIC-BOZIC, J. et al. Effect of propofol and sevoflurane on the inflammatory response of patients undergoing craniotomy. **BMC anaesthesiology**, v. 16, p. 18-18, 2016.

MCBRIDE, W. T.; ARMSTRONG, M. A.; MCBRIDE, S. J. Immunomodulation: an important concept in modern anaesthesia. **Anaesthesia**, v. 51, n. 5, p. 465-473, 1996. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2044.1996.tb07793.x> >.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428, 07/23/online 2008.

MESCHIARI, C. A. et al. Nitric oxide attenuates matrix metalloproteinase-9 production by endothelial cells independent of cGMP- or NFkappaB-mediated mechanisms. **Mol Cell Biochem**, v. 378, n. 1-2, p. 127-35, Jun 2013.

METZGER, I. F.; SANDRIM, V. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Endogenous nitric oxide formation correlates negatively with circulating matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 levels in black subjects. **Mol Cell Biochem**, v. 360, n. 1-2, p. 393-9, Jan 2012.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001/02/01/ 2001.

MITSUHATA, H.; SHIMIZU, R.; YOKOYAMA, M. M. Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 6, p. 529-534, 1995/06/01/ 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MÜLLER-EDENBORN, M. D. B. et al. Volatile Anesthetics Reduce Invasion of Colorectal Cancer Cells through Down-regulation of Matrix Metalloproteinase-9. **Anesthesiology**, v. 117, n. 2, p. 293-301, 2012.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol Chem**, v. 378, n. 3-4, p. 151-60, Mar-Apr 1997.

NAKAMURA, K. et al. Mechanisms of inhibition of endothelium-dependent relaxation by halothane, isoflurane, and sevoflurane. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 41, n. 4, p. 340-346, April 01 1994.

NASCIMENTO, R. A. et al. Hypertension, augmented activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 and angiogenic imbalance in hypertensive pregnancy are attenuated by doxycycline. **Eur J Pharmacol**, v. 840, p. 60-69, Oct 15 2018.

NI, C. et al. Anesthetic Isoflurane Induces DNA Damage Through Oxidative Stress and p53 Pathway. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 3591-3605, 2017

OHBAYASHI, H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. **Curr Protein Pept Sci**, v. 3, n. 4, p. 409-21, Aug 2002.

PALMER, R. M. J. et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 153, n. 3, p. 1251-1256, 1988/06/30/ 1988.

PERICO, L. L. et al. Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? An integrative study of the biological effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 172, p. 312-24, Aug 22 2015.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S. et al. Increases in placental nitric oxide, but not nitric oxide-mediated relaxation, underlie the improvement in placental efficiency and antihypertensive effects of hydrogen sulphide donor in hypertensive pregnancy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 45, n. 11, p. 1118-1127, 2018.

RATZ, P. H. et al. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C769-C783, 2005.

RIZZI, E. et al. Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac

hypertrophy. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 1, p. 1-9, 2013/02/01/ 2013.

ROCHA, T. L. A. et al. Sevoflurane Induces DNA Damage Whereas Isoflurane Leads to Higher Antioxidative Status in Anesthetized Rats. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 6, 2015.

SAMARSKA, M. D. IRYNA V. et al. Adjunct Nitrous Oxide Normalizes Vascular Reactivity Changes after Hemorrhagic Shock in Mice under Isoflurane Anesthesia. **Anesthesiology**, v. 111, n. 3, p. 600-608, 2009.

SANDOO, A. et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The open cardiovascular medicine journal**, v. 4, p. 302-312, 2010.

SATO, N.; FUJII, K.; YUGE, O. In vivo and in vitro sevoflurane-induced lipid peroxidation in guinea-pig liver microsomes. **Pharmacol Toxicol**, v. 75, n. 6, p. 366-70, Dec 1994.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, NAVDEEP S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014/05/19/ 2014.

SEN, C. K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB J**, v. 10, n. 7, p. 709-20, May 1996.

SILVA, B. R. et al. Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 721, n. 1-3, p. 193-200, Dec 5 2013.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013/01/01/ 2013.

SPINALE, F. G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. **Physiol Rev**, v. 87, n. 4, p. 1285-342, Oct 2007.

SPINALE, F. G. et al. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. **Cardiovasc Res**, v. 46, n. 2, p. 225-38, May 2000.

STACHNIK, J. Inhaled anesthetic agents. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, n. 7, p. 623-634, 2006.

STOLLINGS, L. M. et al. Immune Modulation by Volatile Anesthetics. **Anesthesiology**, v. 125, n. 2, p. 399-411, 2016.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-81, Dec 2003.

TODA, H. et al. Halothane and isoflurane inhibit endothelium-dependent relaxation elicited by acetylcholine. **Anesth Analg**, v. 75, n. 2, p. 198-203, Aug 1992.

TODA, M. D. P. D. N.; TODA, M. D. P. D. H.; HATANO, M. D. P. D. Y. Nitric Oxide Involvement in the Effects of Anesthetic Agents. **Anesthesiology**, v. 107, n. 5, p. 822-842, 2007.

TÜRKAN, H. et al. Oxidative and Antioxidative Effects of Desflurane and Sevoflurane on Rat Tissue in Vivo. v. 62, n. 2, p. 113, 2011.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, n. 3, p. 342-350, 2001.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22-96, 2017.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2003.

WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J**, v. 5, n. 8, p. 2145-54, May 1991.

WONG, C. H. et al. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 8, p. 1399-407, Aug 2006.

XU, S.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. **The Canadian journal of cardiology**, v. 22, n. 11, p. 947-951, 2006

YAMAGUCHI, A.; OKABE, E. Effect of sevoflurane on the vascular reactivity of rabbit mesenteric artery. **Br J Anaesth**, v. 74, n. 5, p. 576-82, May 1995.

YOSHIDA, K.; OKABE, E. Selective impairment of endothelium-dependent relaxation by sevoflurane: oxygen free radicals participation. **Anesthesiology**, v. 76, n. 3, p. 440-7, Mar 1992. ISSN 0003-3022