

Jose Eduardo Bagnara Orosz

Avaliação do perfil de citocinas no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia inalatória com sevoflurano

Orientador: Prof. Titular José Reinaldo Cerqueira Braz

Co-orientadora: Dr^a Mariana Gobbo Braz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Anestesiologia

**Botucatu
2011**

Dedicatória

Às pessoas mais importantes da minha vida:

Glauce, minha esposa, pelo amor, apoio e compreensão;

Camila, nossa obra-prima, por tantas alegrias;

João Carlos e Luzia, meus pais queridos,

exemplos de tudo que aprendi de melhor.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que possibilitaram a concretização desse trabalho.

Em especial:

Ao Prof. Titular José Reinaldo Cerqueira Braz, exemplo de dedicação, comprometimento e competência, minha admiração pela sabedoria e serenidade, e minha profunda gratidão pela confiança e paciência como meu orientador.

À Dra. Mariana Gobbo Braz, pelo incentivo, vasto conhecimento transmitido e pela didática irretocável na coorientação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Leandro Gobbo Braz, pelo inestimável auxílio na coleta das amostras.

À Dra. Márjorie de Assis Golim, pelos ensinamentos e comprometimento na realização das análises de citometria de fluxo.

À colega Marina Ázer Mazoti, pelos ensinamentos e grande auxílio no processamento das amostras.

À Dra. Denise Fecchio pelos ensinamentos em imunologia e discussão dos resultados.

A Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho, pelo auxílio na análise estatística.

Aos professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo aprendizado e exemplo de seriedade acadêmica.

Ao colega Márcio Barreira, pela ajuda na seleção dos pacientes.

À acadêmica Bárbara pela ajuda na seleção dos voluntários.

Aos pacientes e voluntários que doaram amostras de seu sangue para a expansão do conhecimento científico.

Aos colegas e funcionários do Hemocentro de Botucatu, do Laboratório de Citometria de Fluxo e do Departamento de Patologia.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo Auxílio à Pesquisa concedido.

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu: Neli Aparecida Pavan, Joana Jacirene Costa Teixeira e André Passaroni, pela amizade e atenção que sempre me dispensaram.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Interação neuroimunoendócrina durante o estresse cirúrgico.....	17
Figura 2	Interações entre células <i>natural killer</i> (NK), linfócitos, linfócitos T <i>helper</i> (Th) e células apresentadoras de antígenos.....	20
Figura 3	Concentrações plasmáticas de IL-4 nos grupos em M1.....	45
Figura 4	Concentrações plasmáticas de IL-5 nos grupos em M1.....	45
Figura 5	Concentrações plasmáticas de IL-5.....	47
Figura 6	Concentrações plasmáticas de IL-6.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro A	Doses totais de fentanil (FNT), brometo de rocurônio (Roc) e sevoflurano (SVF).....	77
Quadro B	Dados demográficos e gênero no grupo controle.....	77
Quadro C	Dados demográficos, gênero e doses totais dos anestésicos no grupo sevoflurano.....	78
Quadro D	Temperatura ambiente (°C) na sala de operação.....	78
Quadro E	Temperatura esofágica (°C).....	79
Quadro F	Anestésico sevoflurano expirado (%).....	79
Quadro G	Pressão Arterial Sistólica (mm Hg).....	80
Quadro H	Pressão Arterial Diastólica (mm Hg).....	80
Quadro I	Frequência cardíaca (bpm).....	81
Quadro J	SpO ₂ =Saturação periférica de oxigênio (%).....	81
Quadro K	P _{ET} CO ₂ = pressão expirada de CO ₂ (mm Hg).....	82
Quadro L	Concentração plasmática de interleucina 1-β (pg.mL ⁻¹).....	83
Quadro M	Concentração plasmática de interleucina 2 (pg.mL ⁻¹).....	84
Quadro N	Concentração plasmática de interleucina 4 (pg.mL ⁻¹).....	85
Quadro O	Concentração plasmática de interleucina 5 (pg.mL ⁻¹).....	86
Quadro P	Concentração plasmática de interleucina 6 (pg.mL ⁻¹).....	87
Quadro Q	Concentração plasmática de interleucina 8 (pg.mL ⁻¹).....	88
Quadro R	Concentração plasmática de interleucina 10 (pg.mL ⁻¹).....	89
Quadro S	Concentração plasmática de interleucina 12 (pg.mL ⁻¹).....	90
Quadro T	Concentração plasmática de interleucina TNF-α (pg.mL ⁻¹).....	91
Quadro U	Concentração sérica de interleucina - IFN-γ (pg.mL ⁻¹).....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores demográficos e gênero dos indivíduos dos grupos estudados..	42
Tabela 2	Tipo de cirurgia, duração da cirurgia, e doses totais de fentanil, brometo de rocurônio e sevoflurano no grupo SVF.....	42
Tabela 3	Valores do intra-operatório segundo os momentos estudados no grupo sevoflurano.....	43
Tabela 4	Valores hemodinâmicos segundo os momentos estudados.....	44
Tabela 5	Valores plasmáticos (pg.mL^{-1}) das citocinas nos grupos estudados.....	46
Tabela 6	Valores plasmáticos (pg.mL^{-1}) das citocinas no grupo sevoflurano.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

IL	Interleucina
IFN γ	Interferon Gama
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
SVF	Sevoflurano
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
SNS	Sistema Nervoso Central
SAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TGF β 1	Fator de Crescimento Beta 1
NK	Células "Natural Killer"
LAK	Células Linfocina-Ativadas
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
PGE2	Prostaglandina E2
LPS	Lipopolissacarídeo
IgE	Imunoglobulina E
Th1	Linfócitos Auxiliares Tipo 1
Th2	Linfócitos Auxiliares Tipo 2
PCR	Proteína C Reativa
CEC	Circulação Extracorpórea
ASA	Sociedade Americana de Anestesiologistas
SO	Sala de Operação
ECG	Eletrocardiografia
TOF	Sequência de Quatro Estímulos
IV	Intravenoso
CAM	Concentração Alveolar Mínima
CO ₂	Dióxido de Carbono
C°	Graus Celsius
T _{SO}	Temperatura da Sala de Operação
T _{ESOF}	Temperatura Esofágica

P_{ETCO_2}	Pressão Expirada Final de Gás Carbônico
SEV_{exp}	Concentração de Sevoflurano Expirado
SpO_2	Saturação Periférica de Oxigênio
n	Número de Casos
p	Nível de Significância Estatística
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
mm Hg	Milímetros de Mercúrio
$pg.mL^{-1}$	Picogramas por Mililitro
$mg.kg^{-1}$	Miligramas por Quilo de Peso Corporal
$\mu g.kg^{-1}$	Microgramas por Quilo de Peso Corporal
μg	Micrograma
μL	Microlitro
$kg.m^{-2}$	Quilogramas por Metro Quadrado
FiO_2	Fração Inspirada de Oxigênio
Min	Minutos
$L.min^{-1}$	Litros por Minuto
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ANOVA	Análise de Variância
IMC	Índice de Massa Corporal
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

> Maior

< Menor

\geq Maior ou igual

\leq Menor ou igual

+ Mais

- Menos

\pm Mais ou menos

μ Mi

α Alfa

β Beta

γ Gama

® Marca registrada

% por cento

Orosz, José Eduardo Bagnara. Avaliação do perfil de citocinas no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia inalatória com sevoflurano. Botucatu, 2011. 92p. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

RESUMO

Indivíduos submetidos ao ato anestésico-cirúrgico apresentam estresse reacional, caracterizado por resposta inflamatória, devido não apenas ao trauma da cirurgia, mas também ao emprego dos anestésicos. Pesquisas recentes têm dado atenção especial às citocinas envolvidas na resposta inflamatória, mas ainda não há consenso quanto a influência do sevoflurano (SVF) no perfil de citocinas. Esse estudo analisou as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ durante a anestesia com SVF em pacientes com estado físico ASA I, submetidos a cirurgias de pequeno porte, e idade de 18 a 55 anos. Os indivíduos foram distribuídos em dois grupos de 15, sendo os do grupo SVF pacientes submetidos a cirurgia de timpanoplastia ou septoplastia com duração de pelo menos 120 minutos, sob anestesia geral com SVF em 1,0 a 1,5 concentração alveolar mínima (CAM). As amostras de sangue foram coletadas antes da indução anestésica (M1-pré-cirurgia), após indução anestésica e imediatamente antes do início da cirurgia (M2), 120 minutos após o início da anestesia inalatória (M3), e no 1º dia do pós-operatório (M4). Outros 15 indivíduos constituíram o grupo controle, voluntários dos quais foi obtida uma única amostra de sangue venoso. A análise das

citocinas foi feita pelo método da citometria de fluxo utilizando o kit BD *Cytometric Bead Array*. Observou-se diferença significativa em relação a IL-4 ($p=0,02$), maior entre os pacientes, e IL-5 ($p<0,001$), maior entre os voluntários. No grupo de pacientes, houve aumento significativo de IL-5 em M3 em relação a M1 ($p=0,03$), e de IL-6 no momento M4 em relação aos momentos M1 e M2 ($p<0,001$). Em conclusão, em pacientes adultos com estado físico ASA I submetidos a cirurgias de timpanoplastia ou septoplastia, a anestesia com sevoflurano, com exceção de aumento de IL-5 no intraoperatório e de IL-6 no pós-operatório, não altera o perfil das citocinas durante e após o ato anestésico-cirúrgico.

Palavras-chave: Anestesia inalatória; Citocinas; Citometria de fluxo; Estresse Inflamatório; Sevoflurano.

Orosz, José Eduardo Bagnara. Plasma cytokine profile in patients submitted to surgery under inhalation anaesthesia with sevoflurane. Botucatu, 2011. 92p. Botucatu Medical School, UNESP.

ABSTRACT

Patients have stress when submitted to anaesthesia and surgery, characterized by inflammatory response because of the surgery trauma, and possibly due to the anaesthetics. Literature shows controversial data as most studies have been designed using large surgery models. Using minor surgical procedures, in order to reduce tissue injury influence on inflammatory response, this study aimed to evaluate the effects of anaesthesia with sevoflurane (SVF) on plasma cytokine profile from 15 ASA I patients of both genders, aged from 18 to 55, scheduled for tympanoplasty or septoplasty lasting, at least, 120 minutes, with 1.0 to 1.5 minimum alveolar concentration of SVF. Blood samples were drawn at 4 time points: before anaesthesia induction (T1 - baseline), before surgery (T2), at 120 minutes after anaesthesia induction (T3), and on the postoperative first day (T4). The study also included 15 healthy volunteers, not submitted to anaesthesia and surgery, as controls (C) to T1, and from whom blood sample was collected a single time. Plasma IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ) were assessed in plasma from patients and volunteers by flow cytometry, using the BD[®] Cytometric Bead Array kit. IL-4 (p=0,02) and IL-5 (p<0,001) differed between groups at T1. In the patient group there were differences on IL-5 (p=0,03) and IL-6 (p<0,001) levels, with peak

values at M3 and M4, respectively. In conclusion, data showed that with exception to IL-5 and IL-6, adult ASA I patients submitted to minor otorhinolaryngological surgical procedures, under inhalation anesthesia with SVF, have no changes on plasma cytokines profile.

Keywords: Anaesthesia, Inhalation, sevoflurane; Cytokines; Flow Cytometry; Inflammatory Stress.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE QUADROS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE SIMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO E LITERATURA	16
1.1 Papel das Citocinas no Processo Inflamatório.....	16
1.2 Anestesia, Cirurgia e Sistema Imunológico	28
1.3 Citocinas, Cirurgia e Anestesia	29
2 OBJETIVO	34
3 PACIENTES E MÉTODO	35
3.1 Casuística	35
3.2 Momentos Estudados	38
3.3 Amostras de Sangue	38
3.4 Análise das Citocinas	39
3.5 Análise Estatística	40
4 RESULTADOS	42
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERÊNCIAS	63
8 ANEXOS	69
8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente	69
8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário	71
8.3 Questionário.....	73
APÊNDICE	77

1 INTRODUÇÃO E LITERATURA

1.1 Papel das Citocinas no Processo Inflamatório

As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, secretadas ou liberadas de forma rápida e auto-limitada e que são fundamentais para a manutenção do sistema imunológico. Formam um grupo heterogêneo e são também denominadas linfocinas, monocinas, interleucinas (IL) ou interferons (IFN). Estão envolvidas nos mecanismos de defesa do organismo e também na gênese de doenças, como a artrite reumatóide, por estarem envolvidas na mediação de importantes etapas dos processos inflamatórios, tanto agudos, após um trauma como o cirúrgico, como crônicos (Sheeran & Hall, 1997).

As citocinas são produzidas por leucócitos ativados, particularmente linfócitos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais. A ativação dessas células é uma das etapas iniciais da resposta à agressão tecidual e está também associada à liberação de outros mediadores inflamatórios, como ácido aracdônico, enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio (Hall & Ali, 1998).

Localmente, as citocinas iniciam e coordenam a resposta inflamatória para contenção de eventual invasão de micro-organismos como vírus, bactérias ou fungos, e facilitam a reparação tecidual. Sistemicamente, as citocinas circulantes ativam o sistema hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), desencadeando a liberação de catecolaminas e hormônios glicocorticóides (Kohl & Deutschman, 2006) (Figura1).

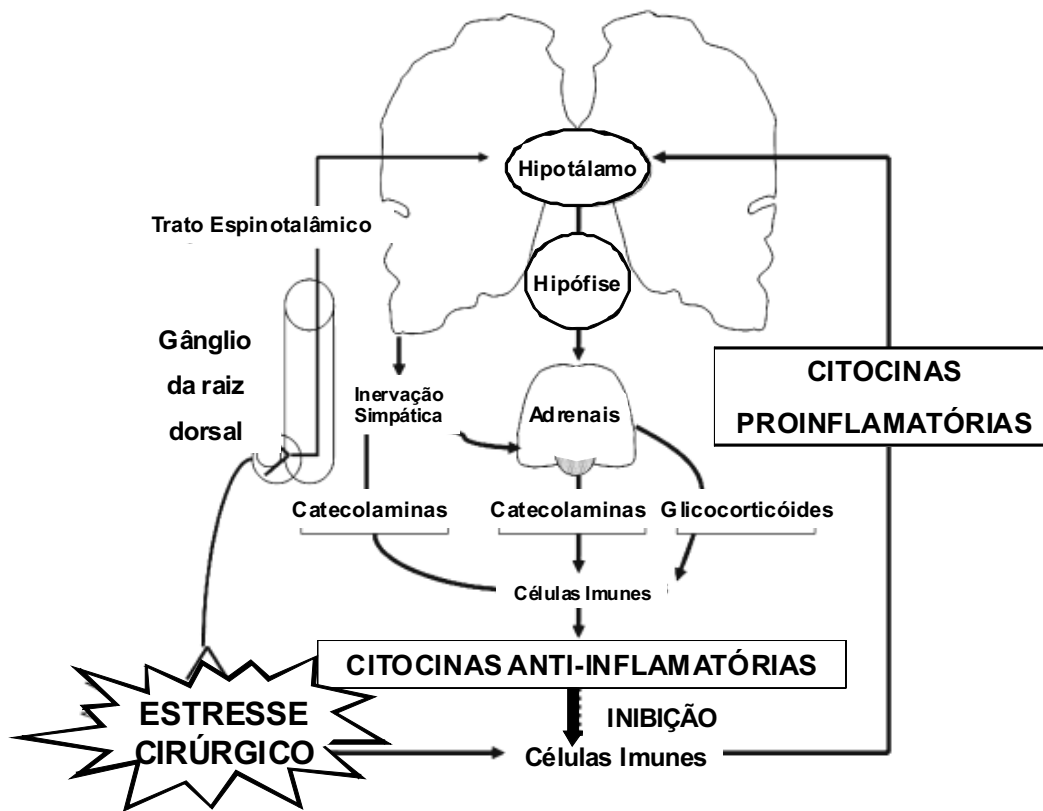


Figura 1 – Interação neuroimunoendócrina durante o estresse cirúrgico. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), a inervação do sistema nervoso simpático (SNS) e as citocinas representam os componentes periféricos. Citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células imunes estimulam o hipotálamo e ativam o eixo HPA e o SNS. Catecolaminas e glicocorticóides estimulam linfócitos Th2 e células apresentadoras de antígenos (APC) 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.

As citocinas estão envolvidas na regulação da amplitude e duração das respostas imune e inflamatória. São extremamente potentes, presentes em concentrações de picomols. Agem inicialmente ligando-se a receptores na membrana de suas células-alvo, de forma parácrina (agindo em células vizinhas) ou autócrina, mais do que endócrina (sistêmica).

A ligação das citocinas aos receptores de membrana modifica a síntese intracelular de RNA mensageiros, e, em última instância, o comportamento celular. Agem em diferentes tipos de células, inclusive influenciando a síntese e a ação de outras citocinas, e, como fatores de crescimento, regulam a divisão celular. Sua ação em determinada célula depende de sua concentração no local (Sheeran & Hall, 1997). Dessa forma, regulam e modificam o crescimento, a maturação e a reparação celular (Frankenstein *et al.*, 2006).

A maioria das citocinas é sintetizada por demanda, mas algumas podem ser estocadas em grânulos citoplasmáticos ou formando complexos com proteínas na superfície celular, como o Fator Transformador de Crescimento beta 1 (TGF- β 1). Também podem permanecer na forma de proteínas de membrana, como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) presente em mastócitos, servindo como fonte imediata na eventualidade de rompimento da matriz tecidual durante a agressão (Sheeran & Hall, 1997).

A resposta imunológica é dividida basicamente em inespecífica (inata) e específica (adquirida). A primeira envolve barreiras fisiológicas e células fagocitárias. Esses mecanismos estão presentes antes da exposição a substâncias exógenas e não são potencializados por re-exposição. Por outro lado, a resposta imunológica específica, adquirida após contato com antígenos,

que desencadeiam a produção de anticorpos, pode crescer em magnitude a cada novo contato, ganhar eficiência e auxiliar os mecanismos inatos (Kurosawa & Kato, 2008).

Quando uma substância estranha invade o organismo, as primeiras ações direcionadas a eliminá-la são exercidas por macrófagos e neutrófilos. Após a fagocitose, essas células passam a agir como células apresentadoras de antígenos (APC), expondo, na superfície externa de suas membranas, fragmentos de moléculas do invasor, e começam a sintetizar enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos são, então, responsáveis por uma fase crítica, a da ativação de outras células de defesa, envolvidas no desencadeamento da resposta imunológica, que é a liberação de citocinas. Estas transmitirão informações a outros leucócitos, sobretudo às células chamadas *natural killer* (NK), e aos linfócitos T auxiliares (*helper*). Assim, a partir da exposição de fragmentos do antígeno na superfície de células APC, são desencadeadas respostas que resultam na produção de anticorpos altamente específicos (imunidade humoral) ou na produção de tipos particulares de linfócitos (imunidade celular) (Figura 2).

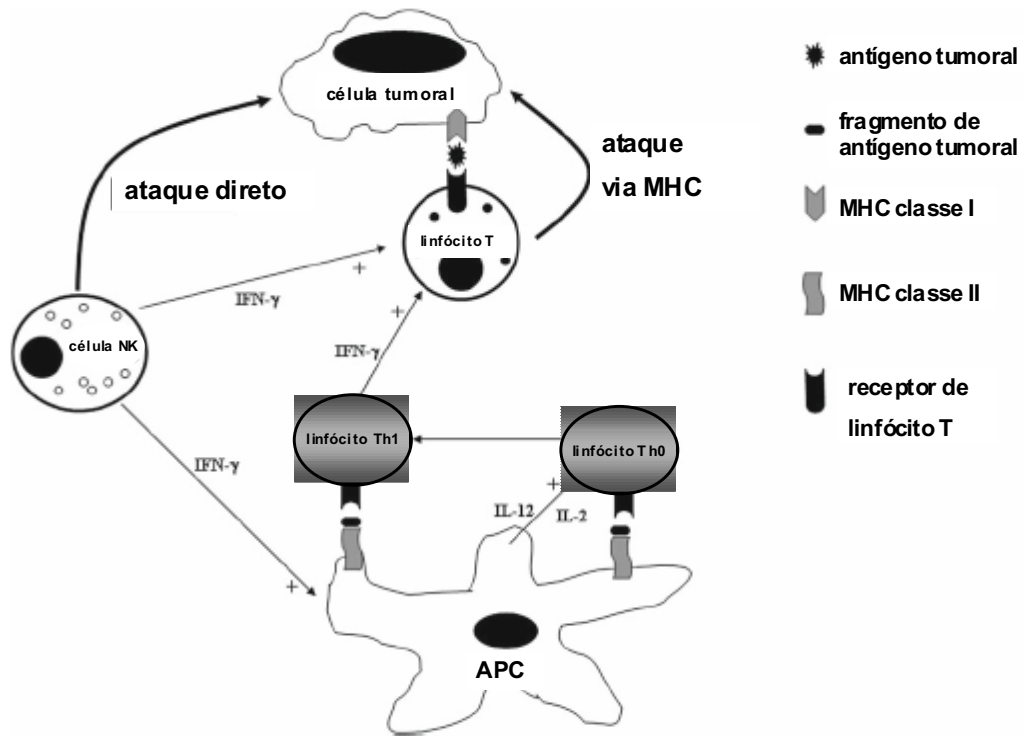


Figura 2 - Interações entre células *natural killer* (NK), linfócitos, linfócitos T *helper* (Th) e células apresentadoras de antígenos. Adaptado de Kurosawa & Kato, 2008.

As células NK agem inicialmente de forma não específica, a fim de eliminar o antígeno, erradicando a célula infectada. Células NK são linfócitos grandes que destroem outras células por contato direto, também denominadas linfócitos citotóxicos ou $CD8^+$. Quando esse primeiro combate realizado apenas por macrófagos for insuficiente, entram em ação as células NK, que após sofrerem diferenciação sob influência de citocinas liberadas em resposta à atividade fagocitária de neutrófilos, passam a ser chamadas de linfocinas-ativadas (*LAK cells*). Células NK liberam citocinas como $TNF-\alpha$ e Interferon gama ($IFN-\gamma$), ao serem estimuladas por interleucinas 2 (IL-2) e 12 (IL-12), a fim de amplificar e estender a resposta imunológica (Kurosawa & Kato, 2008).

Linfócitos B, provenientes da medula óssea, possuem receptores de membrana para fragmentos de antígenos, que uma vez ativados, desencadeiam a produção de anticorpos. Linfócitos T são capazes de reconhecer e responder a antígenos apenas quando estão combinados a uma molécula do Complexo de Histocompatibilidade Principal, ou *Major Histompatibility Complex* (MHC), na superfície de uma célula APC. Há duas formas de MHC, classes I e II, assim como dois tipos de linfócitos, chamados auxiliares ($CD4^+$) ou citotóxicos ($CD8^+$). MHC corresponde a uma região de genes polimórficos expressos no braço curto do cromossomo 6, cujos produtos, designados proteínas MHC, são expostos na superfície de uma variedade de células (Kurosawa & Kato, 2008).

Fragmentos de proteínas fagocitadas, provenientes de células estranhas ao organismo, são expressos ligados ao MHC de classe II, sendo reconhecidos por linfócitos T *helper* (Th). Por outro lado, os peptídeos derivados de proteínas

sintetizadas nas células do organismo, mas a partir de material genético exógeno (viral), são geralmente expressos ligados a MHC de classe I e reconhecidos por linfócitos T citotóxicos.

Linfócitos Th respondem a antígenos expostos na superfície de células APC. Após serem ativados, produzem citocinas que estimulam a formação e a diferenciação de maior número de linfócitos. Secretando perfis distintos de citocinas, direcionam a diferenciação ao desenvolvimento de dois subtipos (Th1 e Th2): IFN- γ e IL-12 induzem diferenciação em linfócitos Th1, que produzirão IL-2 e mais IFN- γ , enquanto que a IL-4 direciona para o desenvolvimento de linfócitos Th2, que secretarão IL-5, IL-10, IL-13, além de mais IL-4 (Sheeran & Hall, 1997).

As LAK *cells*, em contato com proteínas estranhas ao organismo, produzem IL-2, IL-12 e IFN- γ , e direcionam a diferenciação ao desenvolvimento de linfócitos Th1 e de imunidade celular. Já a produção de IL-4 favorece o desenvolvimento de linfócitos Th2 e da imunidade humoral, ligada à reação alérgica. O desenvolvimento do subtipo apropriado de linfócito T é importante porque alguns patógenos são controlados de forma mais eficiente por imunidade celular (Th1) ou humoral, sendo essa última mediada por anticorpos (Th2) (Sheeran & Hall, 1997).

Por ser uma citocina-chave na inflamação, a IL-1 também tem como funções a citotoxicidade celular, a potencialização da expressão de moléculas de MHC classe II e a ativação de células NK. Por outro lado, a IL-1 não induz reação inflamatória por si própria, mas age indiretamente, potencializando os efeitos do TNF- α . A IL-1 é muito importante na instalação da resposta

inflamatória aguda, por estimular a síntese de IL-6 e de IL-8 por monócitos, fibroblastos e células endoteliais. Também tem ação vasodilatadora, estimulando as células endoteliais vasculares para liberação de óxido nítrico. Os monócitos são as células que mais secretam IL-1, enquanto células endoteliais, da musculatura lisa e fibroblastos a produzem em menor quantidade (Cheng, 2005).

A IL-1 existe em duas formas: α e β , produzidas a partir de dois genes diferentes, mas que se ligam ao mesmo receptor e tem afinidades semelhantes (Dinarello, 1998). A IL-1 β tem maior potência inflamatória que o TNF- α . Estimula a hematopoiese, é potente agente pirogênico endógeno e eleva a síntese de prostaglandina E2 (PGE2). Em comum com o TNF- α , o maior estímulo para liberação de IL-1 é o antígeno lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana de patógenos como a *Escherichia coli* (Takaono *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009).

A IL-2 é o principal fator de crescimento autócrino e parácrino para linfócitos T. A quantidade secretada dessa citocina determina o grau de envolvimento desse subtipo de linfócito na resposta imunológica desencadeada. A IL-2 também regula a produção de IFN- γ e TNF- α pelos linfócitos T. A secreção de PGE2, que ocorre após a agressão tecidual, inibe a síntese de IL-2, atuando como *feedback* negativo (Sheeran & Hall, 1997). Administração de altas doses de IL-2 melhorou a sobrevivência em modelo murino de sepsis após queimadura (Gough *et al.*, 1988).

A IL-4 é a principal citocina envolvida na produção de imunoglobulina E (IgE), pela ativação e estímulo à proliferação de linfócitos B. Também estimula

a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, visando rápida transferência de eosinófilos às áreas de inflamação. Além disso, a IL-4 inibe a ativação de macrófagos e a produção de citocinas de padrão Th1, de óxido nítrico e de prostaglandinas, com efeitos inibitórios, semelhantes aos de IL-10 (Sheeran & Hall, 1997).

A IL-5 é potente fator quimiotático para os eosinófilos e age estimulando os linfócitos B. IL-4, IL-5, linfócitos Th2 e eosinófilos são encontrados em grandes quantidades em locais onde há reações alérgicas. Por isso indivíduos alérgicos apresentam valores elevados dessas citocinas (Sheeran & Hall, 1997).

A IL-6 é importante citocina circulante, sendo produzida por macrófagos e linfócitos padrão Th2. É responsável por estimular o crescimento de linfócitos B e a diferenciação destes em plasmócitos. Desencadeia também a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, tais como proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio, estimula a hematopoiese, induz à febre e estimula a secreção de hormônios adrenocorticotróficos e cortisol (Cheng, 2005). Essas mudanças fisiológicas são conhecidas como alterações na resposta inflamatória de fase aguda (Hall & Ali, 1998). IL-1, IL-6 e TNF- α são considerados seus principais mediadores (Heinrich *et al.*, 1990; Sheeran & Hall, 1997).

A IL-6 também está envolvida no crescimento e diferenciação de linfócitos, não apenas linfócitos B, mas também os linfócitos T. Essa citocina pode ser utilizada como marcador para o processo inflamatório instalado (Cheng, 2005). Expressão excessiva de IL-6 ou ativação crônica de sua

secreção está relacionada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (Sheeran & Hall, 1997).

Minutos após uma lesão tecidual, macrófagos e monócitos liberam TNF- α , que atua na ativação de fagócitos, na síntese de moléculas de adesão endotelial (Patrich *et al.*, 1996) e de proteínas de fase aguda, assim como na ativação das cascatas de coagulação e de complemento. Embora as principais fontes de síntese de TNF- α sejam macrófagos e monócitos, os linfócitos, mastócitos, basófilos e eosinófilos também o secretam. As funções do TNF- α nas reações imunes podem ocorrer em sinergismo com IL-1 e IL-6. Assim sendo, o aumento na síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, a ativação de células endoteliais para produção de IL-1 e o aumento na expressão de fatores teciduais são exemplos dessa interação entre citocinas (Cheng, 2005).

Já a IL-8 é uma citocina que promove a quimiotaxia e a ativação de neutrófilos, além da migração de outras células, como basófilos e linfócitos T. É produzida por macrófagos, linfócitos T, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e queratinócitos (Cheng, 2005). É considerada a citocina inflamatória mais relevante no envolvimento na gênese da disfunção pulmonar após isquemia e reperfusão, agindo como fator importante quimiotático para neutrófilos. Essa lesão é relativamente comum após cirurgias realizadas sob assistência de circulação extracorpórea (CEC) e envolve a destruição do endotélio vascular pulmonar mediada por neutrófilos (Finn *et al.*, 1993). É descrita, inclusive, haver correlação positiva entre duração do *bypass* cardiopulmonar e a concentração plasmática de IL-8 (Sheeran & Hall, 1997).

Há evidências que sua liberação seja desencadeada, também, pelo estresse psicológico (Steptoe *et al.*, 2007).

A IL-10 é considerada a citocina anti-inflamatória mais importante, atuando como reguladora e limitadora dos processos inflamatórios, sobretudo sistêmicos, como ocorre na sepsis (Opal & Depalo, 2000; Moore *et al.*, 2001). É produzida por linfócitos Th, linfócitos B, macrófagos, mastócitos e queratinócitos (Cheng, 2005). Age inibindo as células APC, pela redução da expressão de MHC de classe II (De Waal *et al.*, 1991). Dessa forma, reduz também a ativação de macrófagos e sua habilidade em secretar citocinas com efeito autócrino, o que os torna incapazes de auxiliar na estimulação de linfócitos T e células NK (Cheng, 2005). IL-10 também reduz respostas celulares suprimindo a produção de PGE2 e citocinas inflamatórias, principalmente IL-2 e IFN- γ (Niiri *et al.*, 1994). Outro mecanismo de controle é a inibição na síntese das citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, monócitos e células dendríticas (de Waal Malefyt *et al.*, 1991).

A IL-12 é produzida sobretudo por monócitos e macrófagos ativados, mas também é liberada por linfócitos B. A IL-12 induz a síntese de IFN- γ e TNF- α por células mononucleares sanguíneas e NK, e atua sobre essas últimas células aumentando sua atividade citotóxica e regulando a expressão de moléculas de superfície. Tem ainda papel importante na resposta imune, principalmente no desenvolvimento de células padrão Th1, por induzir a maturação de linfócitos Th para esse perfil, aumentar a liberação de IFN- γ e inibir IL-4. Por outro lado, na presença de altas concentrações de IL-4, esse

efeito é suprimido, favorecendo o desenvolvimento de células padrão Th2 (Sheeran & Hall, 1997).

O IFN- γ é produzido por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e células NK, e exerce potente efeito imunorregulatório. Inibe a replicação viral, estimula a produção de anticorpos pelos linfócitos B e é importante desencadeador da maturação de linfócitos Th1. Aumenta ainda a eficácia do combate a parasitas intracelulares por macrófagos. Antagoniza os efeitos de IL-4, inibindo a atividade de células Th2 (Mosmann & Coffman, 1989).

Apesar da inflamação ser processo essencial para a reconstituição tecidual, a exacerbação da reação inflamatória, por liberação eventualmente descontrolada de mediadores, desencadeada por estímulo intenso, pode conduzir o organismo à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), quando há ativação exagerada do sistema imunológico, evoluindo com ativação da cascata de coagulação, lesão de endotélio vascular, vasoplegia, hipoperfusão tecidual e choque, culminando na disfunção de múltiplos órgãos e morte (Cheng, 2005).

Diferentes citocinas podem desempenhar uma mesma função biológica, assim como cada uma delas desempenha diversas atividades. Da combinação das ações de muitos mediadores resulta a integração de diferentes sistemas fisiológicos, importante para o controle do estresse vigente no organismo durante os períodos intra e pós-operatório, e é essencial para o restabelecimento da homeostase e para a recuperação do paciente submetido a anestesia e cirurgia.

Por estarem diretamente relacionadas ao estado inflamatório do organismo como um todo, condições como doenças malignas, genéticas, reumatológicas, endócrino-metabólicas como diabetes e obesidade, além da exposição a substâncias exógenas como medicamentos, produtos químicos, fumo e álcool (Von Dossow *et al.*, 2007), podem causar alteração do perfil de citocinas no plasma. Pacientes idosos tendem a apresentar liberação mais tardia das citocinas como resposta à agressão tecidual (Kudoh *et al.*, 2001).

1.2 Anestesia, Cirurgia e Sistema Imunológico

O período perioperatório envolve diversas situações que conduzem o organismo a um estado de estresse. Ocorrem mudanças hormonais, metabólicas, hematológicas, imunológicas e até mesmo genéticas (Hall & Ali, 1998), que promovem a instalação de um quadro inflamatório, cujo objetivo é a reparação dos danos teciduais e o restabelecimento da homeostase.

Para que seja efetiva, a reação inflamatória envolve a participação coordenada de diferentes órgãos e células, e demanda intensa interação endócrino-metabólica, que só é possível pela participação de mediadores inflamatórios (Frankenstein *et al.*, 2006).

A intensidade da resposta inflamatória guarda estreita relação com o tipo e o porte do procedimento cirúrgico. Cirurgias com incisões extensas, maior lesão tecidual ou invasão de cavidade peritoneal, sobretudo com manipulação de vísceras, levam à reação inflamatória mais intensa (Schietroma *et al.*, 2004; Tsuchiya *et al.*, 2008) que é máxima quando há necessidade de CEC (El Azab

et al., 2002). Nessa situação, a exposição do sangue à superfície do sistema e das membranas de hematose, desprovidas de endotélio, causa liberação maciça de mediadores pró-inflamatórios, e imediata ativação da cascata de coagulação (El Azab *et al.*, 2002).

A anestesia geral e o estresse cirúrgico são considerados causadores de imunossupressão por influenciarem o sistema imunológico, ativarem o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo simpático (SAS). Além do trauma tecidual cirúrgico, outros fatores como hipotermia, hiperglicemia, transfusão de hemoderivados, CEC e dor pós-operatória contribuem para a instalação do quadro de estresse (Salo *et al.*, 1997).

Os fármacos anestésicos podem modular a intensidade e influenciar a evolução desse quadro, por efeito direto na imunidade celular e neurohumoral (Schneemilch *et al.*, 2004), à medida que podem alterar funções de células imunocompetentes, além da expressão de genes responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios (Kurosawa *et al.*, 2008). Por outro lado, promovem inconsciência e analgesia, e alguns fármacos anestésicos como os opióides podem atuar indiretamente na resposta endócrino-metabólica ao trauma cirúrgico, atenuando ou evitando a ativação do eixo HPA (Snyder & Greenberg, 2010).

1.3 Citocinas, Cirurgia e Anestesia

Os pesquisadores têm dado atenção especial ao comportamento das citocinas em resposta ao dano tecidual causado pelo ato cirúrgico, que

modifica a resposta inflamatória direta ou indiretamente (El Azab *et al.*, 2002; Schneemilch *et al.*, 2004).

Na comparação entre técnicas cirúrgicas abdominais minimamente invasivas e convencionais, como laparoscopia e laparotomia, a primeira mostrou redução da resposta inflamatória (Kehlet *et al.*, 1999; Schneemilch *et al.*, 2004). Dessa forma, procedimentos pouco invasivos, como em cirurgias de superfície, estimulam pouco o sistema imunológico e geralmente cursam com reações inflamatórias mais restritas ao sítio cirúrgico, com menor repercussão sistêmica. Cirurgias oftalmológicas e otorrinolaringológicas são consideradas pouco invasivas e parecem ocasionar menor elevação de citocinas, sobretudo as pró-inflamatórias (Goto *et al.*, 2000). Por outro lado, pacientes submetidos a cirurgias cardíacas CEC apresentaram menor concentração de citocinas em relação aos que se submeteram à CEC. (Wan *et al.*, 1999; Matata *et al.*, 2000).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias mais influenciadas pelo procedimento cirúrgico estão IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (Hall & Ali, 1998, Cheng, 2005).

O perfil de citocinas envolvidas no processo inflamatório pode ser diferente, dependendo do tipo de anestesia e do anestésico empregado (El Azab *et al.*, 2002).

Alguns estudos relatam que a anestesia local não impede a liberação de citocinas moduladoras da resposta inflamatória da fase aguda (Hall & Alli, 1998; Duval *et al.*, 1999).

O efeito anti-inflamatório de alguns anestésicos pode ser benéfico em determinadas situações, por impedir a liberação exagerada de TNF- α e IL-8.

Tais citocinas estão envolvidas nos quadros de exacerbação da resposta inflamatória, com evolução para a SIRS (Kurosawa *et al.*, 2008).

Mas apesar de agirem fisiologicamente limitando a resposta inflamatória exacerbada, IL-4 e IL-10 secretadas de forma excessiva ou descontrolada podem levar à imunossupressão, prejudicial ao equilíbrio de todo o sistema (De Waal Malefyt *et al.*, 1991).

Particularmente em pacientes portadores de câncer, a imunossupressão produzida pelos anestésicos, pode, em tese, permitir ou acelerar as metástases, a partir de células malignas residuais após ressecção cirúrgica, com potencial para comprometer o prognóstico da doença, sobretudo a longo prazo. Isso é possível porque monócitos, neutrófilos e linfócitos são células secretoras de mediadores inflamatórios, apresentando na membrana receptores β_2 e de glicocorticóides. A ativação desses últimos pelos anestésicos pode inibir a produção de citocinas Th1, como IL-12 e IFN- γ em linfócitos T *helper*, com atividade pró-inflamatória, ou estimular a secreção de citocinas Th2, consideradas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 (Snyder & Greenberg, 2010).

Atualmente, entre os anestésicos halogenados, o sevoflurano [éter fluorometil 1-(trifluorometil) 2,2,2-trifluoro etílico], é um dos mais largamente empregados, pelas vantagens que oferece, devidas a seu baixo coeficiente de partição sangue-gás, possibilitando rápida indução anestésica, despertar igualmente breve, e pela vantagem de poder ser empregado para indução inalatória em crianças, por ter odor agradável e pouco pungente (Eger, 1994).

Entretanto, não há consenso sobre o efeito dos anestésicos inalatórios sobre os mediadores inflamatórios em cirurgias não invasivas. Estudos publicados sobre o tema são discordantes quanto aos resultados obtidos. Em cirurgias de timpanoplastia sob anestesia inalatória, empregando SVF, foram relatadas elevações, no intraoperatório, das citocinas plasmáticas IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Koksal *et al.*, 2005). Achados semelhantes foram relatados após ventilação mecânica sob uso de sevoflurano em ratos, com elevação de IL-1 β , IFN- γ e TNF- α (Kotani *et al.*, 1999), contrastando com resultados publicados demonstrando manutenção da concentração plasmática das citocinas IL-1 β , IL-8 e TNF- α e elevação apenas de IL-6 no pós-operatório em cirurgias de catarata, com o uso do mesmo agente anestésico (Goto *et al.*, 2000).

Poucos são os estudos sobre o perfil das citocinas plasmáticas realizados em pacientes sem outras comorbidades sistêmicas (ASA I) e empregando procedimentos pouco invasivos.

A escassez de dados sobre o comportamento das citocinas envolvidas na resposta inflamatória em pacientes sob a ação de um dos anestésicos mais utilizados atualmente, o sevoflurano, com relatos conflitantes sobre a liberação ou inibição de mediadores inflamatórios, estimulou a realização deste estudo.

Optando por cirurgias de pequeno porte, o desenho metodológico do estudo visou minimizar a influência do trauma cirúrgico, analisando o perfil de citocinas no plasma de pacientes submetidos a anestesia com sevoflurano, e procurando, assim, isolá-lo de eventual efeito da cirurgia. Também a fim de evitar possível viés para os resultados, optou-se por estudar amostra

populacional de adultos jovens que não apresentassem comorbidades ou exposição a fatores de risco para alteração do perfil de citocinas.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi o de estudar o perfil das citocinas inflamatórias e de perfil Th1/Th2 (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ) durante e após anestesia com o halogenado sevoflurano, para realização de cirurgias de timpanoplastia ou septoplastia, em pacientes com estado físico ASA I.

3 PACIENTES E MÉTODO

3.1 Casuística

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP [3167/2009-A] e registrado no *site clinicaltrials.gov* sob o identificador NCT 01231474. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 8.1 e 8.2) foi obtido de todos os participantes do estudo, após preenchimento de questionário sobre dados pessoais, informações gerais e história médica (Anexo 8.3).

O estudo foi realizado em 30 indivíduos, de ambos os sexos, com estado físico classificado pela Sociedade Americana de Anestesiologistas (ASA) como ASA I (pacientes saudáveis, que não apresentam outra doença a não ser a patologia cirúrgica (Fleisher, 2004) e com idade de 18 a 55 anos. Foram excluídos os indivíduos obesos, portadores de doença maligna, genética ou diabetes, os tabagistas, os que receberam radiação recente, e os que fizeram uso regular de álcool ou alguma medicação, e os que tiveram infecção ou inflamação em período de até 30 dias antes da cirurgia.

Os indivíduos foram distribuídos em dois grupos de 15, sendo um deles o grupo controle (grupo C), constituído por voluntários que não foram submetidos a procedimento anestésico-cirúrgico, e o outro, por pacientes da clínica otorrinolaringológica, expostos ao sevoflurano durante anestesia geral para as cirurgias propostas – septoplastia ou timpanoplastia (grupo SVF).

Os pacientes do grupo SVF receberam medicação pré-anestésica com midazolam (3 mg IV) na sala de operação (SO), onde foram monitorados com eletrocardiografia contínua (ECG) nas derivações DII e V5, pressão arterial não-invasiva, frequência cardíaca e saturação periférica de oxihemoglobina (SpO_2), utilizando-se biomonitor Dixtal (modelo DX2010, Manaus, Brasil). Após indução anestésica e intubação traqueal, foram também monitoradas as pressões inspirada e expirada de oxigênio e sevoflurano, e a pressão expiratória final de dióxido de carbono ($P_{ET}CO_2$), utilizando-se o aparelho de anestesia Primus, da Dräger Medical (Lübeck, Alemanha). A monitorização do bloqueio neuromuscular do adutor do polegar, pela estimulação do nervo ulnar, foi realizada com emprego do aparelho TOF Guard (Biometer, Dinamarca), que se baseia no método da aceleromiografia, utilizando-se a sequência de quatro estímulos (TOF). Utilizou-se em todos os pacientes aquecimento por convecção, com manta térmica específica Core Drape modelo 503-030 e o aparelho Warm Touch (Mallinkrodt Medical, EUA), após a indução da anestesia.

A indução anestésica foi realizada com o anestésico propofol (AstraZeneca, Itália), na dose de 2 mg.kg^{-1} IV de peso corporal, o opióide fentanil (Janssen, Brasil) IV ($5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) e brometo de rocurônio (Organon, Holanda) IV ($0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$), como bloqueador neuromuscular. A manutenção anestésica foi feita com o sevoflurano, utilizando-se 1,0 a 1,5 concentração alveolar mínima (CAM) (2%-3%), e reinjeções de fentanil ($2 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) e rocurônio $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, conforme a necessidade de cada paciente, de acordo, respectivamente, com os valores de pressão arterial e frequência cardíaca, e

com a relação de resposta à sequência de quatro estímulos do nervo ulnar, entre a primeira (T1) e quarta (T4) respostas. O fluxo de gases frescos usado consistiu de oxigênio ($0,8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) e ar ($1,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), e utilizou-se circuito semifechado com cal sodada para absorção de CO_2 e permutador de calor e umidade dotado de filtro bacteriano e viral entre o circuito respiratório e o tubo traqueal (Pall BB100; Pall Corporation, EUA). A fração inspirada de oxigênio (FiO_2) foi de 0,5, volume corrente de $8 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, e a $\text{P}_{\text{ET}}\text{CO}_2$ foi mantida de 30 a 40 mmHg por meio de alterações na frequência respiratória.

Após a indução anestésica, um sensor de temperatura foi introduzido no esôfago inferior para medida da temperatura central, utilizando-se um dos canais do termômetro elétrico Mon-a-Therm modelo 90044 (Mallinkrodt Medical, EUA) com dois canais de temperatura (Thermistor 400, Mallinkrodt Medical, EUA). O segundo canal foi utilizado para medida da temperatura na sala da SO, com sensor colocado próximo ao paciente, mas longe de fonte de calor.

Ao final da cirurgia, os pacientes receberam ou não reversão do bloqueio neuromuscular com atropina ($15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e neostigmina ($30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) IV, de acordo com o bloqueio neuromuscular observado pela monitorização.

A desintubação traqueal foi realizada somente nas situações de relação T4/T1 igual ou superior a 0,9, com o paciente apresentando resposta a estímulos verbais e com parâmetros ventilatórios dentro da normalidade.

A analgesia pós-operatória foi feita com tramadol (Janssen, Brasil) ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e dipirona (Hoesht, Brasil) ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) IV. Profilaxia de náuseas e vômitos foi obtida com uso de ondansetrona (Glaxo SmithKline, Brasil) (8 mg)

IV. Todos os pacientes foram encaminhados à Sala de Recuperação Pós-Anestésica, recebendo alta para o quarto sem intercorrências.

3.2 Momentos Estudados

Foram registrados após a medicação pré-anestésica e antes da indução anestésica (momento basal) os valores de pressões sistólica e diastólica (mm Hg), frequência cardíaca (bat/min), SpO₂ (%) e temperatura da sala de operação (°C). Os valores desses atributos, em conjunto com os da temperatura esofágica (°C), concentração expirada de sevoflurano (%) e P_{ET}CO₂ (mm Hg) foram também registrados após a indução anestésica e intubação traqueal (tempo 0 min), e nos tempos 30, 60 e 120 após a indução anestésica e ao final da cirurgia. Foram também registradas a duração (min) da cirurgia e o consumo de fentanil, rocurônio e sevoflurano.

3.3 Amostras de Sangue

Amostras de sangue venoso (4 mL) foram coletadas em tubos com anticoagulante EDTA dos indivíduos do grupo controle e dos pacientes do grupo SVF antes de receberem a medicação pré-anestésica (M1). Desses últimos, coletou-se mais três amostras, ou seja, 15 min após a indução da anestesia e imediatamente antes do início da cirurgia (M2), 120 minutos após a indução da anestesia (M3) e no 1º dia do pós-operatório, ao redor de 20 horas após o término da cirurgia (M4). Os tubos foram codificados para que não fosse identificado o momento ou o grupo do estudo.

3.4 Análise das Citocinas

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos imediatamente após a coleta e o plasma obtido foi aliquoteado e armazenado a -80°C , até o momento da análise.

O perfil das citocinas foi obtido seguindo protocolo do fabricante *BD Biosciences* por Citometria de Fluxo, com os kits *BD[®] CBA Human Inflammation* e *Human Th1/Th2* (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA). Foram analisadas as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ em citômetro *BD[®] FACSCalibur*, usando o programa *BD[®] Cytometric Bead Array Software*. A sensibilidade às citocinas oferecida pelo kit utilizado para IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ foi de 7,2; 2,6; 2,6; 2,4; 2,5; 3,6; 3,3; 1,9; 3,7 e 7,1 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Os kits *BD[®] CBA Human Inflammation* e *Human Th1/Th2* permitem a quantificação das citocinas utilizando seis diferentes populações de partículas. Essas partículas são marcadas com intensidades discretamente diferentes de *PerCP* (*peridinin chlorophileprotein*), cuja fluorescência é lida pelo canal FL3 em citômetro de fluxo. Cada população de partículas com determinada intensidade de fluorescência representa um analito (citocina) e é revestida com anticorpos de captura específicos para cada uma das citocinas. Devido à diferença na intensidade de fluorescência das partículas, todas puderam ser misturadas em um único tubo, quando da utilização de cada um dos kits e, assim, foram analisadas simultaneamente em uma mesma amostra de plasma (50 μL). As

citocinas analisadas e presentes nas amostras ligaram-se às partículas marcadas com PerCP para formação do complexo citocina-partícula. A detecção dos analitos foi realizada pela ligação desses complexos com os correspondentes anticorpos específicos conjugados com PE (*phycoerythrin*). Essa marcação proporciona sinais de fluorescência nas partículas apropriadas, os quais foram lidos em canal FL2.

Em cada experimento também foi utilizada uma curva padrão para cada citocina, que foi preparada a partir de amostra padrão contendo citocina humana liofilizada na concentração de 5000 pg.mL^{-1} . A partir dessa concentração, realizou-se diluição seriada até a concentração de 20 pg.mL^{-1} . Utilizou-se também controle negativo para a curva padrão (0 pg.mL^{-1}).

Os dados foram obtidos em utilizando-se o *software* BD[®] CellQuest[®]. Antes dessa etapa, foi realizada a calibração do aparelho com o *software* BD[®] FACSComp[®] (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA).

Para aquisição dos dados, foram contados 1800 eventos para cada amostra, que foram plotados em gráficos FL3 versus FL2, indicando as populações de partículas e as intensidades de fluorescência de cada citocina. A análise dos dados foi expressa em pg.mL^{-1} .

3.5 Análise Estatística

O número de indivíduos do estudo foi baseado em estudos anteriores (Guilliland *et al.*, 1997 e Goto *et al.*, 2000), que verificaram a necessidade de número de 10 a 12 pacientes anestesiados para detecção de diferenças

significativas das citocinas. Considerando-se que poderiam ocorrer “perdas” de amostras e/ou de pacientes durante a realização do estudo, 15 indivíduos em cada grupo foram estudados.

Para as variáveis antropométricas (idade, peso, altura e índice de massa corporal) utilizou-se o teste t de Student para comparação dos grupos. Para as variáveis qualitativas (gênero) utilizou-se o teste do qui-quadrado.

Para os atributos do intraoperatório (pressões arteriais, frequência cardíaca, temperaturas esofágica e da sala de operação, saturação periférica de oxigênio e sevoflurano e CO₂ expirados) que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, utilizou-se ANOVA, uma vez que o interesse foi estudar o efeito de momentos, no grupo sevoflurano, com os dados sendo expressos por média e desvio padrão.

Em relação aos valores das citocinas avaliadas, como os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos, e o teste de Friedman para comparar os momentos dentro do grupo de pacientes. Os dados foram expressos em medianas e quartis (1^a e 3^a).

Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

Os grupos não diferiram significativamente quanto a idade, peso, altura, índice de massa corpórea e gênero (Tabela 1). A Tabela 2 apresenta os dados relativos a tipo e duração das cirurgias, e às doses totais de anestésicos no grupo sevoflurano.

Tabela 1 – Valores demográficos e gênero dos indivíduos dos grupos estudados

Atributos	Grupo		Valor de p
	Controle	Sevoflurano	
Idade (anos)*	34 ± 11	28 ± 9	0,12
Peso (kg)*	63 ± 14,3	66 ± 11,1	0,48
Altura (cm*)	168 ± 12	167 ± 10	0,84
IMC (kg.m ⁻²)*	22 ± 4,8	24 ± 4,1	0,36
Gênero (M/F)**	6/9	8/7	0,47

* Valores expressos em média ± desvio padrão

** Valores expressos em distribuição de frequências

Tabela 2 – Tipo de cirurgia, duração da cirurgia, e doses totais de fentanil, brometo de rocurônio e sevoflurano no grupo sevoflurano

Tipo de cirurgia**	
timpanoplastia / septoplastia	8/7
Duração da cirurgia (min)*	204 ± 59
Dose de fentanil (µg)*	457 ± 90
Dose de rocurônio (mg)*	43 ± 8
Dose de SVF (ml)*	63 ± 24

* Valores expressos em média ± desvio padrão

** Valores expressos em distribuição de frequências

Os valores de temperatura da SO diminuíram significativamente após 120 min da indução anestésica ($p < 0,05$), enquanto os valores de temperatura esofágica aumentaram de forma não significativa ($p > 0,05$) (Tabela 3). Os valores de CO_2 expirado aumentaram significativamente no final da cirurgia em relação aos tempos 30 e 60 min após indução da anestesia (Tabela 3). Os valores de saturação periférica de O_2 não apresentaram diferença significativa ao longo do estudo. Os valores de concentração expirada de sevoflurano diminuíram significativamente no final das cirurgias em relação aos momentos 30 a 120 minutos ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores do intra-operatório segundo os momentos estudados no grupo sevoflurano

Atributo	Tempo (min) após a indução da anestesia						p
	Basal	0	30	60	120	Final	
T_{SO} (C°)	23,1±1,1ab	23,2±1ab	23,3±0,8a	22,9±0,9ab	22,3±1,0b	22,6±1,1ab	0,017
T_{ESOF} (C°)		35,5±3,3a	36,2±0,7	36,3±0,5a	36,7±0,6a	37±0,6a	0,06
P_{ETCO_2}		36±4ab	34±2b	34±2b	35±3ab	37±4a	0,017
SVF_{exp} (%)		1,9±0,4ab	2,2±0,5a	2,2±0,4a	2,3±0,5a	1,7±0,6b	0,03
SpO_2 (%)	97±1a	98±1a	97±3a	98±1a	98±1a	98±1a	0,19

Valores expressos em média \pm desvio-padrão; T_{SO} = temperatura da sala de operação; T_{ESOF} = temperatura esofágica;

P_{ETCO_2} = pressão expiratória final de CO_2 ; SEV_{exp} = concentração de sevoflurano expirado; SpO_2 = saturação periférica de O_2 ; Final= final da cirurgia.

Momentos representados por médias com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

Quanto aos parâmetros hemodinâmicos, não houve alteração significativa da frequência cardíaca, mas se observou diferença em relação à pressão arterial, tanto sistólica como diastólica, ao longo do procedimento anestésico, com redução de seus valores após a indução da anestesia (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores hemodinâmicos segundo os momentos estudados

Atributo	Tempo (min) após a indução da anestesia						Valor p
	Basal	0	30	60	120	Final	
PAS (mm Hg)	120 ± 10a	100 ± 9b	101 ± 10b	98 ± 13b	99 ± 12b	98 ± 11b	<0,001
PAD (mm Hg)	71 ± 8a	57 ± 11bc	56 ± 10bc	51 ± 7c	58 ± 15bc	64 ± 17ab	<0,001
FC (bat.min ⁻¹)	82 ± 16a	76 ± 15a	80 ± 10a	79 ± 13a	86 ± 15a	81 ± 19a	0,16

Valores expressos pela média ± desvio-padrão; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; FC = frequência cardíaca. Momentos representados por médias com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

Em relação à concentração das citocinas plasmáticas, na comparação entre voluntários e pacientes em M1, houve diferença significativa em relação a IL-4, com maiores valores nos pacientes (Figura 3), e IL-5, com maiores valores nos voluntários (Figura 4). As demais citocinas plasmáticas não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 5).

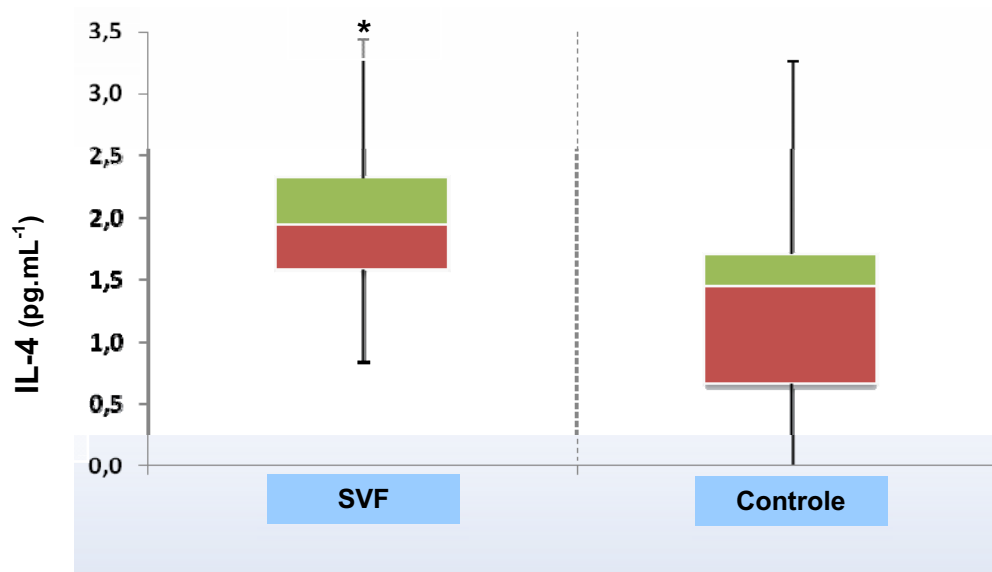


Figura 3 – Concentrações plasmáticas de IL-4 nos grupos SVF e C (M1).

* $p=0,02$: SVF > Controle

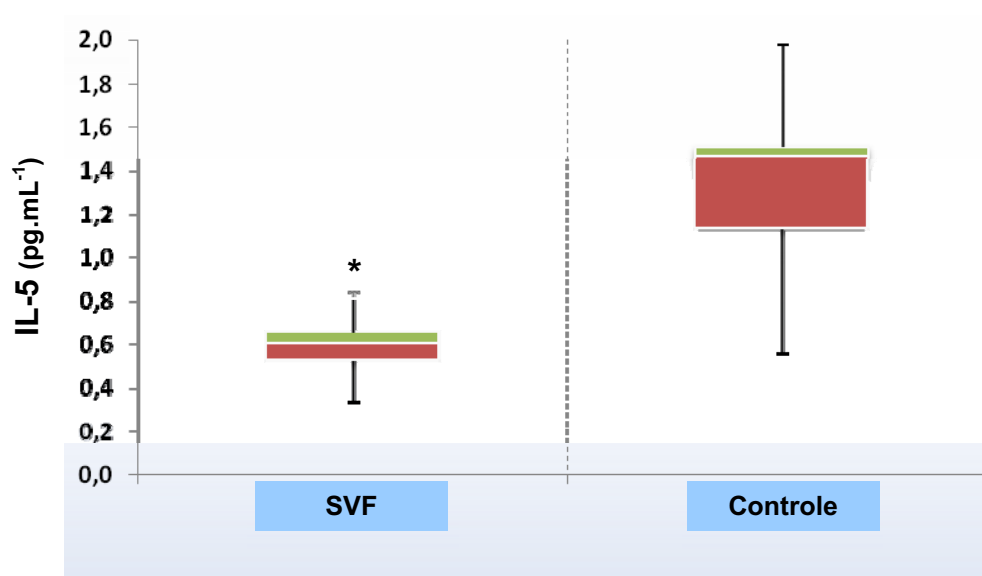


Figura 4 – Concentrações plasmáticas de IL-5 nos grupos SVF e C (M1).

* $p<0,001$: Controle > SVF

Tabela 5 – Valores plasmáticos (pg.mL⁻¹) das citocinas nos grupos estudados

Citocina	Grupo		Valor de p
	C	SVF	
IL-1 β	1,40 [1,10;1,50]	1,30 [1,12;1,49]	0,59
IL-2	1,44 [0,84;2,06]	1,32 [0,76;1,60]	0,65
IL-6	1,51 [1,18;2,30]	1,55 [1,42;1,64]	0,77
IL-8	2,22 [1,28;2,38]	2,35 [1,85;2,90]	0,08
IL-10	1,92 [1,70;2,12]	1,74 [1,22;2,08]	0,32
IL-12	0,00 [0,00;0,81]	0,00 [0,00;1,14]	0,47
TNF- α	1,19 [0,00;1,54]	1,20 [0,69;1,40]	0,59
INF- γ	2,55 [1,60;2,55]	2,21 [1,45;2,86]	0,71

Valores expressos em mediana, 1^o e 3^o quartis (entre colchetes).

C = controle; SVF = sevoflurano.

No grupo de pacientes, houve diferença significativa de IL-5 (Figura 5), com elevação em M3 (após 120 minutos da indução) em relação a M1, e de IL-6 no momento M4, ou seja, no dia seguinte ao do ato anestésico-cirúrgico, em relação aos momentos M1 e M2 (Figura 6). As demais citocinas plasmáticas não apresentaram diferença significativa de seus valores ao longo do experimento (Tabela 6).

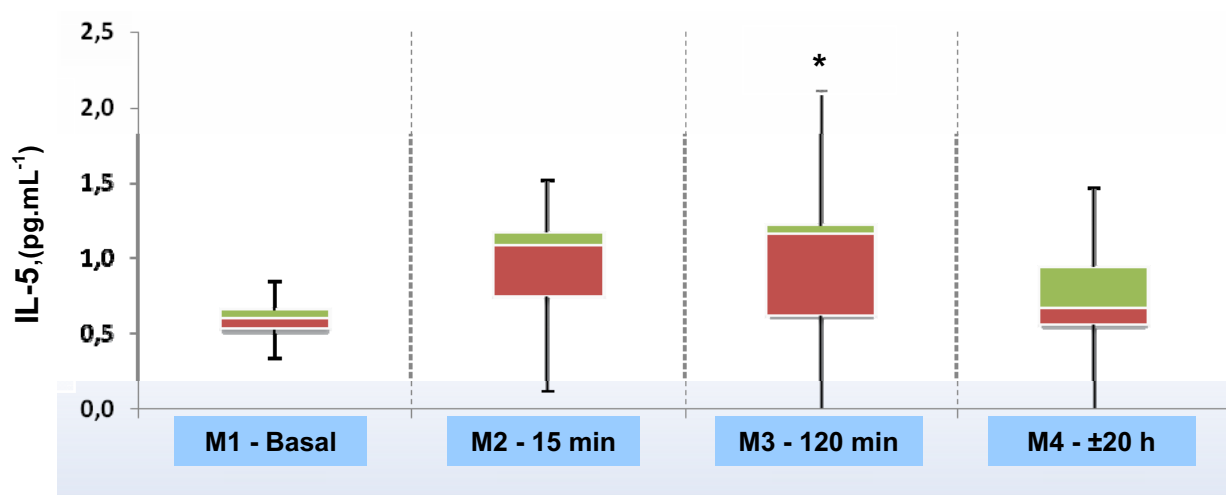


Figura 5 – Concentrações plasmáticas de IL-5 no grupo SVF.

* $p = 0,03$: M3 > M1.

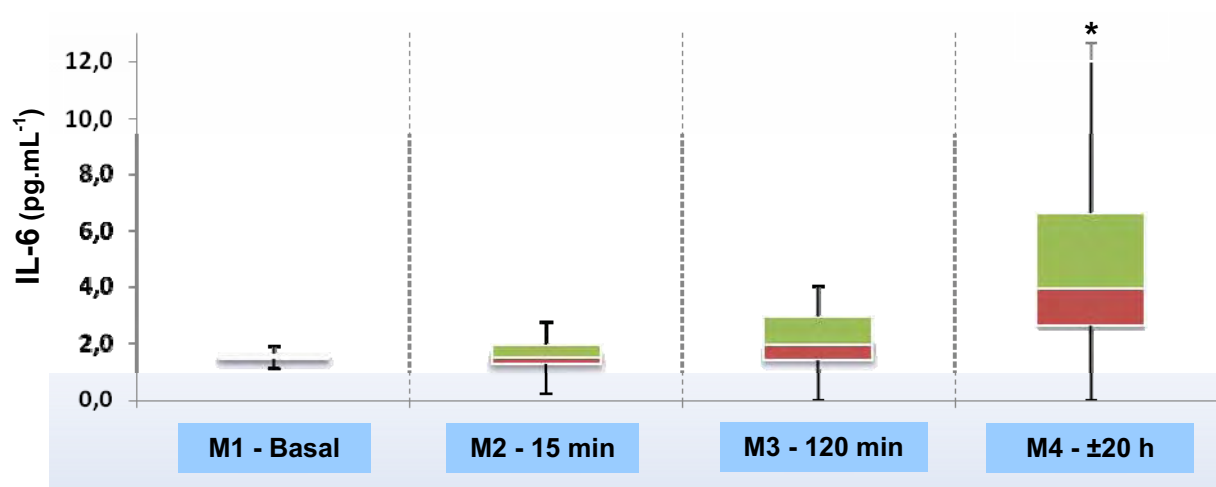


Figura 6 – Concentrações plasmáticas de IL-6 no grupo SVF.

* $p < 0,001$: M4 > [M1=M2].

Tabela 6 - Valores plasmáticos (pg.mL⁻¹) das citocinas no grupo sevoflurano

Citocina	Momento				Valor de p
	Basal (M1)	Antes da cirurgia (M2)	120 min após indução anestésica (M3)	1º dia do pós-operatório (M4)	
IL-1 β	1,30 [1,12;1,49]	1,30 [0,00;1,70]	1,40 [0,27;1,56]	1,43 [0,28;1,52]	0,94
IL-2	1,32 [0,76;1,60]	1,45 [1,05;1,66]	1,45 [0,89;1,98]	1,59 [1,47;1,68]	0,55
IL-4	1,94 [1,53;2,42]	1,31 [0,72;1,90]	1,75 [0,91;2,27]	1,54 [1,03;1,96]	0,23
IL-8	2,35 [1,85;2,90]	2,32 [1,79;3,68]	2,88 [2,01;4,13]	2,94 [2,49;3,82]	0,51
IL-10	1,74 [1,22;2,08]	1,64 [1,44;1,78]	1,56 [1,43;1,97]	1,98 [1,67;2,14]	0,13
IL-12	0,00 [0,00;1,14]	0,00 [0,00;1,60]	0,00 [0,00;1,28]	0,00 [0,00;1,36]	0,65
TNF- α	1,20 [0,69;1,40]	1,43 [0,85;1,82]	1,42 [0,94;1,77]	1,30 [0,76;1,51]	0,20
INF- γ	2,21 [1,45;2,86]	2,27 [1,20;3,15]	2,07 [1,27;2,86]	2,13 [1,62;2,74]	0,91

Valores expressos em mediana, 1^o e 3^o quartis (entre colchetes); p>0,05.

5 DISCUSSÃO

Os resultados em relação aos valores da pressão arterial durante a anestesia já eram esperados, com diminuição significativa de seus valores após a indução anestésica, mas que são considerados adequados para cirurgias otorrinológicas, a fim de se evitar a ocorrência de sangramentos excessivos no campo operatório, que prejudicam a realização das cirurgias propostas.

A ausência de alteração significativa da frequência cardíaca no intra-operatório possivelmente foi devida à manutenção de plano anestésico adequado durante as cirurgias e à utilização de brometo de rocurônio como bloqueador neuromuscular. Este fármaco é um composto de amônio quaternário, que difere do pancurônio e do vecurônio pela ausência de grupamento acetil-éster no núcleo esteroide. Apresenta pequeno potencial para liberação de histamina e determina fraco bloqueio vagal, com pequena ou nenhuma interferência na frequência cardíaca (Naguib *et al.*, 1995).

Os valores obtidos da temperatura ambiente, de 21 a 23°C, são considerados ideais para o conforto da equipe cirúrgica. Por outro lado, a temperatura relativamente baixa da SO, associada à vasodilatação produzida por alguns dos anestésicos utilizados, como propofol (Chiu & White, 2004) e sevoflurano (Eger, 1994; Ebert & Schmid, 2004), leva a perda de calor e tendência à hipotermia. Isso ocorre porque a vasodilatação determina aumento da circulação de sangue às camadas mais superficiais do corpo, como pele e tecido subcutâneo. Dessa forma, há desvio térmico do calor do compartimento

central, representado pelos órgãos ricamente vascularizados, para os tecidos periféricos, com diminuição significativa da temperatura central dos pacientes (Vanni *et al.*, 2003). Conseqüentemente, a temperatura central média de 35,5°C dos pacientes no tempo zero (após a indução anestésica) deveu-se à temperatura fria da SO, em combinação com os efeitos de redistribuição interna do calor após a indução anestésica.

O aumento, embora não significativo, da temperatura esofágica dos pacientes durante a realização das cirurgias, ocorreu devido aos cuidados que foram tomados, como o aquecimento da parte inferior do corpo e dos membros inferiores dos pacientes com manta aquecida, fazendo com que o calor periférico, aos poucos, fosse incorporado ao compartimento central (Vanni *et al.*, 2003). A manutenção da temperatura central durante a realização das cirurgias em valores próximos a 36°C também foi importante em relação ao perfil de citocinas, pois a hipotermia pode influenciar seus valores (Sheffield *et al.*, 1994; Kurz *et al.*, 1996).

Deve-se ressaltar que não se determinou a temperatura central antes da indução da anestesia, mas apenas após a indução anestésica e a intubação traqueal. A passagem do sensor esofágico para determinação da temperatura central seria extremamente desconfortável no paciente acordado.

A $P_{ET}CO_2$ durante a realização das cirurgias foi mantida em valores adequados. Somente ao final das cirurgias seus valores aumentaram significativamente devido ao fato de que alguns pacientes já respiravam espontaneamente, mas ainda estavam se recuperando do estado anestésico. Normalmente os pacientes não apresentam volume-minuto adequado ao final

da cirurgia, o que ocasiona retenção de CO₂, com aumento consequente da P_{ET}CO₂.

Os valores da concentração de SVF mantiveram-se como desejado, entre 1 e 1,5 CAM. Somente ao final da cirurgia seus valores foram menores, abaixo de 1 CAM, como esperado, devido ao término da cirurgia.

Para a quantificação das citocinas plasmáticas foi escolhida a técnica de Citometria de Fluxo, utilizando a tecnologia *Cytometric Bead Array* (CBA) que, em relação ao tradicional ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), apresenta a vantagem de realizar as dosagens simultâneas das citocinas, reduzindo o volume necessário de amostra e com sensibilidade comparável à oferecida pelo ELISA (Chen *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2004; Elshal *et al.*, 2006).

Em relação aos valores plasmáticos das citocinas, houve diferença significativa de IL-4 entre os grupos no momento basal, com valores maiores no grupo de pacientes. Como a IL-4 tem suas funções diretamente relacionadas à resposta alérgica, atuando como fator de diferenciação de linfócitos T *helper* imaturos em linfócitos Th2, envolvidos com a imunidade humoral, é considerada a citocina com maior influência sobre a produção de IgE por células B ativadas (Sheeran & Hall, 1997; Sutherland *et al.*, 2009).

No grupo de pacientes, vários indivíduos foram submetidos a septoplastia, com provável prevalência de atopias e hipertrofia de cornetos, eventualmente ligadas à etiologia da obstrução parcial do fluxo aéreo nasal, e causa das queixas desses indivíduos. Assim, talvez uma maior prevalência de atopias (levando a rinite) entre os pacientes possa ser a

explicação para os valores mais elevados de IL-4, pois indivíduos alérgicos apresentam alteração do balanço Th1/Th2, com predomínio de linfócitos Th2 e elevação dos valores plasmáticos de IL-4 (Sutherland *et al.*, 2009).

Observou-se entre os grupos diferença significativa também em relação à IL-5 no momento basal, com menores valores no grupo de pacientes, ao contrário do que, a princípio, se esperaria encontrar nos indivíduos alérgicos, pois é descrita a elevação também de IL-5 e IL-13 nessa população, devido ao fato de apresentarem desbalanço Th1/Th2 e predomínio de linfócitos Th2 (Sheeran & Hall, 1997).

Por outro lado, resultados semelhantes aos do presente estudo foram relatados por Sutherland *et al.* (2009), que estudaram os efeitos do estresse agudo sobre a fisiologia e o comportamento de camundongos asmáticos. Esses autores encontraram maiores valores de IL-5 em animais alérgicos estressados e não estressados, na comparação com outros não alérgicos. Porém verificaram menores valores de IL-5 em animais alérgicos submetidos a estresse físico e psicológico, em relação aos encontrados em camundongos não alérgicos e não estressados, como o grupo controle desse estudo. Atribuem esse efeito ao fato de que a resposta ao estresse depende do *status* alérgico do animal. Tanto a alergia como o estresse levam a uma resposta de Th2, e o estresse reduz a IL-5 em camundongos alérgicos mas não nos não alérgicos.

Entre os pacientes, as concentrações de IL-5 obtidas após a indução anestésica apresentaram elevação, atingindo valor máximo com diferença significativa após 120 minutos da indução anestésica, em relação ao basal, e

retorno a valores semelhantes aos pré-anestésicos no pós-operatório. Porém, ainda assim, os valores de IL-5 ficaram abaixo da média apresentada pelos voluntários. Dessa forma, a elevação de IL-5 nos pacientes expostos ao fator anestésico-cirúrgico, em relação ao primeiro momento, ocorreu porque os valores iniciais apresentados eram baixos, inferiores aos dos voluntários. A diferença de valores de IL-5 deveu-se, portanto, aos valores médios baixos no momento basal entre os pacientes, em relação ao momento do intraoperatório, esse então semelhante ao dos indivíduos não expostos.

Houve elevação significativa de IL-6 entre os momentos pré (M1 e M2) comparados ao momento pós-cirúrgico (M4), como pode de fato ocorrer como consequência do trauma tecidual induzido pelo procedimento cirúrgico. Ao lado de TNF- α e IL-1 β , a IL-6 é considerada uma das principais citocinas pró-inflamatórias (Kurosawa, 2008).

A elevação das citocinas inflamatórias está intimamente relacionada ao trauma, mas por sua natureza biológica, não tem como ser instantânea, demandando tempo para síntese e liberação de moléculas protéicas, o que resulta em nível plasmático crescente nas primeiras horas após a agressão tecidual. No caso de IL-6, é esperada elevação significativa da concentração plasmática após 2 a 4 horas do estímulo (Sheeran & Hall, 1997). Além disso, níveis elevados de IL-6 atuam rapidamente como *feedback* negativo sobre as células responsáveis por sua síntese e liberação, sobretudo nos monócitos (Sheeran & Hall, 1997).

Desborough *et al.* (2000) observaram aumento da concentração plasmática de citocinas inflamatórias em procedimentos cirúrgicos de médio e

grande portes, demonstrando inclusive a estreita relação entre intensidade de trauma tecidual e a invasão de cavidades, principalmente a peritoneal, e a magnitude da elevação de IL-6 e IL-8.

Uma vez que o presente estudo teve como objetivo investigar a ação do anestésico halogenado sevoflurano, optou-se deliberadamente por procedimentos cirúrgicos considerados pouco invasivos, procurando minimizar a influência do trauma tecidual na elevação das citocinas. Cirurgias oftalmológicas e otorrinolaringológicas são consideradas de pequeno porte, e, de fato, apresentam menor elevação de citocinas, sobretudo das pró-inflamatórias (Goto *et al.*, 2000).

Dessa forma, a elevação de IL-6, considerado o mais sensível marcador da resposta inflamatória (Goto *et al.*, 2000) e o principal sinalizador da resposta aguda instalada (Cheng, 2005), mas não de IL-1 β e TNF- α , indica êxito do método escolhido em minimizar a influência da cirurgia sobre a resposta inflamatória.

Os resultados obtidos na presente pesquisa em relação aos valores de IL-6 foram semelhantes aos de Goto *et al.* (2000). Esses autores estudaram pacientes idosos, ASA I e II (pacientes que apresentam distúrbio sistêmico brando a moderado que pode não ser relacionado ao motivo da cirurgia) (Fleisher, 2004), submetidos a cirurgia de catarata sob anestesia retrobulbar com anestésico local ou sob anestesia inalatória com sevoflurano (0,5%-1,5%). Coletaram amostras de sangue antes do ato anestésico-cirúrgico e após 1, 8 e 24 horas da cirurgia, para dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Observaram, no grupo SVF e não no grupo sob anestesia retrobulbar, aumento

significativo apenas de IL-6 após 8 e 24 horas da cirurgia. A ausência de aumento de IL-6 no grupo submetido ao bloqueio retrobulbar com anestésico local possivelmente ocorreu devido ao bloqueio da aferência de estímulo nociceptivo ao sistema nervoso central (Desborough *et al.*, 2000; McGoldrick *et al.*, 2004). O anestésico local pode interromper completamente a condução do estímulo doloroso, impedindo que a informação da ocorrência de trauma tecidual alcance o SNC ou o SAS, e ative o eixo HPA. Isso explicaria a manutenção da concentração plasmática de IL-6 no pós-operatório nesse grupo, e a elevação no grupo SVF. Dessa forma, segundo os autores, não foi possível atribuir a elevação de IL-6 encontrada no grupo do sevoflurano ao anestésico utilizado, mas sim ao trauma tecidual decorrente do ato cirúrgico.

Assim, a elevação de IL-6 no presente estudo, tendo ocorrido de forma significativa apenas no pós-operatório, ou seja, após 20 horas do procedimento anestésico-cirúrgico, corrobora a hipótese de estar relacionada à reparação tecidual pós-operatória e síntese hepática de proteínas de fase aguda (Kurosawa, 2008).

Alguns fármacos utilizados na anestesia também apresentam influência direta sobre a modulação da resposta ao estresse, exercendo efeitos na imunidade celular e neurohumoral, à medida que são capazes de alterar funções de células imunocompetentes, além da expressão de genes responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios. Esse é o caso dos opióides, como o fentanil, que ao se ligarem aos receptores presentes na membrana de monócitos, modulam a liberação de mediadores como as citocinas, podendo influenciar a resposta imunológica (Wu, 2009).

Guilliland *et al.* (1997) demonstraram redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α pelo emprego do fentanil, e aumento de citocinas consideradas anti-inflamatórias, como a IL-10, pelo propofol, quando usado em infusão prolongada, para manutenção da anestesia. O propofol apresenta estrutura molecular muito semelhante ao do alfa-tocoferol (vitamina E), um potente antioxidante que pode inibir o fator de transcrição nuclear kappa B, que, por sua vez, pode reduzir a síntese de citocinas inflamatórias (Sanchez-Conde *et al.*, 2008).

Mazoti (2010) comparou o perfil das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α e da anti-inflamatória IL-10 no plasma de pacientes hígidos, submetidos a cirurgias otorrinológicas pouco invasivas, sob anestesia mantida com propofol em infusão alvo-controlada ou isoflurano (1,0 a 1,5 CAM) e doses moderadas de fentanil. Observou elevação de IL-6 após 120 minutos da indução anestésica e no primeiro dia de pós-operatório no grupo isoflurano e somente no pós-operatório no grupo propofol. Além disso, observou elevação de IL-8 apenas no grupo propofol, também apenas no pós-operatório. A autora atribuiu à ação antioxidante do propofol a não elevação de IL-6 e IL-8, já no intra-operatório.

Esses dados da literatura foram considerados no desenho do método do presente estudo, e procurou-se empregar doses consideradas moderadas de fentanil e pequenas de propofol, visando minimizar a ocorrência de viés que elevadas doses do opióide ou propofol poderiam representar no perfil de citocinas (Guilliland *et al.* 1997; Wu, 2009).

Deloglu *et al.* (2005) estudaram o perfil de IL-10 em 32 pacientes ASA I e II submetidos a cirurgias de grande porte (vascular, torácica e gastrointestinal) sob anestesia com propofol (n=15) em infusão alvo-controlada e fentanil ($3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ inicial e reinjeções quando necessário) e sevoflurano (n=17) na concentração de 1% a 3%, após indução anestésica com tiopental. Observaram aumento significativo e crescente de IL-10 no final da cirurgia e após 24 horas do ato anestésico-cirúrgico, mas sem diferença significativa entre os grupos. Os autores atribuíram o aumento dessa citocina à expansão da população de linfócitos Th2, na qual se inclui IL-10, em relação às células Th1 e a outros fatores como perda sanguínea, hormônios de estresse, fármacos anestésicos e, possivelmente, à linfocitopenia induzida por apoptose (Kato *et al.*, 1998; Deloglu *et al.*, 2001).

De forma semelhante aos resultados por nós encontrados, Schneemilch & Bank (2001) em cirurgias de coluna lombar (discectomia) realizadas em pacientes sob anestesia com SVF, não observaram alterações nas concentrações plasmáticas de IL-2, IL-10, IL-12 e IFN- γ durante e após o ato anestésico-cirúrgico. Porém diferentemente dos nossos resultados, os autores observaram aumento de IL-6 já no intra-operatório e no pós-operatório.

Kawamura *et al.* (2006) compararam o efeito do propofol ($2-8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e do sevoflurano (0,5%-1%) na manutenção da anestesia em cirurgias de revascularização miocárdica com CEC. Observaram inibição da elevação de IL-6 e IL-8 pelo SVF, mas não de IL-10, concluindo que a utilização do halogenado poderia ser útil para reduzir a intensidade da lesão pós isquemia e reperfusão da CEC, que é atribuída à IL-8 (Finn *et al.*, 1993).

Também foi demonstrada em estudo anterior a possível influência dos agentes halogenados SVF e desflurano na resposta inflamatória, sugerida pela elevação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em cirurgias de pequeno porte não invasivas (Koksal *et al.*, 2005). Esses autores estudaram 60 pacientes de 22 a 60 anos, ASA I e II submetidos a cirurgia de timpanoplastia sob anestesia com sevoflurano (n=30) ou desflurano (n=30). A indução anestésica em ambos os grupos foi feita com propofol (2 mg.kg⁻¹), fentanil (1 μ g.kg⁻¹) e besilato de atracúrio (0,5 mg.kg⁻¹). A anestesia foi mantida com 1-1,5 CAM dos halogenados e doses adicionais de 50 μ g de fentanil. Vinte minutos após a indução da anestesia, mas antes do início da cirurgia, houve aumento de IL-6 e TNF- α de forma significativa nos dois grupos, mas sempre maior no grupo do desflurano, que também nesse momento apresentou elevação de IL-1 β . No final da cirurgia houve aumento das três citocinas estudadas, mas sempre em maior proporção com o desflurano. Na pesquisa, os autores utilizaram doses extremamente baixas de fentanil, equivalente a cerca de 20% da empregada no presente estudo. Fentanil é o fármaco responsável por atenuar a resposta à agressão representada pelos estímulos de laringoscopia e intubação traqueal, que são superiores, inclusive, aos da incisão da pele (Shafer, 2008). A falta de antinocicepção oferecida por dose inadequada do opióide pode ter sido a causa da elevação de citocinas observada nesse estudo. Também não se pode deixar de destacar que esse estudo foi realizado em pacientes mais idosos e com alterações sistêmicas (ASA II) que podem justificar a diferença de resultados em relação à presente pesquisa.

Uma pesquisa procurou correlacionar a relação entre hormônios de estresse e a liberação de IL-6 durante cirurgias de histerectomia abdominal em mulheres de 18 a 65 anos, ASA I e II, sob duas técnicas de anestesia geral intravenosa total com propofol / remifentanil ou inalatória com sevoflurano / N₂O (Ihn *et al.*, 2009). Os autores verificaram aumento significativo de cortisol, adrenalina e noradrenalina plasmáticos nos momentos pós-intubação traqueal, após incisão cirúrgica e após desintubação traqueal no grupo do inalatório, em comparação à intravenosa. No entanto, houve em ambos os grupos aumento significativo de IL-6 após a desintubação traqueal em relação ao momento basal (antes da indução da anestesia) e diminuição significativa dessa citocina no grupo intravenosa após a intubação em relação ao momento basal. Os autores concluem que a anestesia intravenosa, em relação à inalatória com SVF determina menor resposta associada ao estresse mas não da resposta inflamatória (IL-6).

Mitsuhata *et al.* (1995) investigaram *in vitro* a exposição de células NK, sensibilizadas por antígenos tumorais, aos anestésicos voláteis enflurano, isoflurano e SVF, em concentrações de 1,5 a 2,5 CAM, e demonstraram inibição da liberação de IL-1 β e TNF- α , mas não de IL-2, em todos os grupos de estudo.

Estudo de El Azab *et al.* (2002) comparou os valores plasmáticos das citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α de 30 pacientes alocados em três grupos, submetidos a manutenção de anestesia geral com propofol sob infusão contínua e doses mínimas de sufentanil (0,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), SVF e sufentanil (doses em bolus de 0,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e infusão contínua de 0,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e midazolam com

doses moderadas de sufentanil ($2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e infusão contínua de $1 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Demonstrou diferença significativa, com valores maiores apenas de IL-6 em relação aos demais grupos até o início da CEC, no grupo que recebeu o halogenado. Nos três grupos, após o desclampeamento aórtico e no pós-operatório, houve elevação significativa de IL-6 e IL-8, sem diferença significativa entre os grupos. Entretanto, os autores realizaram o estudo em cirurgias de revascularização miocárdica, procedimento considerado de grande porte, e que por si só determina grande trauma tecidual e reação inflamatória, o que pode justificar a diferença de resultados entre esse estudo e o nosso.

Em relação a IL-8, Tylman *et al.* (2010) estudaram pacientes portadores de câncer colorretal submetidos a anestesia intravenosa total com propofol / remifentanil ($n=25$) ou inalatória com SVF e fentanil ($1-2 \mu\text{g.kg}^{-1}$) ($n=21$) e, em ambos os grupos, anestesia peridural contínua com bupivacaína e fentanil. Encontraram aumento de IL-8 plasmática 30 minutos e 24 horas após o final da cirurgia, mas não no intra-operatório, sem diferença significativa entre os grupos. Segundo os autores, os resultados obtidos não confirmam a hipótese inicial do estudo, de que a anestesia intravenosa total levasse a menor resposta inflamatória em relação à inalatória

A ausência de alteração significativa dos valores da maioria das citocinas estudadas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ) tanto no intra como no pós-operatório indica que o sevoflurano, por si só, praticamente não altera o perfil das citocinas, o que pode ter importância na prática clínica.

Deve-se considerar que o manuseio anestesiológico pode influenciar o processo inflamatório intra e pós-operatório. Esses aspectos devem ser

considerados relevantes especialmente nas intervenções cirúrgicas realizadas em pacientes com doenças associadas, que podem ocasionar disfunções imunológicas.

6 CONCLUSÃO

Em pacientes adultos com estado físico ASA I submetidos a cirurgias de timpanoplastia ou septoplastia, a anestesia com sevoflurano, com exceção de aumento de IL-5 no intraoperatório e de IL-6 no pós-operatório, não altera o perfil das citocinas inflamatórias e de perfil Th1/Th2.

7 REFERÊNCIAS

Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crouther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro K. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem*. 1999; 45:1693-4.

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

Chiu JW, White P. Anestesia venosa não-opióide. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Anestesia Clínica*. 4ª. ed. São Paulo: Manole; 2004. p.327-44.

De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Velde A, Figdor C, et al. Interleukin10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991; 174:915-24.

Delogu G, Antonucci A, Signore M, Marandola M, Tellan G, Ippoliti F. Plasma levels of IL-10 and nitric oxide under two different anaesthesia regimens. *Eur J Anaesthesiol*. 2005; 22:462-6.

Deloglu G, Famularo G, Moretti S, De Luca A, Tellan G, Antonucci A, Marandola M, Signore L. Interleukin-10 and apoptotic death of circulating lymphocytes in surgical anesthesia trauma. *J Trauma* 2001; 51:92-7.

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

Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*. 1998; 16:457-99.

Ebert TJ, Schmid PG. Anestesia inalatória. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Anestesia Clínica*. 4ª. ed. São Paulo: Manole; 2004. p.377-419.

Eger EI II. New inhaled anesthetics. *Anesthesiology*. 1994; 80:906-22.

El Azab SR, Rosseel PMJ, De Langue JJ, Van Wijk EM, Van Strik R, Scheffer GJ. Effect of VIMA with sevoflurane versus TIVA with propofol or midazolam-sufentanil on the cytokine response during CABG surgery. *Eur J Anaesthesiol.* 2002; 19:276-82.

Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods.* 2006; 38:317-23.

Finn A, Naik S, Klein N. Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 105:234-41.

Fleisher LA. Avaliação pré-operatória. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Anestesia clínica.* 4ª. ed. São Paulo: Manole; 2004. p.969-88.

Frankenstein Z, Alon U, Cohen IR. The immune-body cytokine network defines a social architecture of cell interactions. *Biol Direct.* 2006; 1:1-15.

Goto Y, Ho SL, McAdoo J, Fanning NF, Wang J, Redmond HP, et al. General versus regional anaesthesia for cataract surgery: effects on neutrophil apoptosis and postoperative pro-inflammatory state. *Eur J Anaesthesiol.* 2000; 17:474-80.

Gough DB, Moss NM, Jordan A, Grbic JT, Rodrick ML, Mannick JA. Recombinant interleukin-2 (rIL-2) improves immune response and host resistance to septic challenge in thermally injured mice. *Surgery.* 1988; 104: 292-300.

Guilliland HE, Armstrong MA, Carabine U, Terence J, McMurray TJ. The choice of anesthetic maintenance technique influences the antiinflammatory cytokine response to abdominal surgery. *Anaesth Analg.* 1997; 85:1394-8.

Hall GM, Ali W. The stress response and its modification by regional anaesthesia. *Anaesthesia.* 1998; 53:10-2.

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

Ihn CH, Joo JD, Choi JW, Kim DW, Jeon YS, Kim YS, Jung HS, et al. Comparison of stress hormone response, interleukin-6 and anaesthetic characteristics of two anaesthetic techniques: volatile induction and maintenance of anaesthesia using sevoflurane versus total intravenous anaesthesia using propofol and remifentanyl. *J Int Med Res.* 2009; 37:1760-71.

Kato M, Honda I, Suzuki H, Murakami M, Matsukawa S, Hashimoto Y. Interleukin-10 production during and after upper abdominal surgery. *J Clin Anaesth* 1998; 10: 184-8.

Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, Kaise A, Suzuki H, Endo S, et al. Effects of sevoflurano on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Card Vasc Anesth*. 2006; 20:503-8.

Kehlet H. Surgical stress response: does endoscopic surgery confer an advantage? *World J Surg*. 1999; 23:801-7.

Kohl BA, Deutschman CS. The inflammatory response to surgery and trauma. *Curr Opin Crit Care*. 2006; 12:325-32.

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

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

Kraychete DC, Sakata RK, Issy AM, Bacellarv O, Santos-Jesus R, Carvalho EM. Serum cytokine in patients with chronic low back pain due to herniated disc: analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*. 2010; 128:259-62.

Kudoh A, Katagai H, Takazawa T, Matsuki A. Plasma proinflammatory cytokine response to surgical stress in elderly patients. *Cytokine*. 2001; 15:270-3.

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

Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. *N Engl J Med*. 1996; 334:1209-15.

Mazoti MA. Perfil de citocinas inflamatórias em indivíduos submetidos a procedimentos cirúrgicos utilizando propofol ou isoflurano. Botucatu: [s.n.]; 2010.

Matata BM, Sosnowski AW, Galinanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg.* 2000; 69:785-91.

McGoldrick KE. Anestesia e o olho. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Anestesia clínica.* 4ª. ed. São Paulo: Manole; 2004. p.969-88.

Mitsuhata H, Shimizu R, Yokohama MM. Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol.* 1995; 17:529-34.

Moore KW, de Wall MR, Coffman RL, O'Gara A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:683-765.

Morgan E, Varro R, Sepulveda H. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol.* 2004; 110:252-66.

Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:145-73.

Naguib M, Samarkonde AH, Bokhamees HS, Magboul MA, el-Bakry AK. Comparative potency of steroidal muscular blocking drugs and isobolographic analysis of the interaction between rocuronium and other aminosteroids. *Br J Anaesth.* 1995; 75:37-42.

Niuro H, Otsuka T, Kuga S, Nemoto Y. IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Intern Immun.* 1994; 6:661-4.

Opal SM, Depalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 117:1162-72.

Patrick DA, Moore FA, Moore EE, Biffi WL, Sauaia A, Barnett Jr CC. The inflammatory profile of interleukine-6, interleukine-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in post-injury multiple organ failure. *Am J Surg.* 1996; 172:425-31.

Salo M, Pirttikangas CO, Pulkki K. Effects of propofol emulsion and thiopentone on T helper cell type 1 /type 2 balance in vitro. *Anesthesia.* 1997; 52:341-5.

Sanchez-Conde P, Rodriguez-Lopez JM, Nicolas JL, Lozano FS, Garcia-Criado FJ, Cascajo C, et al. The comparative abilities of propofol and sevoflurane to modulate

inflammation and oxidative stress in the kidney after aortic cross-clamping. *Anesth Analg*. 2008; 106:371-8.

Shafer SL, Stanski DR. Defining depth of anesthesia. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Heidelberg: Springer; 2008. p.409-23.

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

Sheffield CW, Sessler DI, Hunt TK. Mild hypothermia during isoflurane anesthesia decreases resistance to *E. coli* dermal infection in guinea pigs. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1994; 38:201-5.

Schietroma M, Carlu F, Mownah A, Franchi L, Mazzota C, Sozio A, et al. Changes in the blood coagulation, fibrinolysis and cytokine profile during laparoscopic and open cholecystectomy. *Surg Endosc*. 2004; 18:1090-6.

Schneemilch CE, Bank U. Release of pro and anti-inflammatory cytokines during different anesthesia procedures. *Anaesthesiol Reanim* 2001; 26: 4-10.

Schneemilch CE, Schilling T, Bank U. Effects of general anaesthesia on inflammation. *Baillieres Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004; 18:493-507.

Snyder GL, Greenberg S. Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *Br J Anaesth*. 2010; 105:106-15.

Stephens A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: A review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2007; 21:901-12.

Sutherland MA, Shome GP, Hulbert LE, Krebs N, Wachtel M, McGlone JJ. Acute stress affects the physiology and behavior of allergic mice. *Physiol Behav* 2009; 98: 281-87.

Takaono M, Yogosawa T, Okawa-Takatsuji M. Effects of intravenous anesthetics on interleukin (IL)-6 and IL-10 production by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear cells from healthy volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2002; 46:176-9.

Tsuchiya M, Sato EF, Inoue M, Asada A. Open abdominal surgery increases intraoperative stress: can it be prevented? *Anaesth Analg*. 2008, 107:1946-52.

Tylman M, Sarbinowski R, Bengston JP, Kvarnström A, Bengtsson A. Inflammatory response in patients undergoing colorectal cancer surgery: the effect of two different anesthetic techniques. *Minerva Anestesiologica* 2010; 76: 1-8.

Vanni SM, Braz JRC, Módolo NSP, Amorin RB, Rodrigues Jr GR. Preoperative combined with intraoperative skin-surface warming avoids hypothermia caused by general anesthesia and surgery. *J Clin Anesth.* 2003, 15:119-25.

Von Dossow V, Baur S, Sander M, Tonnesen H, Marks C, Paschen C, et al. Propofol increased the interleukin-6 to interleukin-10 ratio more than isoflurane after surgery in long-term alcoholic patients. *J Int Med Res.* 2007; 35:395-405.

Wan S, Izzot MB, Lee TW, Wan IYP, Tang NLS, Yim APC. Avoiding cardiopulmonary bypass in multivessel CABG reduces cytokine response and myocardial injury. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68:52-7.

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

8 ANEXOS

8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente

I. Identificação do paciente

RG hospitalar: _____

Nome:		
Endereço:		
Cidade:		Bairro:
CEP:	Estado:	Telefone:

II. Título da Pesquisa: **Avaliação do perfil de citocinas no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia inalatória com sevoflurano**

Pesquisador-Responsável: José Reinaldo Cerqueira Braz, Professor Titular do Departamento de Anestesiologia – Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu - SP. Telefone (14) 3811-6222; e-mail: jbraz@fmb.unesp.br

III. Explicações do pesquisador ao paciente

Este estudo, que será realizado em pacientes que serão submetidos a cirurgias de nariz ou ouvido tem como objetivo avaliar se o anestésico sevoflurano, que será utilizado na cirurgia, tem algum efeito sobre o sistema imunológico. Será avaliado se esse anestésico pode alterar o estado inflamatório do organismo. O estudo não trará danos ao paciente, pois será utilizado anestésico normalmente empregado em anestésias gerais no Hospital das Clínicas. Desta forma, solicitamos seu consentimento para que sejam coletadas 4 amostras de 4 mL de sangue periférico: a primeira, antes da anestesia, a segunda antes da cirurgia; a terceira no final da cirurgia; e a última, no dia após a cirurgia (pós-operatório). A quantidade de sangue que será coletada não afetará sua recuperação pós-cirúrgica, e a quantia é muito pequena em relação ao volume total de sangue do organismo. A coleta será realizada por profissional experiente, e o procedimento causa apenas o desconforto da picada com risco mínimo ou quase inexistente, já que será utilizado material estéril e

descartável. Será realizado, também, um questionário sobre seu estilo de vida e história médica; todas as informações são de caráter confidencial e sua identidade será preservada. O pesquisador responsável por este estudo, sempre que solicitado, estará à disposição para esclarecer qualquer questão relacionada à pesquisa. Além disso, o paciente, a qualquer momento, terá total liberdade de recusar ou retirar seu consentimento e sair desta pesquisa, sem que isso lhe traga qualquer tipo de prejuízo. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, mas sempre preservando a identidade do paciente. Ressaltamos, também, que nem os pesquisadores e nem o paciente receberão qualquer remuneração financeira para participar desta pesquisa.

IV. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que podem resultar do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de paciente, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura _____

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário

I. Identificação do voluntário

RG hospitalar: _____

Nome:		
Endereço:		
Cidade:		Bairro:
CEP:	Estado:	Telefone:

II. Título da Pesquisa: **Avaliação do perfil de citocinas no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia inalatória com sevoflurano**

Pesquisador-Responsável: José Reinaldo Cerqueira Braz, Professor Titular do Departamento de Anestesiologia – Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu - SP. Telefone (14) 3811-6222; e-mail: jbraz@fmb.unesp.br

III. Explicações do pesquisador ao indivíduo voluntário

Este estudo, que será realizado em pacientes que serão submetidos a cirurgias de nariz ou ouvido, tem como objetivo avaliar se o anestésico sevoflurano, que será utilizado na cirurgia, tem algum efeito sobre o sistema imunológico. Será avaliado se esse anestésico pode alterar o estado inflamatório do organismo. O estudo não trará danos ao paciente, pois será utilizado anestésico normalmente empregado em anestésias gerais no Hospital das Clínicas. Para que os resultados obtidos sejam confiáveis, há necessidade de analisar também o sangue de pessoas voluntárias que tenham características semelhantes às dos pacientes que participarão do estudo, quanto a hábitos, estado de saúde, atividade profissional, entre outras. Desta forma, solicitamos seu consentimento para que seja coletada 1 única amostra de 4 mL de sangue de uma veia de seu braço. A amostra de sangue que será coletada não afetará sua saúde, pois a quantia é muito pequena em relação ao volume total de sangue do organismo. A coleta será realizada por profissional experiente, e o

procedimento causa apenas o desconforto da picada, com risco mínimo ou quase inexistente, já que será utilizado material estéril e descartável. Será realizado, também, um questionário sobre seu estilo de vida e história médica; todas as informações são de caráter confidencial e sua identidade será preservada. O pesquisador responsável por este estudo, sempre que solicitado, estará à disposição para esclarecer qualquer questão relacionada à pesquisa. Além disso, o voluntário, a qualquer momento, terá total liberdade de recusar ou retirar seu consentimento e sair desta pesquisa, sem que isso lhe traga qualquer tipo de prejuízo. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, mas sempre preservando a identidade do paciente. Ressaltamos, também, que nem os pesquisadores, nem os pacientes, nem o voluntário receberão qualquer remuneração financeira para participar desta pesquisa.

IV. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre o eventual desconforto da coleta de pequena quantidade de sangue, assim como sobre os benefícios que podem resultar do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de **voluntário**, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura _____

8.3 Questionário

Avaliação do perfil de citocinas no plasma de pacientes submetidos a cirurgia sob anestesia inalatória com sevoflurano

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

12-Come frutas? () sim () não

13-Se sim, com que frequência?

14-Come verduras? () sim () não

15- Se sim, com que frequência?

16-Come carboidratos? () sim () não

- 17-Se sim, com que frequência?
- 18-Come frituras? () sim () não
- 19-Se sim, com que frequência?
- 20-Faz exercícios regularmente? () sim () não
- 21-Se sim, qual tipo (musculação, caminhada, etc)?
- 22-Se sim, quantas vezes por semana?
- 23-Fuma? () sim () não
- 24-Se sim, há quanto tempo?
- 25-Quantos cigarros/dia?
- 26-Qual tipo (cachimbo, charuto, palha, papel com filtro, etc)?:
- 27-Já fumou? () sim () não
- 28-Há quanto tempo deixou de fumar?
- 29-Quantos cigarros/dia fumava?
- 30-Durante quanto tempo fumou?
- 31-Tipo:
- 32-Consome bebida alcoólica? () sim () não
- 33-Se sim, quanto por semana (copos)?:
- 34-Tipo de bebida (cachaça, cerveja, uísque, vinho, etc)?
- 35-Já consumiu bebida alcoólica? () sim () não
- 36-Há quanto tempo deixou de beber?
- 37-Consome drogas? () sim () não
- 38-Se sim, qual?
- 39-Há quanto tempo?
- 40-Tem contato com substâncias tóxicas? () sim () não

- 41-Se sim, qual (produtos de limpeza, agrotóxicos, gasolina, tinta)?
- 42-Há quanto tempo?
- 43-Foi submetido a raio X recentemente (dentário ou antes da cirurgia)?
() sim () não
- 44-Quando?
- 45-Sabe quantas chapas de RX foram feitas?
- 46- Já fez tratamento com quimioterápico ou radioterapia? () sim () não
- 47-Se sim, qual?
- 48-Há quanto tempo?
- 49-Tem alguma doença (asma, hipertensão, diabetes, hepatite, lúpus, artrite, câncer)?
() sim () não
- 50-Qual?
- 51-Já teve alguma doença grave? () sim () não
- 52-Se sim, qual?
- 53-Há quanto tempo?
- 54-Passou por algum estresse ultimamente? () sim () não
- 55-Se sim, qual?
- III - História Médica
- 56-É alérgico a algum tipo de medicamento? () sim () não
- 57-Se sim, qual?
- 58-Faz uso regular de algum tipo de medicamento (antibiótico, anti-inflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, corticóide, anti-convulsivante, insulina, hipoglicemiante)?
() sim () não
- 59-Se sim, qual (is)?
- 60-Frequência/dia:
- 61-Faz uso de vitamina/antioxidante (complexo vitamínico)? () sim () não

62-Se sim, qual (is)?

63-Frequência/dia:

64-Há quanto tempo?

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

66-Se sim, qual (is)?

67-Frequência/dia:

68-Há quanto tempo parou?

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

70- Se sim, qual (is)?

71- Há quanto tempo parou?

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

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

74-Se sim, quantas?

75-Há quanto tempo foi a última?

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

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

78-Há quanto tempo?

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

9 APÊNDICE

Quadro A - Doses totais de fentanil (FNT), brometo de rocurônio (Roc) e sevoflurano (SVF)

paciente	FNT (µg)	Roc (mg)	SVF (ml)
1	500	40	
2	406	45	
3	550	55	
4	450	36	
5	350	60	70
6	350	30	30
7	550	40	60
8	400	45	30
9	425	36	80
10	550	40	90
11	500	50	80
12	400	45	
13	300	36	
14	600	50	
15	525	45	
média	457,1	43,5	62,9
desvio padrão	89,6	8,0	24,3

Quadro B – Dados demográficos e gênero no grupo controle

	Idade (anos)	Gênero	Peso (Kg)	Altura (cm)	IMC (Kg.m⁻²)
controles					
C1	21	F	55	164	20
C2	22	M	70	182	21
C3	25	F	63	166	23
C4	23	F	69	165	25
C5	23	F	45	155	19
C6	26	M	68	178	21
C7	33	F	41	160	16
C8	36	F	65	164	24
C9	43	M	47	182	14
C10	37	M	84	193	23
C11	44	F	40	150	18
C12	55	F	82	158	33
C13	22	M	68	167	24
C14	42	F	74	165	27
C15	44	M	66	169	23

Quadro C – Dados demográficos, gênero e doses totais dos anestésicos no grupo sevoflurano

pacientes	Idade (anos)	Gênero	Peso (Kg)	Altura (cm)	IMC (Kg.m ⁻²)	duração anestesia (min)
1	18	F	59	165	22	210
2	27	F	58	165	21	140
3	44	M	56	160	22	265
4	24	F	62	158	25	190
5	39	M	57	160	22	240
6	23	M	61	165	22	135
7	23	F	90	170	31	270
8	18	M	56	160	22	146
9	18	M	66	185	19	280
10	28	M	81	171	28	315
11	32	F	78	160	30	200
12	18	M	58	180	18	155
13	44	F	60	163	23	125
14	33	M	78	188	22	205
15	31	F	76	160	30	180
média			66,4	167,3	23,8	203,7
desvio padrão			11,1	9,7	4,1	59,3

Quadro D – Temperatura ambiente (°C) na sala de operação

momentos	antes ind.	após ind.	30 min.	60 min.	120 min.	final
pacientes						
1	25,2	25,2	25,5	24,2	22,8	22,3
2	22,9	23	22,6	21,9	20,8	20,8
3	22,3	22,6	23,1	23	21,2	21,1
4	22,3	22,5	23,2	23,8	24,1	24,1
5	23,2	23,2	22,4	21,7	21,3	23,5
6	22,7	23	23,7	21,5	22,4	22,4
7	20,9	20,9	21,8	22	22,5	23,2
8	22,1	22,2	23,3	24,2	23,4	23,5
9	22,8	23	22,8	22,6	21,6	22,3
10	24,2	24,1	22,9	22,8	21,9	21
11	23,9	24,5	24,1	24,1	22,9	23,8
12	24,2	24	23,5	22,5	23,3	23,3
13	24,1	24,1	23,3	22,1	21,2	21,2
14	22,8	22,8	23,7	23	22,3	23,7
15	23,5	23,5	23	23,5	23,5	23,1
média	23,14	23,24	23,26	22,86	22,35	22,6
desvio padrão	1,073	1,050	0,842	0,930	0,994	1,1

antes ind.= antes da indução da anestesia

após IOT = após Intubação Oro Traqueal

30 min= 30 minutos após início da anestesia e final = ao término da anestesia

Quadro E – Temperatura esofágica (°C)

momentos	após IOT	30 min	60 min	120 min	final
pacientes					
1	36,8	36,7	36,8	38,2	38,5
2	37	37,1	36,8	37,1	37,1
3	35,7	35,6	35,7	36,1	37
4	36,5	36,6	36,6	36,7	36,9
5	37	36,4	36,8	37,2	37,8
6	36,6	36,3	36,7	37	37
7	34,6	34,5	35,9	36,7	37,3
8	36,6	36,3	36,6	37,2	37,4
9	35,7	35,8	36	36,5	37,3
10	36,4	36,3	36,4	36,6	37,1
11	23,9	36,5	36,3	36,3	36,4
12	36,2	35,9	36,1	36,4	36,5
13	36,7	36,4	36,2	36,3	36,2
14	35,4	35,1	35	35,5	35,9
15	36,7	36,8	36,9	36,7	36,7
média	35,4	36,1	36,3	36,7	37,0
desvio padrão	3,2	0,6	0,5	0,6	0,6

Quadro F - Anestésico sevoflurano expirado (%)

momentos	15 min	30 min	60 min	120 min	final
pacientes					
1	1,6	2,1	1,9	2,1	1,6
2	1,8	1,7	2,6	2,9	2,1
3	1,5	2	2,3	3	2,5
4	2	2,9	2	2,5	2,3
5	1,2	1,7	2,2	2,3	1,8
6	2	3	2,8	1	0,3
7	1,7	1,3	1,3	2,2	2,5
8	2,4	2,8	2,3	2,4	1,2
9	2,7	3	2,8	2,7	1,5
10	1,7	1,8	2,1	2,6	1,4
11	2,3	2,3	2,4	2,8	2,5
12	1,9	1,9	2,1	2	1,7
13	1,7	2,1	2	2,1	2,1
14	1,7	1,7	2,1	1,9	1,1
15	2,1	2,5	2,4	2,7	1,3
média	1,8	2,1	2,2	2,3	1,7
desvio padrão	0,3	0,5	0,3	0,5	0,6

Quadro G – Pressão Arterial Sistólica (mm Hg)

momentos	antes ind.	após ind.	após IOT	15 min.	60 min.	120 min.	final
pacientes							
1	116	95	89	109	89	113	95
2	107	105	106	91	76	89	95
3	122	93	115	93	103	86	94
4	145	108	117	128	100	106	105
5	117	92	99	99	88	80	85
6	134	114	130	109	96	111	117
7	120	90	96	96	97	119	97
8	114	87	130	91	98	87	101
9	120	105	94	89	88	96	103
10	117	101	113	105	101	103	97
11	104	109	107	104	129	101	83
12	122	115	98	100	88	88	81
13	121	89	95	97	106	95	96
14	130	104	99	99	92	88	93
15	113	99	116	103	122	116	123
média	120	100	107	101	98	99	98
desvio padrão	10,3	9,1	12,8	9,8	13,5	12,4	11,4

Quadro H – Pressão Arterial Diastólica (mm Hg)

momentos	antes ind.	após ind.	após IOT	15 min	60 min	120 min	final
pacientes							
1	65	44	52	63	47	49	51
2	65	60	52	46	52	37	53
3	85	67	83	70	57	56	54
4	81	57	63	59	52	94	86
5	65	58	55	55	52	48	52
6	76	67	80	66	46	54	59
7	61	35	42	45	58	77	54
8	66	54	75	52	45	51	61
9	70	49	50	37	51	52	48
10	72	56	72	52	58	66	58
11	65	84	62	61	54	69	101
12	63	63	53	42	36	51	94
13	81	54	62	70	52	70	67
14	80	47	58	63	40	42	53
15	64	59	78	61	63	57	67
média	70,6	56,9	62,5	56,1	50,9	58,2	63,9
desvio padrão	7,9	11,4	12,5	10,2	7,1	14,7	16,6

Quadro I – Frequência cardíaca (bpm)

momentos	antes ind.	após ind.	após IOT	30 min	60 min	120 min	final
pacientes							
1	105	78	81	82	79	96	107
2	93	90	93	74	74	82	70
3	94	85	74	82	85	85	90
4	75	66	68	78	75	96	86
5	101	75	97	87	83	98	82
6	93	108	80	84	72	91	118
7	72	59	61	66	66	73	80
8	97	95	108	103	97	102	100
9	60	64	66	73	68	73	69
10	71	72	74	73	71	75	70
11	84	69	95	87	86	90	67
12	72	75	71	76	82	87	57
13	88	78	69	79	78	67	68
14	48	49	67	64	60	59	51
15	83	77	99	95	112	115	104
média	82,4	76,0	80,2	80,2	79,2	85,9	81,2
desvio padrão	15,9	14,6	14,5	10,2	12,9	14,7	19,4

Quadro J – Saturação periférica de oxigênio (SpO₂) (%)

momentos	antes ind.	após ind.	30 min	60 min	120 min	final
pacientes						
1	98	98	97	98	97	97
2	98	98	97	98	97	97
3	97	99	97	97	97	97
4	98	99	98	98	98	98
5	96	98	99	98	98	98
6	96	97	98	97	98	98
7	96	99	98	98	98	97
8	97	99	98	98	97	98
9	98	98	98	98	98	97
10	97	97	97	97	97	98
11	98	98	87	96	97	97
12	97	100	98	97	98	99
13	97	100	99	99	95	99
14	96	97	100	99	100	100
15	97	98	98	98	98	98
média	97,0	98,3	97,2	97,7	97,5	97,8
desvio padrão	0,7	0,9	2,9	0,7	1,0	0,9

Quadro K - Pressão expirada de CO₂ (P_{ET}CO₂) (mm Hg)

momentos pacientes	após IOT	30 min	60 min	120 min	final
1	35	34	35	38	38
2	36	36	36	33	40
3	36	35	36	33	34
4	38	32	29	30	28
5	42	38	36	36	41
6	39	33	33	45	45
7	36	30	32	33	34
8	37	36	33	33	39
9	35	31	32	33	42
10	37	34	33	33	38
11	30	34	36	33	35
12	37	38	36	35	36
13	29	32	33	37	34
14	43	36	35	37	39
15	32	33	34	35	33
média	36,1	34,1	33,9	34,9	37,0
desvio padrão	3,8	2,3	2,0	3,4	4,2

Quadro L - Concentração plasmática de interleucina 1- β (pg.mL⁻¹)

momento	M1
controles	
C1	1,36
C2	1,5
C3	1,1
C4	3,7
C5	1,43
C6	1,5
C7	1,3
C8	1,47
C9	0
C10	0
C11	1,6
C12	2,2
C13	1,11
C14	0
C15	1,4

momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,5	1,5	1,4	1,4
2	0	0	1,5	0
3	1,8	1,3	1,9	1,5
4	1,3	0	2,2	1,69
5	1,36	1,19	1,06	2,05
6	0	0	1,51	0
7	1,5	0	0	1,53
8	1,33	1,7	0	1,11
9	1,11	0	0	1,48
10	1,15	0	0	2,82
11	0	1,7	1,19	0
12	1,24	2,31	3,99	1,36
13	1,47	1,74	1,57	1,43
14	1,57	1,94	1,53	1,43
15	1,3	1,53	1,06	0

Quadro M - Concentração plasmática de interleucina 2 (pg.mL⁻¹)

momento	M1
controles	
C1	2,35
C2	1,37
C3	1,12
C4	2,55
C5	2,1
C6	5,84
C7	1,43
C8	2,50
C9	2,55
C10	2,55
C11	5,84
C12	0
C13	3,06
C14	2,55
C15	2,55

momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,68	0	1,55	2,65
2	2,45	3,43	1,27	2,01
3	2,05	2,97	5,78	3,30
4	2,21	2,55	2,95	2,79
5	3,71	1,27	2,14	3,69
6	2,89	3,04	1,9	2,77
7	2,72	4,31	4,11	1,43
8	2,21	1,17	2,28	1,82
9	2,98	1,27	1,27	1,84
10	3,69	4,22	2,92	2,13
11	1,37	2,24	1,22	1,4
12	1,12	2,27	2,65	1,55
13	0	0	0,97	0
14	2,75	3,18	2,07	2,4
15	0	0,73	0	2,27

Quadro N - Concentração plasmática de interleucina 4 (pg.mL⁻¹)

momento	M1
pacientes	2,41
C2	1,68
C3	0,64
C4	0,67
C5	1,44
C6	3,26
C7	1,4
C8	0,80
C9	1,7
C10	0
C11	3,26
C12	1,45
C13	0
C14	1,7
C15	0

momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,48	0,71	0	1,88
2	1,43	0	1,98	2,12
3	1,94	1,91	2,92	1,03
4	1,77	1,82	2,72	1,29
5	5,17	1,31	2,17	5
6	2,1	1,90	1,59	1,91
7	2,06	2,18	2,53	1,03
8	1,80	0	2,07	1,97
9	3,51	1,31	2,3	2,5
10	2,53	1,90	0,85	1,69
11	1,66	1,94	1,07	0,86
12	0,83	0,77	1,75	1,21
13	2	0,98	1,53	0,80
14	2,66	0	0,83	0,92
15	1,48	1,54	0	1,54

Quadro O - Concentração plasmática de interleucina 5 (pg.mL⁻¹)

momento	M1
pacientes	
C1	0,63
C2	1,8
C3	0,68
C4	0,53
C5	1,59
C6	1,5
C7	1,52
C8	1,41
C9	1,47
C10	1,25
C11	1,5
C12	1,98
C13	1,01
C14	1,47
C15	1,25

momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,09	1,08	1,21	1,14
2	0,52	1,30	0,56	0,54
3	0,58	0,52	1,2	0,6
4	0,64	1,12	0,61	0,67
5	1,21	0,74	0,66	1,47
6	0,59	1,23	1,16	0,54
7	0,6	0,62	1,24	0
8	0,64	1,2	1,21	1,34
9	0,66	0,74	1,21	0,73
10	1,19	1,52	1,25	0,66
11	0,6	1,13	6,4	0,57
12	0	1,12	1,16	0,66
13	0	0	0,55	0
14	0	0,79	0,62	1,17
15	0,52	1,05	0	0,57

Quadro P- Concentração plasmática de interleucina 6 (pg.mL⁻¹)

momento	M1			
pacientes				
C1	1,33			
C2	2,3			
C3	1,7			
C4	0			
C5	1,42			
C6	2,7			
C7	2,5			
C8	1,51			
C9	0			
C10	1			
C11	3			
C12	2,3			
C13	1,47			
C14	1,13			
C15	2,1			
momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,5	0	0	6,9
2	2,13	1,33	2,2	6,35
3	1,8	1,2	4	0
4	1,6	1,75	1,5	2,02
5	1,46	1,4	1,33	4,47
6	1,24	1,31	3,2	2,79
7	1,65	1,9	1,96	1,93
8	1,6	2,12	3,04	14,43
9	1,55	1,51	1,96	3,7
10	1,53	0	1,15	8,56
11	1,72	2,75	2,84	7,34
12	1,29	1,98	3,52	4,11
13	1,55	2,02	2,36	3,92
14	1,41	1,52	1,58	3,92
15	1,12	1,08	1,27	2,42

Quadro Q - Concentração plasmática de interleucina 8 (pg.mL⁻¹)

momento	M1			
pacientes				
C1	2,22			
C2	3,1			
C3	0			
C4	0			
C5	2,5			
C6	0			
C7	2,3			
C8	2,22			
C9	1,8			
C10	1,5			
C11	2,8			
C12	1,2			
C13	2,3			
C14	1,56			
C15	2,4			
momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	2,6	1,9	1,6	2,8
2	2,23	1,96	1,7	2,49
3	3	2,8	3,3	0
4	2,1	3,9	0	2,55
5	1,85	1,57	2,01	8,17
6	1,59	1,79	2,9	1,4
7	1,81	1,4	4,42	1,78
8	3,99	4,42	2,76	3,08
9	2,9	2,22	4,13	5,48
10	1,78	0	4,52	9,05
11	2,11	3,68	2,85	3,82
12	3,61	5,13	8,08	3,28
13	7,15	5,41	5,96	7,42
14	2,48	2,42	3,06	2,67
15	2,81	3,58	2,87	3,45

Quadro R - Concentração plasmática de interleucina 10 (pg.mL⁻¹)

momento	M1
pacientes	
C1	2,01
C2	2,39
C3	2,14
C4	1,68
C5	0,86
C6	3,1
C7	1,92
C8	0,77
C9	2,03
C10	1,78
C11	3,1
C12	1,76
C13	1,55
C14	2,03
C15	1,78

momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,74	1,33	1,55	2,18
2	1,91	1,78	2,62	2,15
3	1,94	1,41	4,23	1,69
4	2,41	3,96	0,95	1,34
5	2,51	1,64	1,58	2,27
6	1,35	1,77	2,01	1,99
7	2	1,41	3,12	1,5
8	2,1	1,57	1,5	1,77
9	2,15	1,71	1,40	2,08
10	1,5	2,26	1,83	1,98
11	1,20	1,41	1,00	1,41
12	1,19	1,71	1,59	2,21
13	1,24	1,59	1,53	1,81
14	0	1,93	1,52	1,99
15	1,11	1,51	0,66	1,66

Quadro S - Concentração plasmática de interleucina 12 (pg.mL⁻¹)

momento	M1			
pacientes				
C1	1,12			
C2	1,7			
C3	0			
C4	0			
C5	1,09			
C6	0			
C7	0			
C8	0			
C9	0			
C10	0			
C11	0			
C12	0			
C13	0			
C14	1,08			
C15	0			
momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	0	0	0	0
2	2,61	0	0	1,42
3	0	0	0	0
4	0	2,55	0	0
5	0	0	0	1,45
6	0	0	2,64	0
7	0	0	1,12	0
8	0	1,06	1,41	0
9	1,32	0	1,14	1,58
10	0	1,3	0	4,21
11	0	2,05	0	0
12	1,14	2,65	4,21	1,17
13	0	1,62	1,32	1,09
14	1,14	1,53	0	1,17
15	1,87	0	1,03	0

Quadro T - Concentração plasmática de interleucina TNF alfa (pg.mL⁻¹)

momento	M1
pacientes	
C1	2,145
C2	1,19
C3	0
C4	0,91
C5	0
C6	2,12
C7	1,555
C8	0
C9	1,51
C10	0
C11	2,12
C12	1,29
C13	0
C14	1,51
C15	0

momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,42	1,42	1,44	1,37
2	0,77	1,52	0,89	0,85
3	1,33	1,41	2,38	1,52
4	1,96	1,78	1,81	1,65
5	2,27	1,43	1,24	3,69
6	0,59	1,82	1,42	1,45
7	1,32	1,96	2,26	0,75
8	1,20	0	1,16	0,91
9	2,31	2	1,93	1,84
10	1,19	2,14	1,47	1,30
11	0,66	1,31	1,07	0
12	0	0,69	0,69	0
13	0,62	0,57	1,64	0,75
14	1,29	1,81	0,84	1,46
15	0,79	0,58	0	0

Quadro U - Concentração plasmática de interleucina IFN gama (pg.mL^{-1})

momento	M1
controles	
C1	2,35
C2	1,37
C3	1,12
C4	2,55
C5	2,1
C6	5,84
C7	1,43
C8	2,50
C9	2,55
C10	2,55
C11	5,84
C12	0
C13	3,06
C14	2,55
C15	2,55

momentos	M1	M2	M3	M4
pacientes				
1	1,68	0	1,55	2,65
2	2,45	3,43	1,27	2,01
3	2,05	2,97	5,78	3,30
4	2,21	2,55	2,95	2,79
5	3,71	1,27	2,14	3,69
6	2,89	3,04	1,9	2,77
7	2,725	4,31	4,11	1,43
8	2,21	1,17	2,28	1,82
9	2,98	1,27	1,27	1,84
10	3,69	4,22	2,92	2,13
11	1,37	2,24	1,22	1,4
12	1,12	2,27	2,65	1,55
13	0	0	0,97	0
14	2,75	3,18	2,07	2,4
15	0	0,73	0	2,27