

Avaliação de Parâmetros Antioxidantes em Ratos Tratados com Sevoflurano *

Evaluation of Antioxidant Parameters in Rats Treated with Sevoflurane

Francisco J. L. Bezerra¹, Nilton Bezerra do Vale², Brunno de Oliveira Macedo³, Adriana Augusto Rezende⁴,
Maria das Graças Almeida⁴

RESUMO

Bezerra FJL, Vale NB, Macedo BO, Rezende AA, Almeida MG – Avaliação de Parâmetros Antioxidantes em Ratos Tratados com Sevoflurano.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: O sevoflurano é um éter halogenado com flúor que sofre biotransformação hepática através do citocromo P450 2E1. Éteres halogenados que sofrem biotransformação pelo P450 2E1 podem produzir espécies reativas do oxigênio (ERO) e promover enfraquecimento do sistema de defesa antioxidante. O objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre a atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias e o sevoflurano.

MÉTODO: Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Grupo 1 controle: apenas oxigênio a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 dias consecutivos); Grupo 2 – sevoflurano 4,0% em oxigênio a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 dias consecutivos); Grupo 3 – isoniazida (i.p.), 50 mg.kg⁻¹ de peso corporal /dia, durante 4 dias e em seguida tratados apenas com oxigênio a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 dias consecutivos); Grupo 4 – isoniazida por via intraperitoneal na dose de 50 mg.kg⁻¹ de peso corporal, diariamente durante 4 dias, seguido da administração do sevoflurano a 4,0% em oxigênio a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 dias). Após 12 horas da última exposição ao sevoflurano, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado através da veia porta para análise da atividade das enzimas antioxidantes.

RESULTADOS: Aumento da atividade específica da glicose-6-fosfato desidrogenase, diminuição da atividade específica da catalase, principalmente no grupo de animais pré-tratados com isoniazida e, em seguida, tratados com sevoflurano. A glutatona peroxidase não apresentou alteração na sua atividade.

* Recebido (**Received from**) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), RN

1. Anestesiologista do Hospital Walfredo Gurgel; Mestre em Ciências Farmacêuticas
2. Anestesiologista da Maternidade Januário Cicco; Professor Doutor da Disciplina de Anestesiologia do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFRN
3. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN
4. Professor e Doutor do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRN

Apresentado (**Submitted**) 15 de outubro de 2009

Aceito (**Accepted**) para publicação em 24 de dezembro de 2009

Endereço para correspondência (**Correspondence to**):

Dr. Nilton Bezerra do Vale

Rua Gen. Gustavo Cordeiro de Farias, S/N

Petrópolis

59010-180 Natal, RN

E-mail: niltondovale@hotmail.com

CONCLUSÕES: A interação do sevoflurano com indutores enzimáticos do citocromo P450 2E1 pode propiciar a instalação do estresse oxidativo caso a exposição se torne prolongada e repetitiva.

Unitermos: ANESTÉSICOS, Volátil: sevoflurano; ANIMAIS: ratos; DROGAS, Antioxidantes: isoniazida; METABOLISMO: citocromo P-450 CYP2E1, glucefosfato desidrogenase

SUMMARY

Bezerra FJL, Vale NB, Macedo BO, Rezende AA, Almeida MG – Evaluation of Antioxidant Parameters in Rats Treated with Sevoflurane.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Sevoflurane is a halogenated fluorinated ether that undergoes hepatic biotransformation through cytochrome P4502E1. Halogenated ethers undergoing biotransformation by P4502E1 can produce reactive oxygen species (ROS), weakening the antioxidant defense mechanism. The objective of this study was to investigate the relationship between the activity of erythrocyte antioxidant enzymes and sevoflurane.

METHODS: Animals were divided in four groups: Group 1 – control: 100% oxygen (1 L.min⁻¹ for 60 min during five consecutive days); Group 2 – 4.0% sevoflurane in 100% oxygen (1 L.min⁻¹ for 60 minutes during five consecutive days); Group 3 – isoniazid (i.p.), 50 mg.kg⁻¹/day for four consecutive days, followed by 100% oxygen (1 L.min⁻¹ for 60 minutes during four consecutive days); Group 4 – intraperitoneal isoniazid, 50 mg.kg⁻¹ daily for four days, followed by 4.0% sevoflurane in 100% oxygen (1 L.min⁻¹ for 60 minutes during five days). Twelve hours after the last exposure to sevoflurane, animals were sacrificed and their blood was collected through the portal vein for analysis of antioxidant enzymes.

RESULTS: An increase in the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and a decrease in the activity of catalase were observed, especially in the group of animals pre-treated with isoniazid. Changes in the activity of glutathione peroxidase were not observed.

CONCLUSIONS: The interaction between sevoflurane and cytochrome P450 2E1 with enzymatic inducers can lead to oxidative stress with prolonged and repetitive exposure.

Keywords: ANESTHETICS, Volatile: sevoflurane; ANIMALS: rats; DRUGS, Antioxidants: isoniazid; METABOLISM: cytochrome P-450 CYP2E1, glucose phosphate dehydrogenase

INTRODUÇÃO

O sevoflurano (CH₂F-O-CH(CF₃)₂ fluorometil 2,2,2-trifluoro-1-[trifluorometil] etil éter) é um agente anestésico inalatório halogenado com flúor de baixa solubilidade sanguínea larga-

mente utilizado para anestesia pediátrica e ambulatorial ¹. Sua biotransformação, catalisada principalmente pela monooxigenase citocromo P450, isoforma 2E1 (CYP2E1), é predominantemente hepática e ocorre em baixa extensão (2-5%) em relação aos demais agentes halogenados: halotano (20%), enflurano (2%), isoflurano (0,2%) e desflurano (9%) ². As isoenzimas do citocromo constituem uma família de hemoproteínas encontradas na membrana do retículo endoplasmático de hepatócitos com funções oxidativas e responsáveis pela metabolização de xenobióticos. O metabolismo final desse halogenado resulta na produção do flúor inorgânico e do flúor orgânico, hexafluoroisopropanol (HFIP) ³.

Espécies reativas do oxigênio (ERO) são substâncias produzidas durante a utilização do oxigênio pelos organismos aeróbicos. Essas substâncias são capazes de reagir com moléculas orgânicas (DNA, lipídios, carboidratos) e estão implicadas em uma série de condições patológicas, como aterosclerose, câncer, envelhecimento e também em processos fisiopatológicos como inflamação, angiogênese e apoptose ⁴⁻⁶. O aumento na produção de ERO está associado à mudança no equilíbrio intracelular oxidante/antioxidante, que pode causar consequências deletérias para a homeostase celular. Evolutivamente, as células criaram um sistema antioxidante que pode converter as ERO em derivados inativos. Através das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona (GSH), dos íons magnésio e zinco, das vitaminas C e E, dos cofatores nicotinamida adenina difosfato (NADPH), além de proteínas tais como albumina, ferritina e ceruloplasmina, as células conseguem se livrar das ERO ⁷. O CYP2E1, enzima responsável pela biotransformação hepática do sevoflurano, é capaz de produzir ERO como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante seu ciclo catalítico ⁸. A presença de íons ferro durante essa produção de $O_2^{\cdot-}$ é capaz de gerar uma ERO altamente reativa chamada radical hidroxila (OH^{\cdot}) ⁹.

Em relação à ação oxidante do sevoflurano, alguns autores têm sugerido que o sevoflurano é capaz de produzir ERO como o radical hidroxil (OH^{\cdot}), o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ¹⁰ e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ¹¹, além de promover lipoperoxidação ¹², enfraquecendo o sistema de enzimas antioxidantes ¹³ em diversos tecidos. Especula-se que o sevoflurano seja capaz de alterar o fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória a nível mitocondrial, promovendo a formação de ERO ¹⁴.

Por outro lado, publicações recentes têm abordado o fenômeno do condicionamento anestésico, no qual uma breve exposição prévia ao sevoflurano é capaz de conferir um estado de proteção ao miocárdio e a outros órgãos contra os efeitos tissulares deletérios promovidos pelo processo de isquemia/reperfusão ^{15,16}.

Considerando-se a escassez de estudos sobre o sistema de defesa antioxidante após múltiplas exposições ao sevoflurano, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade de enzimas antioxidantes em eritrócitos de ratos Wistar tratados com sevoflurano, submetidos ou não à indução enzimática do CYP2E1 com isoniazida.

MÉTODOS

Foram utilizados 42 ratos machos Wistar pesando em média 280 g, com idade de 90 dias e mantidos em gaiolas com água e alimentos *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12h no biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro de Ciências da Saúde da UFRN. Os ratos foram anestesiados em uma câmara de vidro de 3.200 cm³ usando oxigênio 100% 1 L.min⁻¹. O anestésico foi liberado a partir de um vaporizador calibrado HB44 (Abott, Madison, WI). Após 1 hora de exposição os ratos receberam oxigênio a 100% (1 L.min⁻¹) até despertarem, quando então eram retornados às suas gaiolas. Esses animais foram divididos em quatro grupos. No Grupo 1, nove animais (n = 9) receberam oxigênio a 100%, a uma taxa de 1 L.min⁻¹ por 60 minutos, durante 5 dias consecutivos. Os nove animais (n = 9) do Grupo 2 receberam sevoflurano 4% (1,8 CAM.h⁻¹) em oxigênio a 100% a uma taxa de 1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 dias consecutivos. Os seis animais (n = 6) do Grupo 3 receberam isoniazida pela via intraperitoneal, 50 mg.kg⁻¹ de peso corporal/dia, durante 4 dias consecutivos e, em seguida, foram tratados apenas com oxigênio a 100%, numa taxa de 1 L.min⁻¹, por 60 minutos durante cinco dias consecutivos. Os sete animais (n = 7) do Grupo 4 receberam isoniazida através de injeção intraperitoneal, na dose de 50 mg.kg⁻¹ de peso corporal, diariamente durante 4 dias e depois sevoflurano a 4% em oxigênio a 100%, a uma taxa de 1 L.min⁻¹, por 60 minutos durante 5 dias consecutivos. Após 12 horas da última exposição, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e o sangue foi coletado da veia porta com heparina como anticoagulante.

O sangue heparinado foi centrifugado em centrífuga refrigerada de mesa, modelo PK121R, ALC® ITÁLIA (1000 x g por 10 minutos a 4°C), e o plasma, separado. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina 0,9% e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi hemolisado com β-mercaptoetanol 0,27 M pH 7,0. Este hemolisado foi utilizado para determinar a atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) ¹⁷, catalase (CAT) ¹⁷ e glutatona peroxidase (GPx) ¹⁸.

A análise estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância, seguida da aplicação do teste U de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

RESULTADOS

A atividade enzimática da G6PD (Tabela 1) apresentou um aumento em torno de 5% para o grupo tratado com sevoflurano (G2). Por sua vez o Grupo (G4) apresentou um aumento significativo em relação ao Grupo 1 (G1) ($p \leq 0,01$) e em relação aos Grupos 2 (G2) e 3 (G3) ($p \leq 0,05$). Os resultados estão expressos em miliunidade por miligrama de hemoglobina (mU.mg⁻¹ de Hb).

Para a CAT (Tabela 2), o G2 apresentou uma diminuição da atividade enzimática em torno de 10% em relação ao G1. Os

Tabela I – Atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em Eritrócito de Ratos Submetidos ao Tratamento com Sevoflurano e Pré-Tratados ou Não com Isoniazida

| Grupos | Tratamento | mU.mg ⁻¹ de Hb |
|--------|--------------------------|---------------------------|
| G1 | Oxigênio | 17,27 ± 0,87 (n = 9) |
| G2 | Sevoflurano | 18,24 ± 2,03 * (n = 9) |
| G3 | Isoniazida | 17,87 ± 0,62 * (n = 6) |
| G4 | Isoniazida + sevoflurano | 21,98 ± 1,26 ** (n = 7) |

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão.

* Indica diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao Grupo 4.

** Indica diferença estatística significativa ($p \leq 0,01$) em relação ao Grupo 1.

Tabela II – Atividade da Catalase em Eritrócito de Ratos Submetidos ao Tratamento com Sevoflurano e Pré-Tratados ou Não com Isoniazida

| Grupos | Tratamento | U.mg ⁻¹ de Hb |
|--------|--------------------------|----------------------------|
| G1 | Oxigênio | 371,41 ± 33,06 (n = 8) |
| G2 | Sevoflurano | 332,96 ± 47,28 (n = 10) |
| G3 | Isoniazida | 284,56 ± 16,21 * (n = 6) |
| G4 | Isoniazida + sevoflurano | 274,11 ± 14,10 ** (n = 11) |

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão.

* Indica diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao Grupo 1.

** Indica diferença estatística significativa ($p \leq 0,01$) em relação ao Grupo 1.

Tabela III – Atividade da Glutaciona Peroxidase em Eritrócito de Ratos Submetidos ao Tratamento com Sevoflurano e Pré-Tratados ou Não com Isoniazida

| Grupos | Tratamento | U.mg ⁻¹ de Hb |
|--------|--------------------------|--------------------------|
| G1 | Oxigênio | 0,88 ± 0,15 (n = 9) |
| G2 | Sevoflurano | 0,87 ± 0,21 (n = 9) |
| G3 | Isoniazida | 0,66 ± 0,13 (n = 6) |
| G4 | Isoniazida + sevoflurano | 0,64 ± 0,10 (n = 7) |

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão.

animais tratados com isoniazida e pré-tratados com isoniazida seguida do sevoflurano apresentaram diminuição significativa ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$), respectivamente, em relação aos do grupo G1. Os resultados estão expressos em unidade por miligrama de hemoglobina (U.mg⁻¹ de Hb).

Em relação à atividade da glutaciona peroxidase (GPx), não foram observadas alterações significativas entre os grupos tratados. Os resultados estão expressos em unidade por miligrama de hemoglobina (U.mg⁻¹ de Hb).

DISCUSSÃO

A G6PD é uma enzima que oxida a glicose-6-fosfato e a 6-fosfogluco lactona numa via metabólica conhecida como ciclo das pentoses, produzindo o NADPH através da redução do NADP⁺ 19. A isoniazida (INH) é indutora do sistema enzimático hepático CYP2E1, responsável pelo metabolismo de alguns fármacos, como: acetaminofen, etanol 20, isoflurano e sevoflurano 21. O aumento da atividade enzimática da G6PD

nos animais tratados com isoniazida e sevoflurano (G4) pode estar associado à indução enzimática promovida pela INH e um possível dano oxidativo decorrente desse processo. A isoenzima CYP2E1 utiliza NADPH como doadora de elétrons durante seu ciclo catalítico 20. Sabe-se que a diminuição dos níveis de NADPH ou a oxidação da glutaciona (GSH) são fortes estímulos ativadores da G6PD 17. Assim, a indução enzimática do CYP2E1 promovida pela INH depleta as reservas eritrocitárias de NADPH, o que contribui para aumentar a atividade da G6PD, como observado no G4.

O pré-tratamento com isoniazida aumenta a taxa de defloração do sevoflurano entre 0,5-4 vezes, sendo que esse aumento depende da dose e da duração do pré-tratamento, efetivo a partir de 3 dias 22. O mecanismo de ação de indução enzimática da isoniazida resulta primariamente do aumento da eficiência da translação do RNA-mensageiro. O grupo amino da cadeia lateral da hidrazida e o anel piridino possuem importante papel na indução seletiva e na magnitude da indução da isoforma citocromo CYP2E1 23.

Além da indução enzimática, outro possível fator envolvido na ativação da G6PD nesse grupo seria a biotransformação do sevoflurano e da INH, ambas associadas à produção de flúor inorgânico. Motta e col. 24 demonstraram o aumento da atividade da G6PD em glândulas submandibulares de ratos submetidos ao tratamento com fluoreto de sódio. O flúor também é capaz de estimular a produção de ERO (O₂^{•-}) em leucócitos polimorfonucleares 25. Portanto, o consumo de NADPH através do ciclo catalítico da CYP2E1 e o flúor liberado durante a biotransformação do sevoflurano podem estar atuando de forma sinérgica, aumentando a atividade da G6PD, como observado no G4. Contrariamente ao que observamos, um estudo *in vitro* demonstrou efeito inibitório na ação da G6PD pelo sevoflurano 26. Entretanto, nesse estudo não foram utilizados animais ou INH para realizar indução enzimática.

CYP2E1 é capaz de produzir ERO como o O₂^{•-} e a H₂O₂, que em excesso no organismo é capaz de promover a inibição da CAT 27. Por conseguinte, o aumento das ERO produzidas durante o ciclo catalítico da CYP2E1 pode ser responsável pela inibição da atividade da CAT observada nos G3 (INH) e G4 (INH + sevoflurano).

O sevoflurano promoveu alteração na atividade da CAT apenas na presença do indutor enzimático, e esse resultado pode estar relacionado ao flúor formado em maior concentração durante a biotransformação do sevoflurano e ao aumento da atividade do ciclo catalítico da CYP2E1. O flúor é reconhecidamente nefrotóxico em concentrações plasmáticas acima de 50 μM, além de ser um potente inibidor metabólico de várias enzimas, inclusive a CAT 28. Por ser um elemento eletronegativo, pode complexar-se a metais cofatores, tais como Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ ou Fe⁺⁺, presentes no grupo heme de enzimas como a CAT, bem como também alterar a transcrição de enzimas antioxidantes 29. A elevação do fluoreto pode ser responsável pela maior inibição da CAT.

A glutaciona peroxidase não apresentou alteração em sua atividade nos grupos estudados. Ela é considerada uma enzima mais sensível a baixas concentrações de H₂O₂ e está inter-relacionada à atividade da G6PD. A GPx depende da G6PD

para receber o NADPH necessário para a redução de sua forma oxidada. Esses resultados estão de acordo com os da literatura, como Yesilkaya e col., que estudaram eritrócitos de coelho submetidos a tratamento com dois agentes anestésicos, halotano 1% e isoflurano 1.5%, e também não observaram alterações significativas na atividade da GPx em nenhum dos grupos estudados³⁰. Entretanto, Durak e col. avaliaram a atividade dessa enzima em corações de porquinhos-da-índia, expostos ao mesmo tratamento com halotano, e confirmaram a diminuição da atividade da GPx³¹. Portanto, a ausência de alteração da atividade da GPx observada em nosso trabalho poderá estar relacionada ao comportamento dessa enzima em diferentes tecidos, bem como à metodologia empregada. Em estudo anterior, observamos o aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT)³², indicando peroxidação lipídica, em ratos expostos a esse mesmo tratamento. Quando associamos o resultado daquele estudo ao apresentado agora, observamos a presença de peroxidação lipídica, o aumento da atividade da G6PD e a diminuição da atividade da CAT. Esse perfil apresentado indica que, apesar de ter havido um aumento na atividade da G6PD, as outras enzimas, CAT e GPx, não foram capazes de atuar contra o aumento na produção de ERO, provavelmente promovido pelo flúor e pelo ciclo catalítico da enzima CYP2E1.

Dikmen e col.³³ estudaram ratos submetidos ao tratamento com o sevoflurano e observaram aumento da atividade da SOD, CAT, GPx, mas não de TBAR. De acordo com nosso resultado, essa diferença pode ser explicada pela menor duração do tratamento (5 dias consecutivos em nosso estudo), além do uso prévio da INH em nosso trabalho.

Sob nossa perspectiva, esse poderá ser o perfil encontrado durante o início da exposição ao sevoflurano, ou seja, aumento da atividade das enzimas antioxidantes sem lipoperoxidação e, à medida que essa exposição se prolongue e se torne repetitiva, poderá ocorrer lipoperoxidação e diminuição da atividade enzimática, como observado em nossos estudos. Nosso resultado também fala a favor da importância do jejum na modulação da atividade enzimática mitocondrial e do retículo endoplasmático sobre o metabolismo dos fármacos, pois o rato (alta taxa metabólica) permaneceu sem ingesta durante mais de 1 hora durante os 5 dias de experimento com sevoflurano (G2 e G4), o que também favorece a indução do CYP2E1.

A maioria dos artigos publicados na literatura aponta para um possível efeito oxidante do sevoflurano^{15,16-34,35}, contudo esse efeito pode ser benéfico ou deletério dependendo do tecido estudado. Por exemplo, a proteção cardíaca exibida através do condicionamento isquêmico do miocárdio é um exemplo do efeito benéfico das ERO produzidas pelo sevoflurano¹⁶. A produção de ERO pelo sevoflurano levaria à ativação da proteína C kinase e subsequente abertura dos canais de potássio sensíveis ao ATP (adenosina trifosfato), conhecidos com K_{ATP} (canais de potássio ATP-ase dependentes), que têm um efeito protetor diante de uma isquemia e reperfusão miocárdica. A abertura desses canais está relacionada à diminuição do íon cálcio no interior da mitocôndria e a uma

maior eficiência na utilização do oxigênio pelo miocárdio durante o processo enzimático de isquemia e reperfusão³⁵. Já a produção do ânion superóxido na disfunção endotelial em segmentos de aorta induzida pelo sevoflurano é uma amostra do efeito deletério das ERO produzidas pelo sevoflurano³⁶. Vale salientar que não apenas os fármacos usados durante a anestesia devem ser imputados como responsáveis pelo desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante. A presença de patologias clínicas prévias em curso³⁷, a condição clínica do paciente antes de entrar no centro cirúrgico e o trauma cirúrgico *per se*^{38,39} constituem fatores importantes que promovem o desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante, além do jejum, como mencionado previamente.

Uma situação clínica em particular envolvendo o uso de sevoflurano merece atenção: uso deste halogenado em indivíduos portadores de deficiência da enzima eritrocitária G6PD⁴⁰. Esses pacientes não conseguem uma produção satisfatória de NADPH, importante cofator para o eritrócito porque auxilia indiretamente na atividade da GPx, enzima responsável pela eliminação de peróxidos das hemácias⁴¹ e também muito importante para a ativação da CAT⁴². Por isso, esses indivíduos se tornam mais suscetíveis a crises de hemólise devido à insuficiente produção de NADPH e à consequente menor proteção contra agentes oxidativos. A opção técnica pelo sevoflurano aparenta ser uma indicação pertinente na anestesia de portadores de deficiência da enzima G6PD desde que seja em exposição única⁴³. Teoricamente o risco de hemólise diminuiria, já que o mesmo promove o aumento da atividade da G6PD e consequentemente aumento na produção de NADPH.

Outra consideração importante diz respeito a pacientes tuberculosos que fazem uso em longo prazo de indutores do CYP2E1 como a isoniazida, especialmente no grupo genético determinado como de acetiladores lentos. A associação de INH, álcool, tabaco (indutores do CYP2E1) e deficiência de G6PD na anestesia inalatória com sevoflurano pode resultar em estresse oxidativo e consequente lesão eritrocitária, especialmente se esse uso for repetitivo e por longo prazo. Se houver necessidade técnica de administração do sevoflurano diante da deficiência genética de G6PD, seriam aconselháveis a realização de hematócrito seriado, a pesquisa de hemoglobina na urina, bem como a dosagem de lactato desidrogenase e potássio (sinais de extravasamento de conteúdo eritrocitário) para observação de sinais de hemólise durante o procedimento anestésico-cirúrgico. Assim, na prevenção da anemia hemolítica, melhor seria a opção por outra técnica anestésica "antioxidante" mais segura, como anestesia venosa total com propofol⁴⁴.

Em resumo, os resultados do presente trabalho contribuem com evidências laboratoriais de que o uso do anestésico halogenado sevoflurano em pacientes que façam uso de xenobióticos indutores do CYP2E1, como a isoniazida, poderá favorecer a produção de EROs e enfraquecer ou mesmo exceder a capacidade do sistema de defesa antioxidante de eliminá-las, principalmente se sua escolha como opção anestésica geral for prolongada e/ou repetitiva.

Evaluation of Antioxidant Parameters in Rats Treated with Sevoflurane

Francisco J. L. Bezerra, M.D.; Nilton Bezerra do Vale, TSA, M.D.; Brunno de Oliveira Macedo, M.D.; Adriana Augusto Rezende, M.D.; Maria das Graças Almeida, M.D.

INTRODUCTION

Sevoflurane ($\text{CH}_2\text{F-OCH}(\text{CF}_3)_2$ or fluromethyl 2,2,2-trifluoro-1-[trifluoromethyl] ethyl ether) is a halogenated inhalational anesthetic containing fluoride with low blood solubility, widely used for pediatric and outpatient anesthesia¹. It has a low extension (2-5%) hepatic biotransformation by the CYP2E1 isoform of the monooxygenase cytochrome P450 when compared to other halogenated agents: halothane (20%), enflurane (2%), isoflurane (0.2%), and desflurane (9%)². Cytochrome isoenzymes constitute a family of hemoproteins found in the membrane of the endoplasmic reticulum of oxidative hepatocytes, being responsible for xenobiotic metabolism. The final metabolism of this halogenated compound results in the production of inorganic fluoride and the organic fluoride, hexafluoroisopropanol (HFIP)³.

Reactive oxygen species (ROS) are produced during the use of oxygen by aerobic organisms. Those substances are capable of reacting with organic molecules (DNA, lipids, and carbohydrates) and are implicated in several pathological conditions, including atherosclerosis, cancer, and aging, as well as pathophysiological processes, such as inflammation, angiogenesis, and apoptosis⁴⁻⁶. Increased production of ROS is associated with changes in intracellular oxidative/antioxidative balance, which can have deleterious consequences for cell homeostasis. During evolution, cells created an antioxidant system that can convert ROS in inactive elements. Through the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione (GSH), magnesium and zinc ions, C and E vitamins, and the cofactor nicotinamide adenine diphosphate (NADPH), besides proteins such as albumin, ferritin, and ceruloplasmin, cells can eliminate ROS⁷. The enzyme CYP2E1, responsible for the hepatic biotransformation of sevoflurane, is capable of producing ROS like superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) during the catalytic cycle⁸. The presence of iron ions during this production of O_2^- is capable of generating the highly reactive ROS hydroxyl radical (OH^\cdot)⁹.

Regarding the antioxidant effects of sevoflurane, some authors have suggested that this drug is capable of producing ROS, such as the hydroxyl radical (OH^\cdot), anion peroxide (O_2^-)¹⁰, and hydrogen peroxide (H_2O_2)¹¹, besides promoting lipoperoxidation¹², therefore weakening the antioxidant enzyme¹³ system in several tissues. It has been speculated that sevoflurane is capable of changing the flow of electrons along the respiratory chain, at the mitochondrial level, promoting the formation of ROS¹⁴.

On the other hand, recent publications have discussed the phenomenon of anesthetic preconditioning, in which short

exposure to sevoflurane is capable of protecting the myocardium and other organs against the deleterious tissue effects promoted by the process of ischemia/reperfusion^{15,16}.

Considering the extremely reduced number of studies on the antioxidant defense mechanism after multiple exposures to sevoflurane, the objective of the present study was to evaluate the activity of antioxidant enzymes of erythrocytes in Wistar rats treated with sevoflurane, with or without enzymatic induction of CYP2E1 with isoniazid.

METHODS

Forty-two male Wistar rats with a mean weight of 280 g, and 90 days of age, maintained in cages with water and food *ad libitum*, and 12 h day/night cycles at the vivarium of the Health Sciences Center of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), were used. This study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of UFRN. The animals were anesthetized in a 3200 cm^3 glass chamber using 100% oxygen, 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The anesthetic was released by a calibrated HB44 vaporizer (Abott, Madison, WI). After one hour of exposure, the rats received 100% oxygen (1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) until awakening, at which time they returned to their cages. Those animals were divided in four groups. Group 1, with nine animals ($n=9$), received 100% oxygen at 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 60 minutes during five consecutive days. Animals ($n=9$) in Group 2 received 4% sevoflurane (1.8 $\text{MAC}\cdot\text{h}^{-1}$) with 100% oxygen at 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 60 minutes during five consecutive days. Group 3, with six animals ($n=6$), received intraperitoneal isoniazid, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}$, for four consecutive days, followed by 100% oxygen at 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 60 minutes for five consecutive days. Animals ($n=7$) in Group 4 received intraperitoneal isoniazid, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}$ for four days, followed by 4% sevoflurane in 100% oxygen at 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 60 minutes during five consecutive days. Twelve hours after the last exposure, animals were sacrificed by cervical dislocation, and blood from the portal vein was collected, using heparin for anticoagulation.

The heparinized blood was centrifuged at a desk-top refrigerated centrifuge, model PK121R, ALC® ITALY (1000xg for 10 min at 4° C), and the plasma was separated. Erythrocytes were washed three times with NS and centrifuged at 1000xg for 10 minutes at 4° C. The precipitate was hemolyzed with p° -mercaptoethanol 0.27 M pH 7.0. This hemolyzate was used to determine the activity of the enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)¹⁷, catalase (CAT)¹⁷, and glutathione peroxidase (GPx)¹⁸.

Analysis of Variance was used for the statistical analysis of the results, followed by the Mann-Whitney U test, for intergroup comparisons.

RESULTS

The enzymatic activity of G6PD (Table I) showed a 5% increase in the sevoflurane group (G2). Group 4 had a significant increase when compared to G1 ($p \leq 0.01$) and to groups

Table I – Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Rat Erythrocytes Treated with Sevoflurane and Pre-Treated, or not, with Isoniazid

| Groups | Treatment | mU.mg ⁻¹ of Hb |
|--------|-------------------------|---------------------------|
| G1 | Oxygen | 17.27 ± 0.87 (n =9) |
| G2 | Sevoflurane | 18.24 ± 2.03 * (n = 9) |
| G3 | Isoniazid | 17.87 ± 0.62 * (n = 6) |
| G4 | Isoniazid + sevoflurane | 21.98 ± 1.26 ** (n = 7) |

Results are expressed as mean ± standard deviation.

*Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$) when compared to Group 4.

**Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.01$) when compared to Group 1.

Table II – Catalase Activity in Rat Erythrocytes Treated with Sevoflurane and Pre-Treated, or not, with Isoniazid.

| Groups | Treatment | U.mg ⁻¹ of Hb |
|--------|-------------------------|----------------------------|
| G1 | Oxygen | 371.41 ± 33.06 (n = 8) |
| G2 | Sevoflurane | 332.96 ± 47.28 (n = 10) |
| G3 | Isoniazid | 284.56 ± 16.21 * (n = 6) |
| G4 | Isoniazid + sevoflurane | 274.11 ± 14.10 ** (n = 11) |

Results are expressed as mean ± standard deviation.

*Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$) when compared to Group 1.

**Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.01$) when compared to Group 1.

Table III – Glutathione Peroxidase Activity in Rat Erythrocyte Treated with Sevoflurane and Pre-Treated, or not, with Isoniazid

| Groups | Treatment | U.mg ⁻¹ of Hb |
|--------|-------------------------|--------------------------|
| G1 | Oxygen | 0.88 ± 0.15 (n = 9) |
| G2 | Sevoflurane | 0.87 ± 0.21 (n = 9) |
| G3 | Isoniazid | 0.66 ± 0.13 (n = 6) |
| G4 | Isoniazid + sevoflurane | 0.64 ± 0.10 (n = 7) |

Results are expressed as mean ± standard deviation.

G2 and G3 ($p \leq 0.05$). Results are presented in milliunits per milligram of hemoglobin (mU. mg⁻¹ of Hb).

A reduction in enzymatic activity of CAT (Table II), of approximately 10%, was seen in G2 when compared to G1. Animals treated with isoniazid followed by sevoflurane had a significant reduction ($p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively) when compared to G1. Results are expressed in units per milligram of HB (U.mg⁻¹ of Hb).

Significant changes in the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) were not observed in the treatment groups. Results are expressed as units per milligram of hemoglobin (U.mg⁻¹ of Hb).

DISCUSSION

Glucose-6-phosphate dehydrogenase is an enzyme that oxidizes glucose-6-phosphate to 6-phosphogluconolactone, in the pentose phosphate pathway, producing NADPH by reducing NADP⁺ 19. Isoniazid (INH) induces the hepatic CYP2E1 enzymatic system, which is responsible for the metabolism of some

drugs, such as: acetaminophen, ethanol²⁰, isoflurane, and sevoflurane²¹. The increased enzymatic activity in animals treated with isoniazid and sevoflurane (G4) can be associated with INH-promoted enzymatic induction and possible oxidative damage secondary to this process. The isoenzyme CYP2E1 uses NADPH as electron donor during its catalytic cycle²⁰. It is known that a reduction in NADPH levels or glutathione (GSH) oxidation is a strong activator of G6PD¹⁷. Thus, the enzymatic induction of CYP2E1 by INH depletes erythrocyte stores of NADPH, contributing for the increased activity of G6PD observed in G4.

Pre-treatment with isoniazid increases the defluorination rate of sevoflurane by 0.5-4 times, but this increase depends on the dose and duration of the pre-treatment, being effective after three days²². The mechanism of action of the enzymatic induction by isoniazid results, primarily, from the increase in the efficiency of messenger RNA translation. The amino group of the lateral chain hydrazide and the pyridine ring play an important role in the selective induction and magnitude of induction of the cytochrome isoform CYP2E1²⁵.

Besides enzymatic induction, the biotransformation of sevoflurane and INH, both associated with the production of inorganic fluoride, represents another factor possibly involved in the activation of G6PD in this group. Motta et al.²⁴ demonstrated an increase in the activity of G6PD in the submandibular glands of rats treated with sodium fluoride. Fluoride is also capable of stimulating the production of ROS (O₂⁻) in polymorphonuclear leukocytes²⁵. Therefore, consumption of NADPH, through the CYP2E1 catalytic pathway, and the fluoride, released during the biotransformation of sevoflurane, could have a synergistic effect, increasing the activity of G6PD observed in G4. Unlike our observations, an *in vitro* study demonstrated inhibition of G6PD by sevoflurane²⁶. However, this study did not use animals or INH for enzymatic induction.

The isoform CYP2E1 is capable of producing ROS, such as O₂⁻ and H₂O₂, whose excessive amount in the body is capable of inhibiting CAT²⁷. Consequently, the increase in ROS produced during the CYP2E1 catalytic pathway can be responsible for the inhibition of CAT activity observed in G3 (INH) and G4 (INH + sevoflurane).

Sevoflurane only promoted changes in the activity of CAT in the presence of the enzymatic inducer, and this result could be related with the higher concentration of fluoride, formed during the biotransformation of sevoflurane, and an increase in the activity of the CYP2E1 catalytic pathway. Fluoride is knowingly nephrotoxic in plasma concentrations above 50 µM and a potent metabolic inhibitor of several enzymes, including CAT²⁸. Since it is an electronegative element, it can form complexes with metal cofactors like Cu⁺, Zn⁺⁺, or Fe⁺⁺, present in the heme group of enzymes, such as CAT, as well as change the transcription of antioxidant enzymes²⁹. A rise in fluoride could be responsible for most CAT inhibition.

The activity of glutathione peroxidase was not affected in the study groups. This enzyme is more sensitive to low concentrations of H₂O₂, and it is related with the activity of G6PD. Glutathione peroxidase depends on G6PD to receive the NADPH necessary for the reduction of its oxidized form. Those results are in agreement with those those found in the literature, such as

Yesilkaya et al, who investigated rabbit erythrocytes treated with two anesthetic agents, 1% halothane and 1.5% isoflurane, and did not observe significant changes in GPx activity in any of the study groups³⁰. However, Durak et al. evaluated the activity of this enzyme in guinea pig hearts exposed to the same halothane treatment, and confirmed the reduction in the activity of GPx³¹. Therefore, the absence of changes in GPx activity observed in this study could be related to the behavior of this enzyme in different tissues, as well as the methodology used.

In a prior study, we observed an increase in the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)³², an indication of lipid peroxidation, in rats exposed to the same treatment. When we associated the results of that study to the ones observed in the present study, we observed the presence of lipid peroxidation, increased G6PD activity, and reduction in the activity of CAT. This profile indicates that, although the activity of G6PD increased, the other enzymes, CAT and GPx, were not capable to act against the increase in the production of ROS, probably promoted by the fluoride and the catalytic pathway of the enzyme CYP2E1.

In a study by Dikmen et al.³³ with rats treated with sevoflurane, the authors observed an increase in the activity of SOD, CAT, and GPx, but not TBARS. According to our study, this difference could be explained by the shorter treatment duration (five consecutive days in our study) and pre-treatment with INH.

We think this could be the profile observed in early sevoflurane exposure, i.e., an increase in the activity of antioxidant enzymes without lipid peroxidation, and, if this exposure is prolonged or repetitive, lipid peroxidation and a decrease in the enzymatic activity could develop, similar to the results of our study. Our results also favor the importance of fasting in the modulation the enzymatic activity of the mitochondria and endoplasmic reticulum on drug metabolism because rats (high metabolic rate) did not ingest anything for more than one hour during the five days in which sevoflurane was administered (groups G2 and G4), which also favors induction of CYP2E1. Most studies have indicated a possible antioxidant effect of sevoflurane^{15,16-34,35}; however, depending on the tissue, this could be beneficial or harmful. For example, the cardiac protection induced by myocardial ischemic preconditioning is a beneficial effect of ROS produced by sevoflurane¹⁶. The production of ROS by sevoflurane would cause the activation of protein kinase C and the consequent opening of potassium channels sensitive to ATP, known as K_{ATP} (ATPase-dependent potassium channel), which have a beneficial effect during myocardial ischemia and reperfusion. Opening of those channels is related with a reduction in the mitochondrial concentration of calcium and greater efficiency in the myocardial use of oxygen during the enzymatic process of ischemia and reperfusion³⁵. But the production of the superoxide anion secondary to the sevoflurane-induced endothelial dysfunction of segments of the aorta is an example of the harmful effects of ROS³⁶.

Note that the drugs used during anesthesia are not the only ones responsible for the imbalance of the antioxidant defense system. The presence of clinical pathologies³⁷, the clinical condition of the patient before arriving at the operating room, the surgical trauma itself^{38,39}, and fasting, mentioned earlier,

are important factors in the promotion of this imbalance.

A particular clinical situation involving the use of sevoflurane should not be forgotten: the use of this halogenated compound in individuals with erythrocyte deficiency of G6PD⁴⁰. Those patients do not have a satisfactory production of NADPH, an important erythrocyte cofactor because it helps, indirectly, the activation of GPx, which is responsible for the elimination of peroxide from red blood cells⁴¹ and also very important for the activation of CAT⁴². Therefore, those individuals are more susceptible to episodes of hemolysis due to the low production of NADPH and, consequently, reduced protection against oxidative agents. The technical option for sevoflurane seems to be pertinent in patients with G6PD deficiency as long it is restricted to a single exposure⁴³. In theory, the risk of hemolysis would be lower, since it promotes an increase in the activity of G6PD, leading to an increase in the production of NADPH.

Patients with tuberculosis, especially those on long-term treatment with CYP2E1 inducers, such as isoniazid, especially the groups known as slow acetylators, deserve special consideration. The association of INH, alcohol, tobacco (CYP2E1 inducers) and G6PD deficiency in inhalational anesthesia with sevoflurane can result in oxidative stress, which damages red blood cells, especially if this use is prolonged and repetitive. If the administration of sevoflurane in patients with genetic deficiency of G6PD is technically required, serial hematocrits, detection of hemoglobin in the urine, and the levels of lactate dehydrogenase and potassium (signs of extravasation of red blood cell contents) are recommended to help detect signs of hemolysis during the anesthetic-surgical procedure. Thus, the use of other anesthetic technique, "antioxidant" and safer, such as total intravenous anesthesia with propofol, would be better to prevent the development of hemolytic anemia⁴⁴.

Summarizing, the results of the present study contribute with laboratorial evidence that the use of sevoflurane, a halogenated anesthetic, in patients using xenobiotic CYP2E1 inducers, such as isoniazid, could favor the production of ROS and weaken, or even exceed, the capacity of the antioxidant defense system to eliminate them, especially if the anesthetic technique chosen is repetitive and/or prolonged.

REFERÊNCIAS – REFERENCES

01. Delfino J, Vale NB, Magalhães E et al. – Estudo comparativo entre sevoflurano e halotano para cirurgia pediátrica de curta duração. *Rev Bras Anesthesiol*, 1997;47:10-15.
02. Stachnik J – Inhaled anesthetic agents. *Am J Health Syst Pharm*, 2006;63:623-634.
03. Kharasch ED, Thummel KE – Identification of cytochrome P450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane and methoxyflurane. *Anesthesiology*, 1993;79:795-807.
04. Intengan HD, Schiffrin EL – Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 2001;38:581-587.
05. Valko M, Izakovic M, Mazur M et al. – Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004;266:37-56.
06. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP et al. – Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 2000;28:1456-1462.
07. Barreiros ALBS, David JM, David JP – Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*, 2006;29:113-120.

08. Cederbaum AI – CYP2E1 – Biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med*, 2006;73:657-672.
09. Koop DR – Alcohol metabolism's damaging effects on the cell: a focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. *Alcohol Res Health*, 2006;29:274-280.
10. Kevin LG, Novalija E, Riess ML et al. – Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth. Analg*, 2003;96:949-955.
11. Wong CH, Liu TZ, Chye SM et al. – Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food Chem Toxicol* 2006;44:1399-1407.
12. Sato N, Fujii K, Yuge O – In vivo and in vitro sevoflurane-induced lipid peroxidation in guinea-pig liver microsomes. *Pharmacol Toxicol*, 1994;75:366-370.
13. Türkan H, Aydin A, Sayal A – Effect of volatile anesthetics on oxidative stress due to occupational exposure. *World J Surg*, 2005;29:540-542.
14. Riess ML, Kevin LG, McCormick J et al. – Anesthetic preconditioning: the role of free radicals in sevoflurane-induced attenuation of mitochondrial electron transport in Guinea pig isolated hearts. *Anesth Analg*, 2005;100:46-53.
15. Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK et al. – Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002; 283:H44-52.
16. De Hert SG, Turani F, Mathur S et al. – Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth Analg*, 2005;100:1584-1593.
17. Beutler E – Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods. 3rd Ed. New York, Grunne Stratton, 1984.
18. Sies H, Koch OR, Martino E et al. – Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett*, 1979;103:287-290.
19. Ho HY, Cheng ML, Chiu DT – Glucose-6-phosphate dehydrogenase – from oxidative stress to cellular function and degenerative diseases. *Redox Rep*, 2007;12:109-118.
20. Gonzalez FJ – The 2006 Bernard B Brodie Award Lecture. *Cyp2e1. Drug Metab Dispos*, 2007;35:1-8.
21. Kharasch ED, Armstrong AS, Gunn K et al. – Clinical sevoflurane metabolism and disposition. II. The role of cytochrome P450 2E1 in fluoride and hexafluoroisopropanol formation. *Anesthesiology*, 1995;82:1379-1388.
22. Rice SA, Sbordone L, Mazze RI – Metabolism by rat hepatic microsomes of fluorinated ether anesthetics following isoniazid administration. *Anesthesiology*, 1980;53:489-493.
23. Park KS, Sohn DH, Veech RL et al. – Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *Eur J Pharmacol*, 1993;248:7-14.
24. Motta MV, Souza DN, Nicolau J – Effects of subtoxic doses of fluoride on some enzymes of the glucose metabolism in submandibular salivary glands of fed and overnight-fasted rats. *Fluoride*, 1999;32:20-26.
25. Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z – Interactions between fluoride and biological free radical reactions. *Fluoride*, 1998;31:43-45.
26. Altikat S, Çiftçi M, Büyükkokuroğlu ME – In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Pol J Pharmacol*, 2002;54:67-71.
27. Kirkman HN, Galiano S, Gaetano GF – The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem*, 1987;262:660-666.
28. Thibodeau EA, Keefe TF – pH-dependent fluoride inhibition of catalase activity. *Oral Microbiol Immunol*, 1990;5(6):328-31.
29. Zhan XA, Wang M, Xu ZR et al. – Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs. *J Trace Elem Med Biol*, 2006;20:83-87.
30. Yesilkaya A, Ertug Z, Yegin A et al. – Deformability and oxidant stress in the red blood cells under the influence of halothane and isoflurane anesthesia. *Gen Pharmacol*, 1998;31:33-36.
31. Durak I, Guven T, Birey M et al. – Halothane hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in guinea pigs; the effects of vitamin E. *Can. J. Anaesth*, 1996;43:741-748.
32. Bezerra FJL, Rezende AA, Rodrigues SJ et al. – Thiobarbituric acid reactive substances as an index of lipid peroxidation in sevoflurane-treated rats. *Rev Bras Anesthesiol*, 2004;54:640-649.
33. Dikmen B, Unal Y, Pampal HK et al. – Effects of repeated desflurane and sevoflurane anesthesia on enzymatic free radical scavenger system. *Mol Cell Biochem*, 2007;294:31-36.
34. Riess ML, Stowe DF, Warltier DC – Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004; 286:H1603-1607.
35. Bouwman RA, Musters RJ, Van Beek-Harmsen BJ et al. – Reactive oxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*, 2004;100:506-514.
36. Yoshida K, Okabe E – Selective impairment of endothelium-dependent relaxation: by sevoflurane oxygen free radicals participation. *Anesthesiology*, 1992;76:440-447.
37. Cemek M, Caksen H, Bayiroğlu F et al. – Oxidative stress and enzymic non-enzymic antioxidant responses in children with acute pneumonia. *Cell Biochem Funct*, 2006;24:269-273.
38. Koksall GM, Sayilgan C, Aydin S et al. – The effects of sevoflurane and desflurane on lipid peroxidation during laparoscopic cholecystectomy. *Eur J Anaesthesiol*, 2004;21:217-220.
39. Urena R, Mendez F, Ruiz-Deya G et al. – Does prolonged pneumoperitoneum affect oxidative stress compared with open surgical procedures? *J Endourol*, 2005;19:221-224.
40. Cappellini MD, Fiorelli G – Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 2008;371:64-74.
41. Spolarics Z – Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid. *J Leukoc Biol*, 1998;63:534-541.
42. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M et al. – Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 1996;87:1595-1599.
43. Massa EC, Federmann S – Ambulatory anesthesia in deficiency glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Internet J Anesthesiol*, 2007;11(2). Disponível em: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ija/vol11n2/g6pd.xml>. Acesso em 27 de abril de 2008.
44. Huang CH, Wang YP, Wu PY et al. – Propofol infusion shortens and attenuates oxidative stress during one lung ventilation. *Acta Anaesthesiol Taiwan*, 2008;46:160-165.

RESUMEN

Bezerra FJL, Vale NB, Macedo BO, Rezende AA, Almeida MG – Evaluación de Parámetros Antioxidantes en Ratones Tratados con Sevoflurano.

JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS: El sevoflurano es un éter halogenado con flúor que sufre una biotransformación hepática a través del citocromo P450 2E1. Los éteres halogenados que sufren biotransformación por el P450 2E1, pueden generar especies reactivas del oxígeno (ERO) y promover el debilitamiento del sistema de defensa antioxidante. El objetivo de este trabajo fue investigar la relación entre la actividad de las enzimas antioxidantes eritrocitarias y el sevoflurano.

MÉTODO: Los animales fueron distribuidos en cuatro grupos: Grupo 1 control: apenas oxígeno a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 días consecutivos); Grupo 2 – sevoflurano 4,0% en oxígeno a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 días consecutivos); Grupo 3 – isoniazida (i.p.), 50 mg.kg⁻¹ de peso corporal /día, durante 4 días y enseguida tratados apenas con oxígeno a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 días consecutivos); Grupo 4 – isoniazido por vía intraperitoneal en dosis de 50 mg.kg⁻¹ de peso corporal, diariamente durante 4 días, seguido de la administración del sevoflurano a 4,0% en oxígeno a 100% (1 L.min⁻¹ por 60 minutos durante 5 días). Después de 12 horas de la última exposición al sevoflurano, los animales se sacrificaron y la sangre se recolectó a través de la vena porta para el análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes.

RESULTADOS: Aumento de la actividad específica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, reducción de la actividad específica de la catalasis, principalmente en el grupo de animales pretratados con isoniazida y enseguida, tratados con sevoflurano. El glutatión peroxidasa no presentó ninguna alteración en su actividad.

CONCLUSIONES: La interacción del sevoflurano con inductores enzimáticos del citocromo P450 2E1 puede propiciar la instalación del estrés oxidativo en el caso que la exposición se prolongue y sea repetitiva.