



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Isoflurano fornece neuroproteção em lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal por inibição da apoptose



De-An Zhao*, Ling-Yun Bi, Qian Huang, Fang-Min Zhang e Zi-Ming Han

The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Department of Pediatrics, Weihui, China

Recebido em 16 de fevereiro de 2015; aceito em 22 de abril de 2015

PALAVRAS-CHAVE

Isoflurano;
Hipocampo;
Lesão cerebral;
Neuroproteção;
Apoptose

Resumo

Justificativa e objetivos: Isoflurano é um éter volátil halogenado usado para anestesia por via inalatória. É amplamente usado na clínica como um anestésico para inalação. A lesão hipóxico-isquêmica neonatal ocorre no cérebro imaturo e resulta em morte celular tardia via excitotoxicidade e estresse oxidativo. Isoflurano mostrou ter propriedades neuroprotetoras que formam uma base benéfica para o seu uso tanto em cultura de células quanto em modelos animais, incluindo vários modelos de lesão cerebral. Nosso objetivo foi determinar o efeito neuroprotetor de isoflurano em hipóxia cerebral e elucidar o mecanismo subjacente.

Métodos: Fatias de hipocampo, em fluido cerebrospinal artificial (CSFA) com glicose e privação de oxigênio, foram usadas como um modelo *in vitro* de hipóxia cerebral. O pico de população ortodrômica (PPO) e o potencial de lesão hipóxica (PLH) foram registrados nas regiões CA1 e CA3. A concentração de neurotransmissores de aminoácidos na solução de perfusão das fatias de hipocampo foi medida.

Resultados: O tratamento com isoflurano retardou a eliminação do PPO e melhorou a recuperação do PPO; diminuiu a frequência do PLH, retardou o início do PLH e aumentou a duração do PLH. O tratamento com isoflurano também diminuiu a liberação de neurotransmissores de aminoácidos induzida pela hipóxia, como aspartato, glutamato e glicina, mas os níveis de ácido γ -aminobutírico (GABA) estavam elevados. Estudos morfológicos mostram que o tratamento de edema com isoflurano atenuou o edema de neurônios piramidais na região CA1. Também reduziu a apoptose, como mostrado pela expressão reduzida da caspase-3 e genes PARP.

Conclusões: Isoflurano mostrou um efeito neuroprotetor na lesão neuronal no hipocampo induzida por hipóxia através da supressão de apoptose.

© 2016 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mail: zhaodean17@gmail.com (D-A. Zhao).

KEYWORDS

Isoflurane;
Hippocampus;
Brain injury;
Neuroprotection;
Apoptosis

Isoflurane provides neuroprotection in neonatal hypoxic ischemic brain injury by suppressing apoptosis

Abstract

Background and objectives: Isoflurane is halogenated volatile ether used for inhalational anesthesia. It is widely used in clinics as an inhalational anesthetic. Neonatal hypoxic ischemia injury ensues in the immature brain that results in delayed cell death via excitotoxicity and oxidative stress. Isoflurane has shown neuroprotective properties that make a beneficial basis of using isoflurane in both cell culture and animal models, including various models of brain injury. We aimed to determine the neuroprotective effect of isoflurane on hypoxic brain injury and elucidated the underlying mechanism.

Methods: A hippocampal slice, in artificial cerebrospinal fluid with glucose and oxygen deprivation, was used as an in vitro model for brain hypoxia. The orthodromic population spike and hypoxic injury potential were recorded in the CA1 and CA3 regions. Amino acid neurotransmitters concentration in perfusion solution of hippocampal slices was measured.

Results: Isoflurane treatment caused delayed elimination of population spike and improved the recovery of population spike; decreased frequency of hypoxic injury potential, postponed the onset of hypoxic injury potential and increased the duration of hypoxic injury potential. Isoflurane treatment also decreased the hypoxia-induced release of amino acid neurotransmitters such as aspartate, glutamate and glycine induced by hypoxia, but the levels of γ -aminobutyric acid were elevated. Morphological studies showed that isoflurane treatment attenuated edema of pyramid neurons in the CA1 region. It also reduced apoptosis as evident by lowered expression of caspase-3 and PARP genes.

Conclusions: Isoflurane showed a neuro-protective effect on hippocampal neuron injury induced by hypoxia through suppression of apoptosis.

© 2016 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

As lesões cerebrais hipóxicas causam várias condições patológicas, o que também pode ocorrer durante cirurgias cardíacas e neurológicas. O mecanismo subjacente desse tipo de lesão cerebral ainda não foi esclarecido. Como proteger o cérebro de uma lesão hipóxêmica e como tratar tal lesão cerebral continua a ser um desafio clínico. Os tratamentos com hipotermia e pré-isquemia apresentaram efeito protetor sobre o cérebro,^{1,2} mas são difíceis de fazer clinicamente, enquanto os tratamentos farmacológicos são clinicamente mais práticos. Durante as últimas três décadas, o efeito neuroprotetor dos anestésicos tem atraído grande atenção dos clínicos.

Isoflurano [2-cloro-2-[difluorometoxi]-1; 1,1-trifluoro-etano, CHF₂-O-CHCl-CF₃] é um éter halogenado usado para anestesia por inalação. Juntamente com enflurano e halotano, substituiu os éteres inflamáveis usados nos primórdios da cirurgia. Por ser um isômero estrutural do enflurano, recebeu o nome de isoflurano e, portanto, ambos têm a mesma fórmula empírica. É uma mistura racêmica dos isômeros óticos R e S. Atualmente, seu uso médico em seres humanos começa a diminuir. É substituído por sevoflurano, desflurano e pelo anestésico intravenoso propofol. O uso de isoflurano ainda é frequente em anestesia veterinária. Propofol pode reduzir o fluxo sanguíneo arterial no cérebro, a pressão intracraniana e o metabolismo e manter o suprimento de sangue e a taxa de oxigênio. Propofol melhorou

o suprimento de oxigênio durante a hipóxia, o que sugere efeitos protetores contra a hipóxia cerebral.³⁻⁵ Estudos sugerem que propofol desempenha um papel na proteção do sistema nervoso central (SNC) através da modulação de Ca²⁺, radicais livres de oxigênio, receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) e receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA).⁶⁻⁹ Contudo, alguns dados sugerem que propofol não apresentou efeito protetor cerebral após cirurgia cardíaca e até piorou a hipóxia cerebral¹⁰ e que a hipotermia, e não propofol, é um neuroprotetor.¹ Todos os anestésicos voláteis diferem em potência, efeitos adversos e custos e são amplamente usados durante a cirurgia em humanos recém-nascidos e durante a pesquisa neonatal em animais. Em estudos de lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal, isoflurano mostrou ter funções neuroprotetoras.¹¹ Isoflurano foi estudado em modelos animais de várias doenças, como inflamação pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos (LPS),¹² lesão pulmonar aguda,¹³ estresse oxidativo induzido por glicose,¹⁴ lesão renal por isquemia/reperfusão¹⁵ e lesão cardíaca.¹⁶ Isoflurano mostrou fornecer proteção contra lesão e melhorar vários resultados funcionais negativos nesses modelos.

A hipóxia-isquemia neonatal é uma das principais causas de mortalidade e déficits neurológicos, como paralisia cerebral, retardo mental e epilepsia no período perinatal.¹⁷ Vários fatores fisiopatológicos foram implicados na hipóxia-isquemia, incluindo mediadores inflamatórios, excitotoxicidade e estresse oxidativo.¹⁸ O uso de isoflurano

como anestésico em cirurgia para a modelagem de hipóxia-isquemia neonatal levou a especulações de que isoflurano pode ter efeitos protetores em recém-nascidos. Em particular, isoflurano mostra neuroproteção em vários modelos de AVC, incluindo hemorragia subaracnoidea (HSA),¹⁹ oclusão da artéria cerebral média (OACM),^{20,21} hemorragia intracerebral,²² lesão cerebral traumática²³ e lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal.²⁴ Um estudo mostrou que duas horas de exposição a isoflurano não causaram neuroapoptose em cérebros de adultos e sugere que a demora em reduzir os processos gliais após a exposição a isoflurano pode explicar por que alguns anestésicos voláteis podem conferir neuroproteção após acidente vascular cerebral experimental.²⁵

Alega-se que isoflurano é tanto neuroprotetor quanto neurotóxico; entretanto, a alegação de que isoflurano causa apoptose neural permanece controversa. Neste estudo, investigamos os efeitos da exposição de isoflurano a fatias de hipocampo cerebral de ratos e avaliamos a função apoptótica. Para investigar os efeitos e mecanismos de isoflurano, avaliamos as alterações neurológicas e os graus de neurogênese e apoptose em ratos após serem expostos a várias concentrações de isoflurano. O objetivo geral deste estudo foi encontrar evidências que demonstrassem que o tratamento com isoflurano tem efeitos neuroprotetores no cérebro durante a hipóxia. Semelhantemente aos resultados de vários estudos, não encontramos evidência de morte celular cerebral ou neurogênese em tecidos cerebrais de hipóxia-isquemia neonatal após anestesia com isoflurano.

Métodos

Animais experimentais

Todos os protocolos de pesquisa com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da instituição. Os animais foram alojados e mantidos sob o protocolo definido em ciclos de claro-escuro (12 horas) e em temperatura ambiente mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Sessenta ratos Sprague Dawley (SD), no sétimo dia pós-natal (peso: 16-18 g), foram alocados randomicamente em cinco grupos ($n = 12$): Grupo (i) recebeu tratamento de normóxia para controle. Quarenta e oito ratos SD foram submetidos à hipóxia e, em seguida, redistribuídos em quatro grupos para: (ii) hipóxia (Hx); (iii) HX-isoflurano a 0,5%; (iv) HX-isoflurano a 1,5%; (v) HX-isoflurano a 2,5%.

Hipóxia-isquemia neonatal

Os ratos dos grupos (ii-v) foram anestesiados com halotano a 3% e posteriormente submetidos a uma incisão cervical de 3 mm na linha média, de acordo com o procedimento padrão. A artéria carótida esquerda foi exposta e coagulada com o uso de uma unidade de eletrocautério bipolar; em seguida, a incisão cirúrgica foi fechada por meio de adesivo tópico. Após um período de recuperação de 3 horas, os ratos foram colocados em uma câmara como O_2 a 8% e N_2 a 92% por 45 minutos. A temperatura da câmara foi mantida a 37°C . Os ratos do grupo controle (tempo zero) foram submetidos à exploração da artéria carótida esquerda sem cauterização.

Exposição a isoflurano

Os ratos foram preparados para a exposição a isoflurano após 18 h de hipóxia. Foram colocados em contêineres de plástico e expostos a isoflurano por 6 h ininterruptas. Usou-se ar como transportador com um fluxo total de gás de $2\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Durante a exposição a isoflurano, os contêineres foram mantidos a 37°C mediante um dispositivo de aquecimento. Os níveis de isoflurano, oxigênio e dióxido de carbono foram monitorados na câmara via monitor de gás. Após 6 h, a administração de isoflurano foi interrompida e os ratos foram expostos somente a ar. Após observar a sua livre movimentação, os ratos foram recolocados nas gaiolas maternas. A frequência respiratória e a cor da pele dos ratos foram monitoradas durante a exposição a isoflurano. Os ratos observados com qualquer caso de apneia ou hipóxia foram imediatamente expostos a ar e excluídos da experiência. Os ratos do grupo controle foram colocados em contêiner semelhante ao dos ratos do grupo isoflurano, mas foram expostos somente a ar por 6 h.

Preparação tecidual

Após o período de recuperação, os ratos foram anestesiados com isoflurano. A perfusão transcardíaca foi feita com fosfato de formalina tamponada a 10%, de acordo com o protocolo anterior. Os cérebros foram extraídos dos crânios mediante procedimento cirúrgico e armazenados em formol tamponado a 10% por 48 h. Em seguida, o tecido foi congelado-seccionado em fatias de 30 mm, com um microtomo Leica SM2000R (Leica, Alemanha). Seções da região do hipocampo foram selecionadas de forma randômica para a análise histológica e outros estudos.

Exame histopatológico

Os ratos expostos a isoflurano, bem como os do grupo controle, foram sacrificados após 6 h ($n = 3$). As fatias de hipocampo dos ratos de cada grupo foram fixadas em metanol a 0,1% e embebidas em cera após a desidratação. Blocos de tecido foram cortados em fatias de 5 mm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE), de acordo com o protocolo padrão. Os resultados foram examinados em detalhe sob um microscópio de luz para determinar as alterações morfológicas em partes das regiões CA1 e CA3.

Registro do potencial extracelular

Sondas elétricas foram inseridas nas fibras colaterais de Schaffer em CA3 e o potencial extracelular foi registrado como descrito anteriormente. Estímulos (0,6 mA, 0,1 Hz, 100 ms) foram aplicados a intervalos de 10 segundos. Os potenciais evocados, incluindo a população de pico ortodrômico (PPO), e o potencial de lesão hipóxêmica (PLH) foram registrados em CA1. Somente as fatias cerebrais com PPO (43 mV) durante pelo menos 20 min foram selecionadas para as experiências. Os grupos hipóxicos foram incubados em LCRa sem glicose e oxigênio (LCRa-GO) por 15 min, seguido de perfusão com LCRa normal. Nos grupos submetidos à hipóxia e tratamento, todas as PPO foram registradas antes de

desaparecer. Cada grupo continha oito amostras. O decaimento de PPO foi definido como o período de tempo no qual uma PPO tornou-se indetectável após a privação de oxigênio. A amplitude da recuperação de uma PPO foi definida como a proporção da amplitude de PPO após uma hora de perfusão com LCRa normal durante a amplitude de PPO antes da privação de oxigênio. A taxa de recuperação da PPO foi definida como a porcentagem de fatias do hipocampo nas quais a recuperação da amplitude de PPO atingiu 60% da amplitude de PPO antes da privação de oxigênio. O início do PLH foi definido como o período de tempo no qual o PLH foi registrado após a privação de oxigênio. A duração do PLH foi definida como o tempo de duração do PLH. A incidência de PLH foi definida como a porcentagem de fatias do hipocampo nas quais os PLH foram registrados após a privação de oxigênio.

Análise em líquido cromatográfico de alto desempenho (LCAD)

As fatias de hipocampo dos ratos de cada grupo ($n = 3$) foram incubadas em LCRa (NaCl 124 mM; KCl 3,3 mM; NaH₂PO₄ 1,24 mM; MgSO₄ 2,4 mM; NaHCO₃ 25,7 mM; CaCl₂ 2,4 mM) com e sem glicose (10,0 mM) a 37,5 °C por 2-2,30 h. O volume de fluxo foi de 200 mL.min.L⁻¹. Após 15 min, o LCRa de perfusão de cada grupo foi coletado e centrifugado para sobrenadante límpido. O sobrenadante foi processado para análise em LCAD de acordo com o protocolo padrão, com as modificações necessárias. A fase móvel A foi constituída por acetato de sódio (0,5 M, pH 6) com 0,05% de THF. A fase móvel B foi constituída por metanol. Os seguintes gradientes de lavagem (minutos, Fase B%) foram usados: 0, 30%; 7, 60%; 9, 30%; com velocidade de 0,9 mL.min⁻¹, temperatura a 35 °C, λ_{em} a 330 nm e λ_{ex} a 456 nm. Os agentes de derivação usados foram OPA, 2-MCE, hidróxido de sódio-ácido bórico e metanol (pH 9,6). Os agentes de derivação (25 mL) e as amostras (25 mL) foram incubadas por 2 min à temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 20 mL. As curvas padrão foram preparadas com 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mM de Asp, Glu, Gln, Gly ou GABA (grau do LCAD). As concentrações (mM) de Asp, Glu, Gln, Gly e GABA na perfusão do LCRa foram calculadas com base nas curvas padrão.

PCR em tempo real (PCR-TR)

As fatias de hipocampo de cada grupo ($n = 3$) foram congeladas rapidamente a 80 °C em tubos para microcentrífuga livres de RNase no momento da dissecação para PCR-TR. O RNA total foi isolado dos tecidos com o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. RNA total (1 µg) foi incubado com 200 ng de hexâmeros aleatórios, 0,5 mM dNTPs e água livre de RNase a 65 °C por 10 min (Invitrogen). Em seguida, tampão de primeira cadeia (5×), 5 mM DTT, 40 U de ARNase A e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript III) foram adicionados. A mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente por 5 min e, em seguida, a 50 °C por 60 min, a 70 °C por 15 min e a 4 °C por 10 min. PCR quantitativa em tempo real foi feita com o Sistema ABI 7500 para PCR em Tempo Real (Applied Biosystems). Os ensaios para os níveis-alvo de DNAC foram feitos com sondas TaqMan MGB marcadas com corante FAM

(Applied Biosystems) em uma reação de 20 µL com 2 µL de DNAC, corantes de referência passiva ROX e mistura TaqMan Universal PCR (Applied Biosystems). Os conjuntos de *primers* específicos usados e seus números de sequência são: poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) 25591 Rn00565018_mL e caspase-3 (Casp-3), cisteína protease relacionada à apoptose 25402 Rn00563902_mL. As quantidades relativas de ambos os RNAm foram determinadas pela normalização de seus níveis a 18S no mesmo DNAC.

Análise estatística

Todos os valores foram expressos em média com desvio padrão (DP). Os dados foram analisados com os programas estatísticos SPSS v.17 e Systat SigmaPlot 10.0. A significância estatística foi calculada com o teste *t* de Student e análise de variância simples (Anova) para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Efeito do tratamento com isoflurano sobre PPO e PLH após hipóxia-isquemia neonatal

PPO e PLH foram registrados na região CA1. No grupo hipóxia, o tempo médio de decomposição da PPO foi de 144 ± 21 s; a taxa de recuperação da PPO foi de 22% e a amplitude de recuperação foi de $24 \pm 9\%$. Em 1,5% e 2,5% dos grupos expostos a isoflurano, o tempo de decomposição da PPO foi significativamente prolongado e a taxa e a amplitude de recuperação da PPO aumentaram, em comparação com os valores do grupo hipóxia. Não houve alteração significativa do tempo de decomposição, amplitude e porcentagem de recuperação da PPO no grupo exposto a isoflurano a 0,5% (fig. 1A). No grupo hipóxia, o tempo médio para o início do PLH foi de 403 ± 56 s; a duração média do PLH foi de 104 ± 14 s e a incidência do PLH foi de aproximadamente 100%. A incidência do PLH foi reduzida, o início do PLH foi retardado e a duração do PLH foi prolongada em 1,5% e 2,5% dos grupos expostos a isoflurano, em comparação com os valores do grupo hipóxia. Os parâmetros acima não foram estatisticamente significativos no grupo exposto a isoflurano a 0,5% (fig. 1B).

Efeito da exposição a isoflurano sobre a liberação de aminoácidos neurotransmissores

Os aminoácidos neurotransmissores, como aspartato (Asp), glutamato (Glu), glutamina (Gln), glicina (Gli) e GABA, são comumente circulantes e têm funções importantes no SNC. A alta concentração de aminoácidos excitatórios (AAE) na fenda sináptica e o líquido extracelular durante a hipóxia são uma via comum que causa toxicidade excitatória e morte neuronal. A maioria dos ensaios de aminoácidos neurotransmissores mede a quantidade total de aminoácidos em áreas ou núcleos específicos do cérebro que também podem conter aminoácidos provenientes do metabolismo de proteínas. Logo, a quantidade total de aminoácidos no hipocampo pode não refletir a quantidade de aminoácidos como

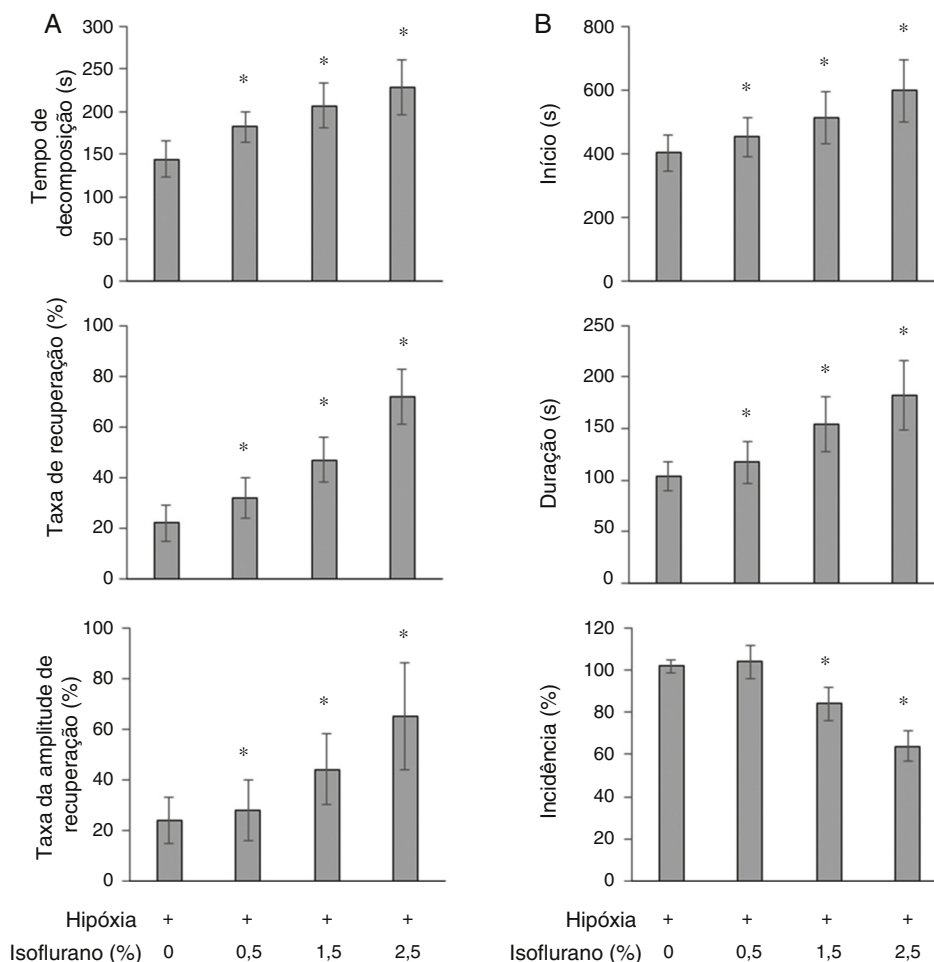


Figura 1 O efeito de isoflurano sobre PPO e PLH. Tempo de decomposição (s), taxa de recuperação (%) e amplitude de recuperação (%) da PPO (A); o início (s), a duração (s) e a incidência (%) do PLH (B) foram estimados como descrito na seção Métodos ($n = 3$; $*p < 0,05$ vs. grupo hipóxia).

um neurotransmissor. Neste estudo, medimos diretamente a concentração de aminoácidos neurotransmissores na solução de perfusão das fatias do hipocampo durante a hipóxia com LCAD. As concentrações dos neurotransmissores Asp, Glu, Gli e GABA foram significativamente elevadas ($p < 0,05$) no grupo hipóxia em comparação com as do grupo controle-normóxia (tabela 1). As concentrações de Asp, Glu, Gli e GABA aumentaram em 1,32; 1,27; 1,78 e 1,17 vezes, respectivamente. A exposição a isoflurano reduziu os níveis de Asp, Glu e Gli de forma dose-dependente, especialmente em 1,5% e 2,5%. Porém, a exposição a isoflurano aumentou

continuamente os níveis de liberação de GABA, com significância estatística. O nível de liberação Gln não foi alterado pela hipóxia ou pela exposição a isoflurano (tabela 1).

Isoflurano melhora as alterações morfológicas em fatias de hipocampo hipóxico

Os estudos histológicos com a coloração com HE (fig. 2) mostraram que os neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo ficaram intumescidos. As bordas celulares

Tabela 1 O efeito de isoflurano na liberação de aminoácidos neurotransmissores das fatias de hipocampo (pmol.L^{-1})

Grupo	Asp	Glu	Gln	Gli	GABA
Controle	2,03 ± 0,12	1,85 ± 0,12	0,77 ± 0,05	1,05 ± 0,07	1,79 ± 0,08
Hipóxia (Hx)	2,68 ± 0,14 ^a	2,35 ± 0,09 ^a	0,76 ± 0,05	1,87 ± 0,04 ^a	2,09 ± 0,06 ^a
Hx-ISF 0,5%	2,61 ± 0,15 ^a	2,42 ± 0,11 ^a	0,75 ± 0,04	1,78 ± 0,07 ^a	2,21 ± 0,09 ^{a,b}
Hx-ISF 1,5%	2,44 ± 0,13 ^{a,b}	2,01 ± 0,14 ^{a,b}	0,71 ± 0,05	1,65 ± 0,09 ^a	2,43 ± 0,12 ^{a,b}
Hx-ISF 2,5%	2,41 ± 0,14 ^{a,b}	1,92 ± 0,12 ^b	0,72 ± 0,04	1,57 ± 0,07 ^{a,b}	2,55 ± 0,14 ^{a,b}

ISF, isoflurano.

^a $p < 0,05$ vs. grupo controle-normóxia.

^b $p < 0,05$ vs. grupo hipóxia.

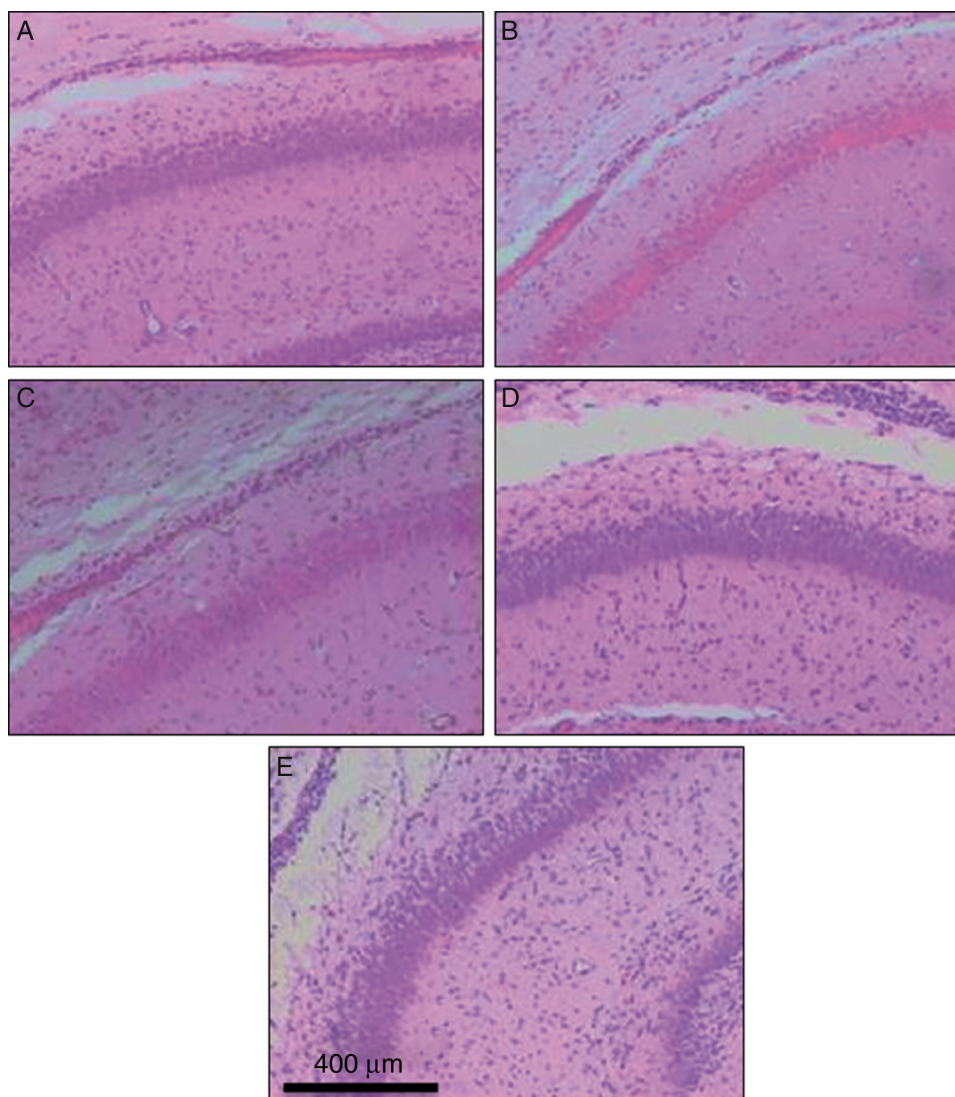


Figura 2 Coloração com HE das fatias de hipocampo. (A) controle normóxia; (B) hipóxia (Hx); (C) Hx-isoflurano a 0,5%; (D) Hx-isoflurano a 1,5%; (E) Hx-isoflurano a 2,5%. A coloração com HE foi feita como descrito na seção Métodos ($n = 3$).

ficaram indistintas e os núcleos diminuíram e escureceram. Os dados da coloração sugerem que danos celulares ocorreram no grupo hipóxia. Além disso, o tratamento com isoflurano melhorou essas alterações morfológicas induzidas por hipóxia nos neurônios piramidais de modo dose-dependente.

Isoflurano suprimiu a apoptose induzida por hipóxia-isquemia neonatal

Quantificamos os níveis de RNAm do PARP e da caspase-3 no hipocampo com a PCR-TR. As quantidades relativas a ambos os RNAm foram determinadas pela normalização de seus níveis a 18S no mesmo DNAc. Os níveis da expressão log dos genes foram expressos em termos de alteração em dobro, em comparação com os níveis dos animais de controle. A [figura 3](#) mostra que o RNAm da caspase-3 aumentou cerca de duas vezes após hipóxia-isquemia neonatal, em comparação com o grupo controle-normóxia. Aumentos de

RNAm na caspase-3 são uma evidência direta da indução de apoptose em fatias do hipocampo. A indução de apoptose requer a ativação da caspase-3, que cliva o substrato nuclear PARP. A análise do RNAm do PARP mostrou que o seu nível aumentou 1,86 vez após a hipóxia, em comparação com o grupo controle-normóxia. Os aumentos do RNAm do PARP confirmaram a indução de apoptose em fatias do hipocampo. Além disso, a exposição de isoflurano a esses tecidos mostrou redução dose-dependente dos níveis de expressão de ambos os genes. Isoflurano diminuiu os níveis de RNAm do PARP e da caspase-3 com significância estatística. Esses resultados mostram que a apoptose induzida por hipóxia-isquemia neonatal é suprimida pela exposição a isoflurano.

Discussão

Este estudo investigou os efeitos do anestésico volátil isoflurano sobre os possíveis mecanismos de neuroproteção e neurotoxicidade induzidas pelo anestésico no hipocampo

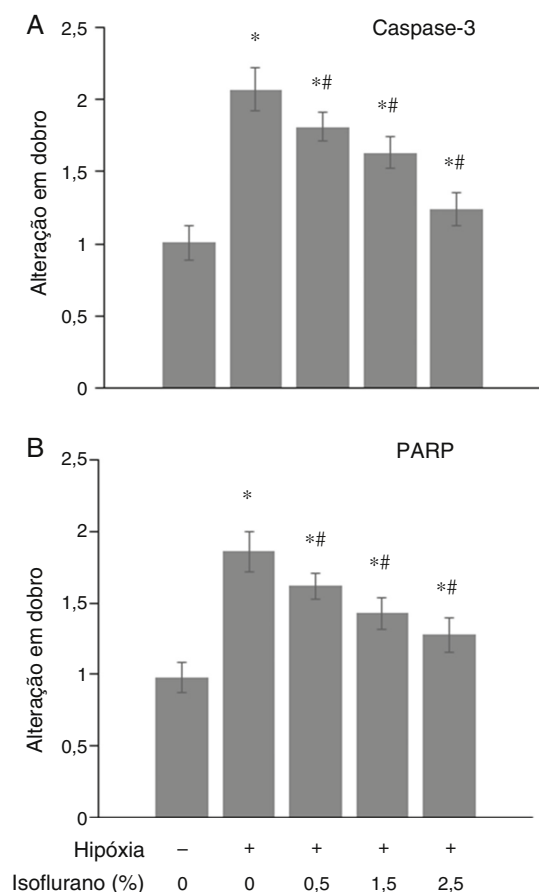


Figura 3 PCR quantitativa em tempo real (PCRq-TR) para a caspase-3 (A) e PARP (B). RNA total foi isolado de fatias de hipocampo ($n = 3$). DNAC foi sintetizado e a PCRq-TR foi feita como descrito na seção Métodos.

cerebral de ratos sob hipóxia-isquemia. Observamos principalmente que isoflurano não altera a neurogênese e não causa a morte celular neuronal em várias formações do hipocampo. Nossas descobertas demonstram que isoflurano proporciona neuroproteção ao suprimir a apoptose induzida por hipóxia.

Fatias de hipocampo são comumente usadas em pesquisas de lesão cerebral induzida por hipóxia e de sua proteção farmacológica. Os neurônios piramidais do hipocampo são as células mais sensíveis à hipóxia, dos quais os neurônios piramidais em CA1 são mais vulneráveis à hipóxia. Como as sinapses são formadas entre CA1 e CA3, a população de pico ortodrômico (PPO) pode ser registrada em CA1 quando as colaterais de Schaffer estão em CA3. Consequentemente, a PPO demonstra alterações aparentes durante a hipóxia. Estudos anteriores demonstraram uma redução na amplitude da PPO durante a hipóxia, um indicador de disfunção sináptica e perda da capacidade excitatória. Essas alterações da PPO são reversíveis se o suprimento de oxigênio for restaurado a tempo e o atraso no desaparecimento da PPO sugere que os neurônios são menos vulneráveis à hipóxia.²⁶ Portanto, o tempo de decomposição da PPO pós-hipóxia pode ser usado como um parâmetro para avaliar a tolerância dos neurônios. O potencial de lesão hipóxico-isquêmica (PLH) é um indicador de dano hipóxico irreversível induzido em fatias

de hipocampo.^{27,28} O início e a duração do PLH estão correlacionados com o dano hipóxico. O aparecimento mais prolongado de PLH correlaciona com recuperação mais fácil para a fatia de hipocampo após a restauração do suprimento de oxigênio. Se o aparecimento do PLH for postergado ou prolongado, o dano neuronal será adiado.

Investigamos como isoflurano afeta os potenciais evocados em fatias de hipocampo hipóxico. Nos grupos hipóxia, o tempo médio de decomposição da PPO foi de aproximadamente 144 segundos, a taxa de recuperação e a amplitude da PPO diminuíram após a restauração de oxigênio e suprimento de glicose (fig. 1A). Esse resultado indicou que houve dano hipóxico na transmissão sináptica entre os neurônios do hipocampo. A exposição a isoflurano causou aumento dose-dependente da taxa de recuperação da PPO e da amplitude da PPO. Isso sugere que o tratamento com isoflurano aumentou a tolerância da fatia de hipocampo à hipóxia. O atraso no início do PLH, a extensão da duração do PLH e a redução da incidência do PLH com doses diferentes de isoflurano também demonstraram que a exposição a isoflurano adia a ocorrência de danos hipóxicos irreversíveis e aumenta a duração dos danos reversíveis. Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com isoflurano reduz o dano hipóxico de neurônios e protege as funções sinápticas de danos hipóxicos.

O efeito protetor de isoflurano pode advir da inibição de um aminoácido neurotransmissor como Glu, um neurotransmissor importante da região CA1 do hipocampo. Relatos sugerem que os aminoácidos excitatórios (AAE), incluindo Glu e Asp, desempenham um papel fundamental no mecanismo de lesão cerebral hipóxêmica.²⁹⁻³¹ O receptor de NMDA é um importante receptor de AAE e sua ativação resulta na sobrecarga de Ca^{2+} intracelular na hipóxia.^{32,33} No grupo hipóxia, as concentrações de Asp e Glu na solução de perfusão aumentaram 1,32 e 1,27 vez, respectivamente (tabela 1). O tratamento com isoflurano reduziu a liberação de Asp e Glu induzida por hipóxia e reduziu assim a toxicidade excitatória. GABA é um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central que pode proteger os neurônios contra danos hipóxicos.^{34,35} Este estudo mostrou que o tratamento com isoflurano pode aumentar a concentração de GABA no líquido de perfusão, o que pode ser um mecanismo neuroprotetor de isoflurano durante a hipóxia. Relatou-se que outro anestésico (propofol) aumenta a afinidade entre GABA e seu receptor; dessa forma, ativa diretamente o receptor de GABA para resultar em melhoria do fluxo de corrente pela membrana e a inibição hipopolarizada induzida por GABA.³ Glicina (Gli) é um modulador de AAE que aumenta a sensibilidade do receptor de NMDA aos AAE e amplifica a toxicidade excitatória induzida por EAA.³⁶⁻³⁸ Observamos que a Gli estava aumentada no grupo hipóxia, o que pode facilitar a toxicidade excitatória (tabela 1). O tratamento com isoflurano reverteu o aumento da concentração de Gli induzida por hipóxia de um modo dose-dependente, o que sugere os efeitos protetores de isoflurano no SNC. Os dados não mostraram efeito de isoflurano sobre a liberação de Gln, o que pode não estar diretamente associado ao mecanismo neuroprotetor de isoflurano. A hipóxia cerebral pode provocar exaustão de ATP, influxo de Na^+ e Cl^- e efluxo de K^+ e H_2O e resultar em edema celular. Em contraste, a liberação excessiva de Glu superexcita os neurônios e provoca um influxo de Ca^{2+} e

aumento dos receptores de NMDA dependentes do influxo de Ca^{2+} . Isso resulta em sobrecarga de Ca^{2+} intracelular que inicia a ativação enzimática, hidrólise proteica, formação de radicais livres de oxigênio, danos ao DNA e morte celular neuronal. Nossos dados mostram que isoflurano diminui o edema celular induzido por hipóxia e o dano mitocondrial. Com base nos dados, conjecturamos que outros potenciais mecanismos pelos quais isoflurano exerce proteção contra os danos hipoxêmicos ao SNC incluem a modulação de Ca^{2+} , a depuração de radicais livres de oxigênio, a sobrerregulação do receptor de GABA e a inibição do receptor de NMDA. Além disso, descobrimos que o tratamento com isoflurano causou a inibição dos níveis de RNAm da caspase-3 e do PARP induzidos por hipóxia. A apoptose pode ser executada principalmente por duas vias: a via intrínseca (mitocondrial) dependente da caspase-9 e a via extrínseca dependente da caspase-8. Ambas levam à ativação do executor da caspase-3 que, eventualmente, provoca a morte celular por clivagem de uma série de substratos nucleares e citoplasmáticos como o PARP. Este estudo descobriu que isoflurano suprimiu os níveis de expressão dos genes apoptóticos da caspase-3 e do PARP, de forma dose-dependente (fig. 3).

Em conclusão, a exposição a isoflurano fornece neuroproteção contra lesões hipóxico-isquêmicas cerebrais em ratos. A exposição a isoflurano reduz o dano hipoxêmico aos neurônios e protege as funções sinápticas de danos hipoxêmicos. Isoflurano reduz os níveis de liberação de Asp e Glu induzidos por hipóxia e aumenta a liberação de GABA. Esses aminoácidos neurotransmissores ajudam a proteger contra danos hipoxêmicos ao SNC. O mecanismo básico por trás dessa neuroproteção parece ser a inibição da apoptose induzida por hipóxia. Este estudo incide luz sobre o uso de isoflurano como um anestésico seguro em práticas clínicas, bem como em práticas veterinárias.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Feiner JR, Bickler PE, Estrada S, et al. Mild hypothermia, but not propofol, is neuroprotective in organotypic hippocampal cultures. *Anesth Analg.* 2005;100:215–25.
- Kataoka K, Yanase H. Mild hypothermia – A revived countermeasure against ischemic neuronal damages. *Neurosci Res.* 1998;32:103–17.
- Hara M, Kai Y, Ikemoto Y. Propofol activates GABAA receptor-chloride ionophore complex in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat. *Anesthesiology.* 1993;79:781–8.
- Kochs E, Hoffman WE, Werner C, et al. The effects of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome, and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. *Anesthesiology.* 1992;76:245–52.
- Hans P, Bonhomme V, Collette J, et al. Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1994;6:249–53.
- Daskalopoulos R, Korcok J, Farhangkhgoee P, et al. Propofol protection of sodium-hydrogen exchange activity sustains glutamate uptake during oxidative stress. *Anesth Analg.* 2001;93:1199–204.
- Grasshoff C, Gillissen T. The effect of propofol on increased superoxide concentration in cultured rat cerebrocortical neurons after stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Anesth Analg.* 2002;95:920–2. Table of contents.
- O'Shea SM, Wong LC, Harrison NL. Propofol increases agonist efficacy at the GABA(A) receptor. *Brain Res.* 2000;852:344–8.
- Yano T, Nakayama R, Ushijima K. Intracerebroventricular propofol is neuroprotective against transient global ischemia in rats: extracellular glutamate level is not a major determinant. *Brain Res.* 2000;883:69–76.
- Tsai YC, Huang SJ, Lai YY, et al. Propofol does not reduce infarct volume in rats undergoing permanent middle cerebral artery occlusion. *Acta Anaesthesiol Sin.* 1994;32:99–104.
- Burchell SR, Dixon BJ, Tang J, et al. Isoflurane provides neuroprotection in neonatal hypoxic ischemic brain injury. *J Investig Med.* 2013;61:1078–83.
- Chung IS, Kim JA, Choi HS, et al. Reactive oxygen species by isoflurane mediates inhibition of nuclear factor kappaB activation in lipopolysaccharide-induced acute inflammation of the lung. *Anesth Analg.* 2013;116:327–35.
- Harr JN, Moore EE, Stringham J, et al. Isoflurane prevents acute lung injury through ADP-mediated platelet inhibition. *Surgery.* 2012;152:270–6.
- Kinoshita H, Matsuda N, Iranami H, et al. Isoflurane pretreatment preserves adenosine triphosphate-sensitive K(+) channel function in the human artery exposed to oxidative stress caused by high glucose levels. *Anesth Analg.* 2012;115:54–61.
- Kim M, Kim N, D'Agati VD, et al. Isoflurane mediates protection from renal ischemia-reperfusion injury via sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate-dependent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F1827–35.
- Lang XE, Wang X, Zhang KR, et al. Isoflurane preconditioning confers cardioprotection by activation of ALDH2. *PLoS ONE.* 2013;8:e52469.
- Sasaoka N, Kawaguchi M, Kawaraguchi Y, et al. Isoflurane exerts a short-term but not a long-term preconditioning effect in neonatal rats exposed to a hypoxic-ischaemic neuronal injury. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53:46–54.
- Ferriero DM, Bonifacio SL. The search continues for the elusive biomarkers of neonatal brain injury. *J Pediatr.* 2014;164:438–40.
- Altay O, Suzuki H, Hasegawa Y, et al. Isoflurane attenuates blood-brain barrier disruption in ipsilateral hemisphere after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke.* 2012;43:2513–6.
- Li H, Yin J, Li L, et al. Isoflurane postconditioning reduces ischemia-induced nuclear factor-kappaB activation and interleukin 1 beta production to provide neuroprotection in rats and mice. *Neurobiol Dis.* 2013;54:216–24.
- Li L, Zuo Z. Isoflurane postconditioning induces neuroprotection via Akt activation and attenuation of increased mitochondrial membrane permeability. *Neuroscience.* 2011;199:44–50.
- Khatibi NH, Ma Q, Rolland W, et al. Isoflurane posttreatment reduces brain injury after an intracerebral hemorrhagic stroke in mice. *Anesth Analg.* 2011;113:343–8.
- Statler KD, Alexander H, Vagni V, et al. Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury. *Brain Res.* 2006;1076:216–24.
- Zhou Y, Lekic T, Fathali N, et al. Isoflurane posttreatment reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats by the sphingosine-1-phosphate/phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Stroke.* 2010;41:1521–7.
- Dallasen RM, Bowman JD, Xu Y. Isoflurane does not cause neuroapoptosis but reduces astroglial processes in young adult mice. *Med Gas Res.* 2011;1:27.
- Tokunaga H, Hiramatsu K, Sakaki T. Effect of preceding in vivo sublethal ischemia on the evoked potentials during secondary in vitro hypoxia evaluated with gerbil hippocampal slices. *Brain Res.* 1998;784:316–20.

27. Fairchild MD, Parsons JE, Wasterlain CG, et al. A hypoxic injury potential in the hippocampal slice. *Brain Res.* 1988;453:357-61.
28. Sick TJ, Solow EL, Roberts EL Jr. Extracellular potassium ion activity and electrophysiology in the hippocampal slice: paradoxical recovery of synaptic transmission during anoxia. *Brain Res.* 1987;418:227-34.
29. Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, et al. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 1997;20:464-70.
30. Hirose K, Chan PH. Blockade of glutamate excitotoxicity and its clinical applications. *Neurochem Res.* 1993;18:479-83.
31. Kollegger H, McBean GJ, Tipton KF. Reduction of striatal N-methyl-D-aspartate toxicity by inhibition of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol.* 1993;45:260-4.
32. Salinska E, Pluta R, Puka M, et al. Blockade of N-methyl-D-aspartate-sensitive excitatory amino acid receptors with 2-amino-5-phosphonovalerate reduces ischemia-evoked calcium redistribution in rabbit hippocampus. *Exp Neurol.* 1991;112:89-94.
33. Xie Y, Zacharias E, Hoff P, et al. Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:587-94.
34. Cobas A, Fairen A, Alvarez-Bolado G, et al. Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: a comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABAA receptor. *Neuroscience.* 1991;40:375-97.
35. Lauder JM, Han VK, Henderson P, et al. Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience.* 1986;19:465-93.
36. Globus MY, Busto R, Martinez E, et al. Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *J Neurochem.* 1991;57:470-8.
37. Kemp JA, Leeson PD. The glycine site of the NMDA receptor-five years on. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14:20-5.
38. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* 1988;241:835-7.