



Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Rosario

Carrera de Especialización en Anestesiología

TRABAJO FINAL

“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y APOPTOSIS LEUCOCITARIA CON DOS TÉCNICAS ANESTÉSICAS: INHALATORIA VS ENDOVENOSA”.

ALUMNO: PIGNOLO FABIANA.

TUTOR DEL TRABAJO: SOTO GERMAN.

CO-TUTOR DEL TRABAJO: ELENA GUSTAVO.

RADICACIÓN DEL TRABAJO: HOSPITAL ESCUELA “ EVA PERÓN”.

DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

RESUMEN :

La injuria tisular generada por la cirugía, provoca cambios neuroendócrinos, metabólicos e inmunológicos que constituyen la “Respuesta de Estrés”. Los estímulos aferentes neuronales desde el sitio de injuria y la liberación de citoquinas son los dos factores más importantes en la iniciación de esta respuesta. Los anestésicos pueden afectar la respuesta inflamatoria e inmunológica ya sea por efectos directos sobre la función de las células inmunes, o por efectos indirectos sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Los anestésicos también podrían tener un rol inmunomodulador importante por sus efectos en la apoptosis celular. El propofol por sus propiedades antioxidantes podría modular la apoptosis. A la vez los agentes inhalatorios se asociarían a la inducción de apoptosis por distintos mecanismos.

La disfunción inmune podría tener implicancias clínicas, por lo que se hace necesario considerar las propiedades inmunomoduladoras de las drogas anestésicas.

Objetivo: Comparar la respuesta de estrés anestésico/quirúrgico y la apoptosis celular durante colecistectomías videolaparoscópicas realizadas bajo dos regímenes anestésicos.

Materiales y método: Estudio clínico prospectivo, aleatorizado, en pacientes ASA I y II sometidos a colecistectomías videolaparoscópicas. Los pacientes se asignaron al azar al Grupo I Propofol-Remifentanilo o al grupo II Sevoflurano-Remifentanilo. Se valoraron variables hemodinámicas (TAS, TAD y FC), basal, post-intubación, post-incisión de piel y al final de la cirugía; parámetros de laboratorio (glicemia, cortisol y recuento leucocitario) y marcadores de apoptosis celular: basal, al final de la cirugía y dos horas post-quirúrgicas.

Resultados: No se encontraron diferencias significativas en los valores de presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca entre técnicas anestésicas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de glucemia, lactato, cortisol y recuento leucocitario en el intra y post quirúrgico respecto a los valores basales, ni entre grupos. Ninguna técnica, aumentó el número de células apoptóticas en los momentos intra y post-quirúrgicos respecto a los valores basales. No hubo diferencias significativas en el número de neutrofilos, monocitos y linfocitos anexina e IP positivos entre ambas técnicas anestésicas.

Conclusión: Ambas técnicas anestésicas fueron eficaces en suprimir la respuesta de estrés anestésico-quirúrgico en pacientes sometidos a colecistectomía videolaparoscópica. Ninguna técnica se asoció a un aumento en la apoptosis de las células inmunes.

PALABRAS CLAVES:

Propofol, Sevoflurano, Respuesta de Estrés Anestésico-quirúrgico, Apoptosis.

INTRODUCCIÓN:

La injuria tisular generada por la cirugía, provoca cambios neuroendócrinos, metabólicos e inmunológicos que constituyen la "Respuesta de Estrés". Ésta se inicia por la activación del eje hipotálamo-hipofisario y del sistema simpático y se caracteriza por un aumento de ACTH, cortisol, catecolaminas, aldosterona, glucagón, reactantes de fase aguda y citoquinas. Los estímulos aferentes neuronales desde el sitio de injuria y la liberación de citoquinas son los dos factores más importantes en el inicio de esta respuesta. La misma es esencial para la reparación tisular, pero cuando es exagerada puede ser peligrosa causando desde hiperglucemia y alteraciones hemodinámicas hasta una respuesta inflamatoria sistémica. A la vez una respuesta insuficiente puede originar inmunosupresión, que se asocia a numerosas complicaciones postoperatorias como infecciones, recurrencia de neoplasias y disfunción cognitiva (1-3).

El aumento de cortisol es un indicador sensible de estrés, interfiere en la producción de citoquinas, impide la agregación de neutrófilos y macrófagos al sitio de injuria, disminuye la fagocitosis e induce apoptosis linfocitaria. La hiperglucemia en el perioperatorio es consecuencia de un aumento en la glucogenolisis y gluconeogénesis hepática e insulinoresistencia y se asocia a peores resultados.(2)

El balance entre los mecanismos inmunoestimuladores e inmunosupresores puede verse afectado por múltiples factores entre ellos los agentes anestésicos.(1)

Los anestésicos pueden afectar la respuesta inflamatoria e inmunológica ya sea por efectos directos sobre la función de las células inmunes, o por efectos indirectos modulando la respuesta de estrés sobre el eje hipotálamo-hipofisario ya que los sistemas nervioso, endocrino e inmune están integrados anatómicamente y fisiológicamente, mediante la expresión de receptores comunes adrenérgicos, para glucocorticoides, citoquinas y neuropéptidos (3; 4).

Ya hace más de cien años que Chadbourne y Snell observaron que los anestésicos provocaban disfunción inmune postoperatoria, sin embargo las implicancias clínicas de estos hallazgos siguen siendo un tema de controversia ya que la mayoría de los estudios fueron realizados in Vitro y en modelos animales (1).

Esta disfunción inmune tiene variada expresión post-operatoria destacándose un incremento del recuento leucocitario, con variados efectos en las diferentes subpoblaciones celulares. Tanto el propofol como sevoflurano producen neutrofilia con inhibición de las funciones de fagocitosis y estallido respiratorio, disminución del recuento de monocitos y linfocitos (4).

Distintos estudios sugieren que la anestesia endovenosa total con propofol comparada con la anestesia balanceada es más eficiente en suprimir la respuesta de estrés provocando disminución postoperatoria de catecolaminas, cortisol y glucemia y menor efecto inmunosupresor con menor reducción de linfocitos T y B y mejor respuesta TH1 (3; 5-7).

Los anestésicos también podrían tener un rol inmunomodulador importante por sus efectos en la apoptosis celular. Los agentes inhalatorios se asociarían a la inducción de apoptosis por distintos mecanismos; fasL/fasR ligando, regulando la expresión de factores anti y pro-apoptóticos y vía mitocondrial (4; 8;9). Otro mecanismo que vincula a los halogenados con inducción de apoptosis celular es la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y estrés oxidativo, que mediarían la expresión de factores pro-apoptóticos y alterarían

el estado redox mitocondrial.^(10;11) Los ERO son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado que les confiere una alta inestabilidad. Se producen en forma constante como producto del metabolismo aerobio y su principal fuente es la mitocondria. El estrés oxidativo es resultado de un desbalance entre la generación de radicales libres y los mecanismos antioxidantes, llevando a daño de la membrana celular, lípidos, proteínas o del ADN.⁽¹²⁾ El propofol por sus propiedades antioxidantes podría modular la apoptosis ⁽¹³⁾.

El término apoptosis fue utilizado por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir una forma distinta de muerte celular, programada y determinada genéticamente. Ésta ocurre normalmente durante el desarrollo y envejecimiento como mecanismo homeostático para mantener la población celular de los diferentes tejidos y como mecanismo de defensa para eliminar células dañadas por enfermedades o noxas. Es un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cistein-proteasas llamadas “caspasas” que se encuentran en forma inactiva como pro-caspasas y una vez activadas, activan a otras, iniciando una compleja cascada de eventos intracelulares que conducen finalmente a la muerte celular. Existen dos vías principales que pueden llevar a la apoptosis: la vía extrínseca mediada por receptores de membrana o “de muerte”, que pertenecen a la familia de receptores llamada “factor de necrosis tumoral (TNF) cuyos ligandos son similares al TNF (FasL) y culmina con la activación de pro-caspasas 8. La vía intrínseca o mitocondrial, puede ser iniciada por diferentes estímulos: radiaciones, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, ERO, que producen cambios en el potencial de transmembrana de la mitocondria y el pasaje de proteínas pro-apoptóticas (Citocromo C y HtrA2/Omi) desde el espacio intermembrana al citosol y culmina con la activación de pro-caspasas 9. La regulación de esta vía es a través de proteínas de la familia Bcl-2 que pueden ser antiapoptóticas (Bcl-2) o pro-apoptóticas (Bax).

También existe una vía adicional, Perforina /Granzima que involucra citotoxicidad por células T. Todas las vías concluyen en una vía final común, con activación de caspasas que producen fragmentación del ADN, degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, formación de cuerpos apoptóticos que posteriormente son fagocitados por células fagocíticas. Las células apoptóticas son reconocidas por los fagocitos debido a la externalización de proteínas en la membrana celular como fosfatidilserina, anexina I y calreticulina ^(14;15).

Debido al incremento de los pacientes en riesgo como ancianos e inmunodeprimidos que se someten a prácticas quirúrgicas en los cuales la disfunción inmune podría tener implicancias clínicas, se hace necesario considerar las propiedades inmunomoduladoras de las drogas anestésicas ⁽¹⁾.

En el siguiente estudio se plantea como hipótesis que TCI propofol / remifentanilo produce una alteración menor en la respuesta hemodinámica, endocrino-metabólica e inmunológica si se lo compara con anestesia balanceada.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Comparar la respuesta hemodinámica, endócrino-metabólica e inmunológica y el desarrollo de apoptosis en células inmunes durante colecistectomías videolaparoscópicas realizadas bajo dos regímenes anestésicos (endovenoso versus balanceada).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar si TCI propofol / remifentanilo modula la respuesta de estrés anestésico /quirúrgico comparado con sevoflurano /remifentanilo, evaluando:

- Condiciones hemodinámicas: tensión arteria sistólica (TAS), tensión arterial diastólica (TAD) y frecuencia cardiaca (FC).
- Marcadores bioquímicos: cortisol, glicemia y lactato.
- Respuesta leucocitaria: recuento de glóbulos blancos.
- Marcadores de apoptosis celular (anexina e ioduro de propidio).

METODOLOGIA Y TECNICAS A EMPLEAR:

Estudio clínico, prospectivo y aleatorizado en el que se estudiaron 30 pacientes sometidos a colecistectomía videolaparoscópica programada en “Hospital Escuela Eva Perón” durante el periodo de Diciembre 2014 a Marzo de 2015.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Escuela “Eva Perón”. Luego de firmar el consentimiento informado, los pacientes se asignaron, según lista de aleatorización (se adjunta en anexo 1) a uno de los siguientes grupos:

- GRUPO 1 (TCI): administración de propofol-remifentanilo.
- GRUPO2 (VIMA): administración de sevoflurano- remifentanilo.

En el presente estudio solo se incluyeron las cirugías que comenzaron a las 7:30 a.m para evitar las variaciones horarias de las hormonas de estrés. Todas las cirugías fueron realizadas por técnica estándar de cuatro trócares y neumoperitoneo con dióxido de carbono a una presión intra-abdominal de 13 a 15 mmHg y fueron asistidas por el mismo grupo de anestesiólogos.

Población estudiada:

Criterios de inclusión:

- Pacientes ASA I y II.
- Edad entre 18 y 65 años.
- Ambos sexos.
- Índice de Masa Corporal: mujeres < 35 kg/m² y hombres < 42 kg/m².

Criterios de exclusión:

- Negativa del paciente.

- Uso de benzodiazepinas, opioides, corticoides, b-bloqueantes o bloqueantes cálcicos.
- Hipersensibilidad a opioides o propofol / emulsión lipídica.
- Presencia de infección aguda.
- Diabetes.

Manejo anestésico:

Al arribar a quirófano se insertó una cánula de teflón 18G en vena antecubital de miembro superior izquierdo, con doble llave de tres vías para cada una de las drogas a infundir. Los pacientes fueron premedicados con midazolam 0,02-0,05 mg/kg como ansiolítico, diclofenac 1mg/kg, tramadol 1 mg/kg y dexametasona 8 mg como analgesia preventiva. Se administraron 10 ml/kg de solución CNa 0.9% para compensar la pérdida nocturna de fluidos y luego se mantuvo una infusión continua de la misma solución a 5 ml/kg/h. Se colocó una segunda línea endovenosa en miembro superior derecho para extraer las muestras de sangre.

En todos los pacientes se monitorizó durante el transcurso de la cirugía: saturación de oxígeno, tensión arterial no invasiva, dióxido de carbono espirado y electrocardiografía.

Método anestésico empleado:

Para la técnica TIVA la inducción se realizó con TCI propofol (Diprivan®), modelo de Marsh, Ce 3 mcg/ml hasta lograr la pérdida del reflejo palpebral; luego se continuó con Ce 2 mcg/ml hasta el final de la cirugía.

Para la técnica Inhalatoria se precargó el circuito anestésico con sevoflurano (Sevorane®) al 8% a 6 l/min durante 1 min y se realizó la inducción con sevoflurano al 8% con técnica de capacidad vital (se solicitó al paciente que realice una inspiración máxima seguida de una espiración máxima) hasta lograr la pérdida del reflejo palpebral; luego se continuó con sevoflurano al 2% hasta finalizar cirugía.

En ambos grupos, después de lograda la pérdida del reflejo palpebral se comenzó con la perfusión de TCI remifentanilo (Remicit®), Modelo Minto, Cp 3ng/ml durante la inducción y entre 4-10 ng/ml durante el mantenimiento, que se ajustó para mantener las variables hemodinámicas dentro del 20% de los valores de ingreso. Se administró vecuronio (Vecural®) a 0,1 mg/kg para facilitar la intubación, luego 0,02 mg/kg cada 40 min y al finalizar la cirugía se revirtió el bloqueo neuromuscular con atropina 0,01 mg/kg y neostigmina 0,03-0,05mg/kg.

Se intubó a los 4 minutos posteriores al inicio de la inducción anestésica y se inició ventilación mecánica controlada por volumen para mantener normocapnia (end-tidal CO2 entre 30 y 35 mmHg), con mezcla de aire y oxígeno a FIO2 de 60%.

En caso de bradicardia (frecuencia cardiaca menor de 40) se administró atropina 0,01 mg/k y en caso de hipotensión arterial (tensión arterial sistólica menor 80) se administró etilefrina.

Obtención de muestras de sangre:

Se obtuvieron tres muestras de sangre, la primera o basal, al ingreso a quirófano, la segunda o intraoperatoria, 30 minutos después del comienzo de la cirugía y la tercera, a las 2 hs post-quirúrgicas. En cada muestra se determinaron: glicemia, cortisol, lactato, recuento de leucocitos, y marcadores de apoptosis celular (anexina, yoduro de propidio).

Los datos correspondientes a las variables de sangre periférica se corrigieron para minimizar los cambios peri-operatorios en el volumen sanguíneo de acuerdo a la siguiente fórmula: Valor ajustado= valor de la variable x Hto Basal/ Hto del momento en estudio; utilizada por Roth-Isigkeit et al (16).

Métodos de obtención de registros, equipos y monitores:

La infusión de propofol y remifentanilo se realizó con Base Primea; Fresenius Kabi®.

La monitorización durante el transcurso de la cirugía se realizó con monitor multiparamétrico Draguer Infinity vista XL® y la ventilación con máquina de anestesia Draguer Fabius Plus GS Premium®.

Determinaciones de laboratorio:

Marcadores bioquímicos endócrino-metabólicos:

Para medición de Glicemia (mg%, VN: 70-110) y Lactato (mmol/l, VN: 0,6-2,2) se utilizó Instrumento Radiometer-Copenhagen, Serie ABL 700- Sistema de Gases en Sangre, Oximetría, Electrolitos y Metabolitos. Para medición de Cortisol (ug/dl, VN: 6,2-19,4) se utilizó Instrumento Cobas e 411, Roche Hitachi. Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de cortisol. Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia "ECLIA" para ser utilizado en cobas e.

Hemograma y recuento leucocitario:

Se constató en sangre periférica mediante hemograma con Instrumento: Sysmex serie XT (XT-1800).

Marcadores de apoptosis celular:

Se determinaron por citometría de flujo: Citómetro FACSCantoll. BD.Biosciences, Software BDFACSDivaFITC. Kit Annexin V Apoptosis Detection I, 10X Annexin V Binding Buffer 50 ml (1 ea), FITC Annexin V 0,5 ml (1 ea) 5 µl, Propidium Iodide Staining Solution 2,0 ml (1 ea) 5 µl).

Se recolectaron 2 ml de sangre entera con EDTA, se centrifugó 10 minutos a 200g para recoger el plasma rico en leucocitos y plaquetas en otro tubo tratando de no contaminar con glóbulos rojos y luego se centrifugó 10 minutos a 500g y se descartó sobrenadante. Se resuspendieron las células en 1 ml de

PBS frío. Se Centrifugó a 500g 10 minutos y descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS frío, se contaron las células y centrifugaron igual que antes. Se resuspendieron las células en binding buffer 1x a concentración de 1×10^6 . Se colocó en un tubo falcon 100ul de la suspensión celular y se agregó 5 ul de Anexina V y 5 ul de Ioduro de propidio.

Se incubó 15 minutos en oscuridad. Luego se agregó 400 ul de binding buffer1x. Adquirir 100000 eventos dentro de la hora.

Método de registro:

En una ficha diseñada para este estudio, la cual se adjunta en el anexo 2, se registraron: Tensión Arterial Sistólica (TAS), Tensión Arterial Diastólica (TAD) y Frecuencia Cardíaca (FC) en los siguientes momentos: basal (al ingreso a quirófano), un minuto post-intubación, un minuto post-incisión de la piel y al finalizar la cirugía (un minuto post-extubación). En la misma ficha se registraron también las determinaciones de laboratorio: glicemia, cortisol, lactato, recuento de leucocitos, y marcadores de apoptosis celular en neutrófilos, linfocitos y monocitos.

Los datos se guardaron en una base de datos excel.

Análisis estadístico:

Los datos se presentan mediante el promedio acompañado del desvío estándar (DE) para las variables continuas y las frecuencias junto con los porcentajes para las variables categóricas. En el caso particular del análisis de anexina e ioduro de propidio para los registros relacionados con la apoptosis celular se presenta la mediana junto con el el percentil del 25 y del 75%, debido a las características de dichas variables.

En el análisis de las variables basales las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el Test t para evaluar igualdad de promedios (luego de verificar el cumplimiento del supuesto de normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov) y mediante el Test de Fisher para comparar las proporciones entre grupos. En el análisis de los parámetros hemodinámicos y de los valores de glucemia, cortisol, lactato y recuento leucocitario se utilizó el Test de Mann-Whitney para evaluar las diferencias en cada momento de evaluación, ya que no se verificó el supuesto de normalidad. Se realizaron asimismo, comparaciones entre las mediciones del intraquirúrgico y del postoperatorio versus las mediciones basales mediante el Test de Wilcoxon para muestras apareadas, en cada uno de los grupos.

Los resultados con una probabilidad asociada menor que 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Las características demográficas y clínicas de los pacientes se presentan en la Tabla 1. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. Ambos grupos son comparables en cuanto a edad, peso, talla, BMI, sexo y requerimiento de drogas vasoactivas. Un paciente en cada grupo requirió 1 mg de atropina. Dos pacientes requirieron etilefrina en el grupo TIVA y cuatro en el grupo inhalatorio, el máximo requerimiento fue de 6 mg.

Tabla 1.

	Grupo TIVA (n=15)	Grupo VIMA (n=15)	P
Edad (años) ^a	38,9 (16,7)	37,4 (13,5)	0,793
Peso (kg) ^a	73,4 (14,4)	72,8 (15,4)	0,913
Talla (m) ^a	1,65 (0,1)	1,64 (0,1)	0,819
IMC ^a	26,8 (3,5)	26,7 (4,1)	0,963
Sexo ^b (femenino)	12 (80%)	12 (80%)	1,000
Uso de efedrina ^b	2 (13%)	4 (26%)	0,651
Uso de atropina ^b	1 (7%)	1 (7%)	1,000

Los datos se presentan como: ^a promedio (desvío estándar) – Test t de comparación de medias; ^b n° (%) – Test de Fisher.

Los parámetros hemodinámicos demuestran que tanto los pacientes que recibieron TIVA como los que recibieron anestesia inhalatoria disminuyeron su presión arterial sistólica y diastólica con respecto a los niveles preoperatorios sin diferencias significativas entre ambos grupos. (Figura 1 y 2).

También se produjo una disminución de la frecuencia cardiaca con respecto a los niveles pre-quirurgicos, con valores significativamente menores en el grupo inhalatorio al minuto post-intubación (p=0.007). No existieron diferencias entre grupos en los registros post-incisión y al finalizar la cirugía. (Figura 3). Ambos grupos mostraron un buen control hemodinámico.

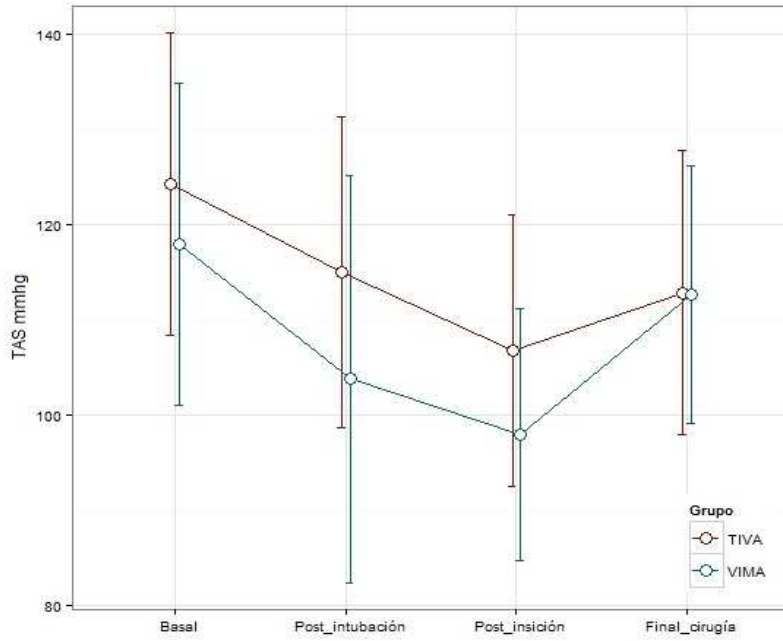


Figura 1 – Los puntos representan los valores promedios y las líneas el desvío estándar de los valores de la TAS en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

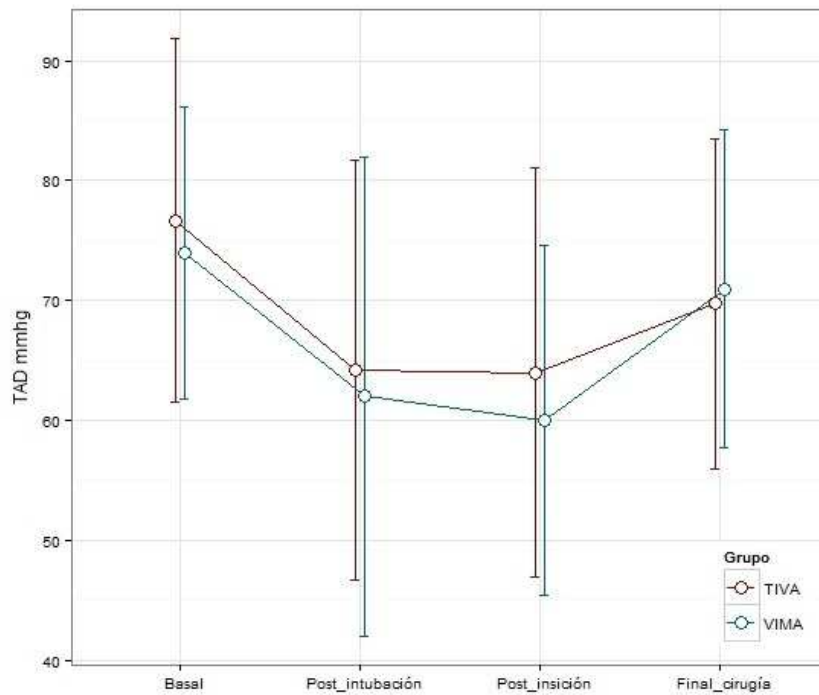


Figura 2 – Los puntos representan los valores promedios y las líneas el desvío estándar de los valores de la TAD en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

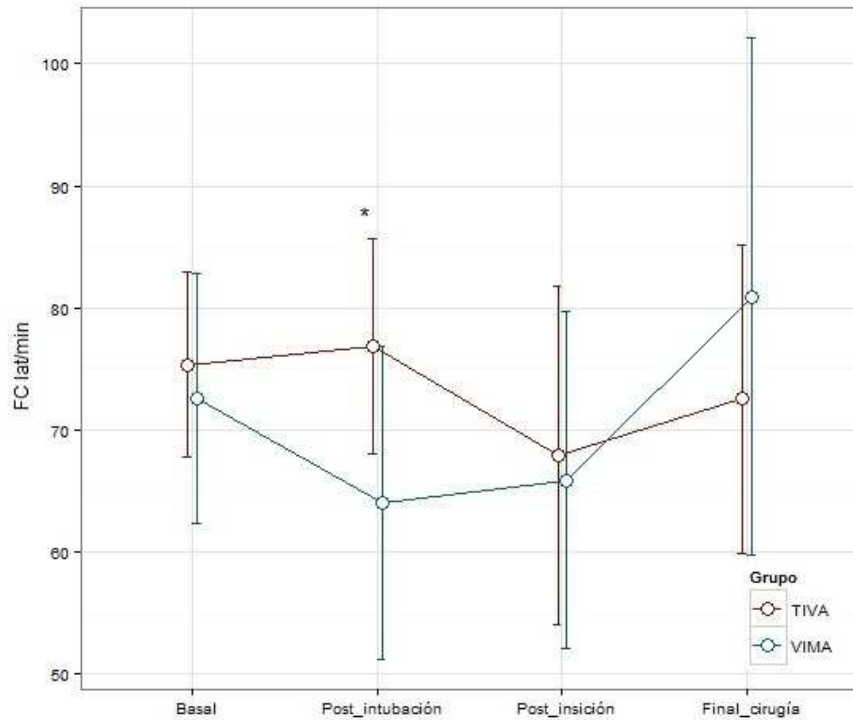


Figura 3 – Los puntos representan los valores promedios y las líneas el desvío estándar de los valores de la FC en cada uno de los momentos de evaluación según grupo. * p=0,007, comparación entre grupos, Test de la U de Mann-Whitney.

Los valores promedios de las variables hemodinámicas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Parámetro	Grupo	Basal		Post intubación		Post iniciación		Final de cirugía	
		Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
TAS	TIVA	124,2	15,9	115,0	16,4	106,8	14,2	112,9	14,9
	VIMA	117,9	16,9	103,8	21,3	98,0	13,2	112,6	13,5
TAD	TIVA	76,7	15,1	64,2	17,5	64,0	17,1	69,7	13,8
	VIMA	74,0	12,2	62,0	20,0	60,0	14,6	70,9	13,3
FC	TIVA	75,3	7,6	76,9	8,9	67,9	13,9	72,5	12,7
	VIMA	72,6	10,2	64,1	12,8	65,9	13,8	80,9	21,2

Los niveles de lactato, glicemia y cortisol se muestran en las figuras 4, 5 y 6. No hubo diferencias significativas en las muestras intra-quirúrgica y post-quirúrgica con respecto a los valores basales. Tampoco existieron diferencias entre grupos.

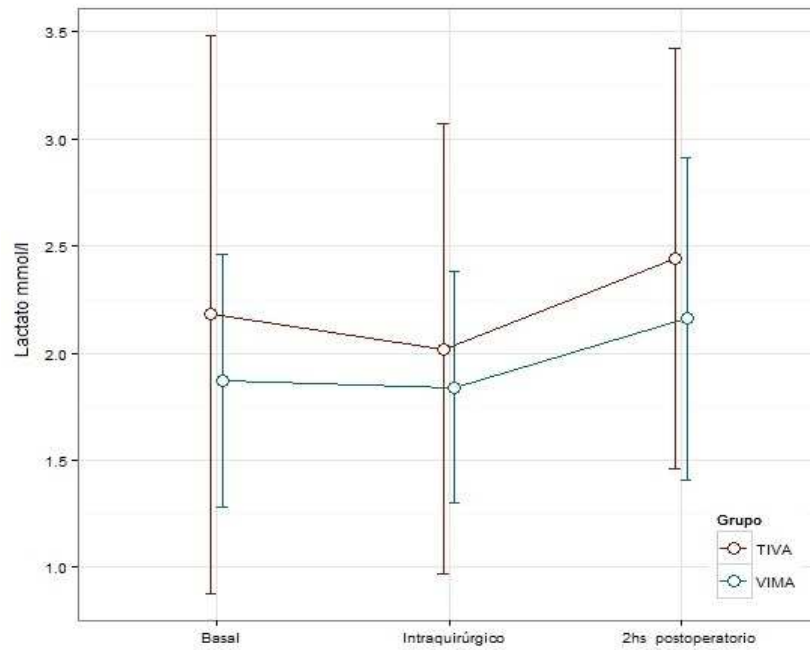


Figura 4 – Los puntos representan los valores promedios y las líneas el desvío estándar de los valores de Lactato en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

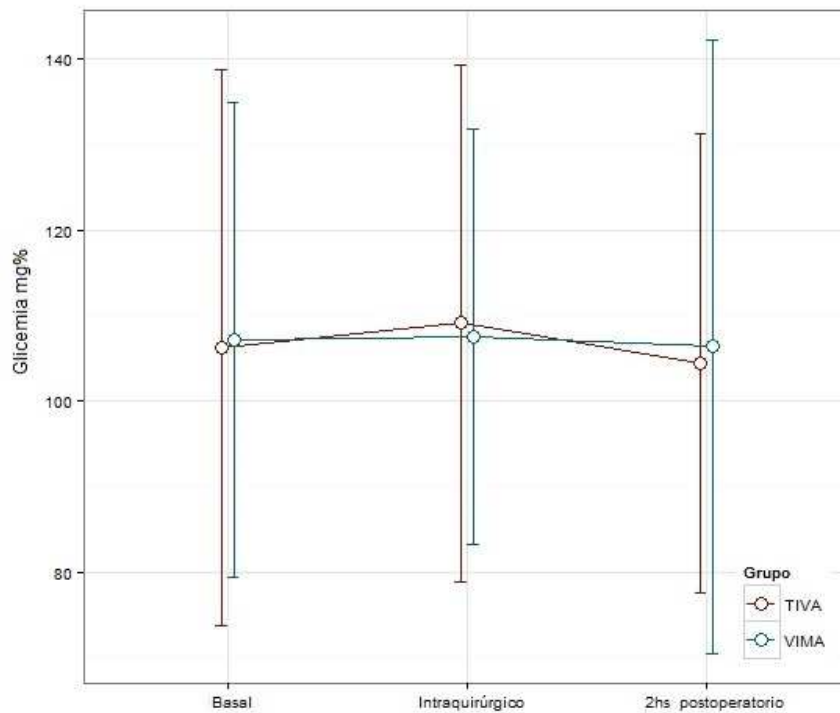


Figura 5 – Los puntos representan los valores promedios y las líneas el desvío estándar de los valores de Glicemia en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

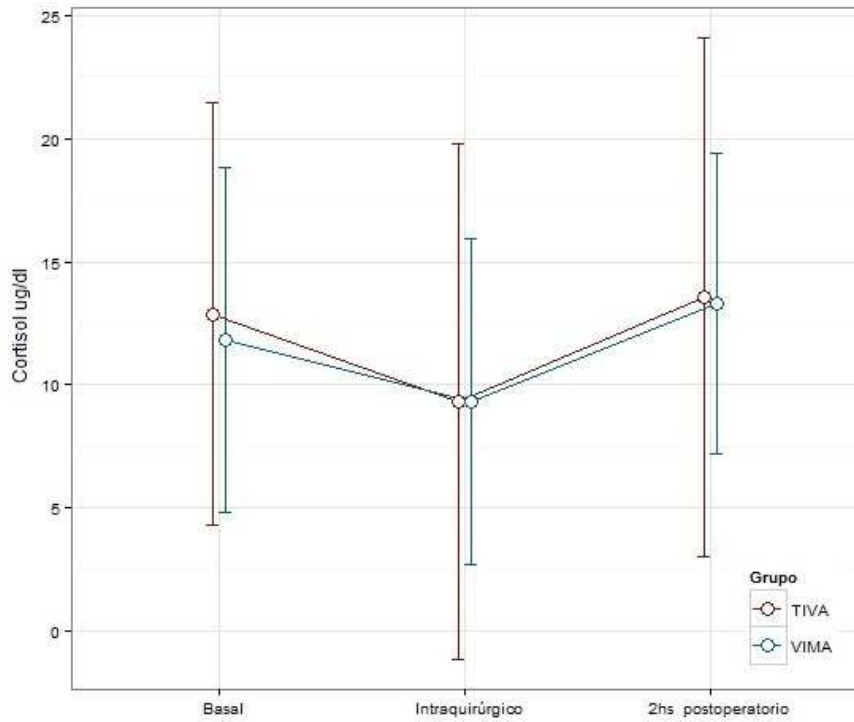


Figura 6 – Los puntos representan los valores promedios y las líneas el desvío estándar de los valores de Cortisol en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

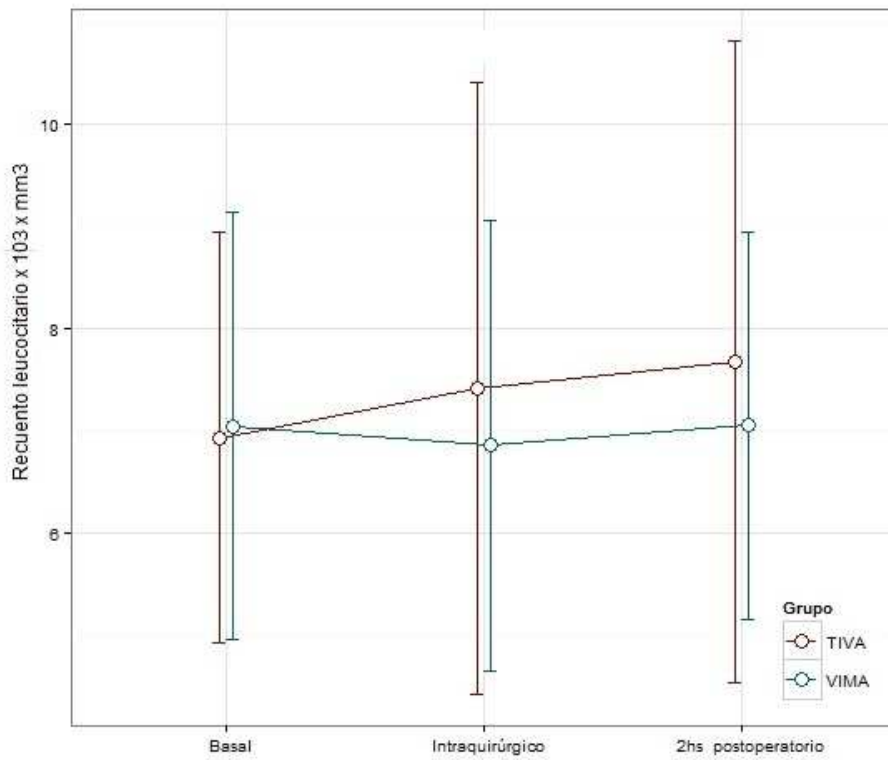


Figura 7 – Los puntos representan los valores promedios y las líneas el desvío estándar de los valores de Recuento leucocitario en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

No se encontraron diferencias significativas en el recuento leucocitario entre los tratamientos anestésicos, ni entre las muestras intra y post-quirúrgica respecto a la basal. Los valores se muestran la figura 7.

En la tabla 3 se observan los valores promedios de lactato, cortisol, glucemia y recuento leucocitario para ambos grupos.

Tabla 3

Parámetro	Grupo	Basal		Intraquirúrgico		2 hs postoperatorio	
		Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
Lactato (mmol/l)	TIVA	2,18	1,30	2,02	1,05	2,44	0,98
	VIMA	1,87	0,59	1,84	0,54	2,16	0,75
Glicemia (mg%)	TIVA	106,20	32,54	109,07	30,28	104,40	26,80
	VIMA	107,13	27,80	107,47	24,26	106,33	35,82
Cortisol (ug/dl)	TIVA	12,87	8,59	9,34	10,48	13,55	10,55
	VIMA	11,85	7,01	9,33	6,63	13,30	6,12
Recuento leucocitario (x10 ³ mm ³)	TIVA	6,93	2,01	7,41	2,99	7,67	3,14
	VIMA	7,04	2,09	6,85	2,21	7,05	1,90

En los marcadores de apoptosis celular no se registró incremento en el número de neutrófilos, monocitos y linfocitos con anexina positiva en los momentos intraquirúrgicos y post-quirúrgicos respecto al basal en ningún grupo. (Figuras 8, 10, 12). Tampoco existieron diferencias en el número de células (neutrófilos, linfocitos y monocitos) positivas para IP en el intra y post-quirúrgico respecto al basal en ningún grupo. (Figuras 9, 11 y 13).

No se registraron diferencias significativas en el número de células positivas para anexina e IP entre los dos tratamientos anestésicos, excepto en el número de neutrófilos anexina positiva basal que fue mayor en el grupo TIVA. (Figura12)

En la tabla 4 se observa la mediana y los cuartiles 25-75 para el porcentaje de neutrófilos, monocitos y linfocitos anexina e IP positivos en los momentos basal, intraquirúrgico y post-quirúrgico.

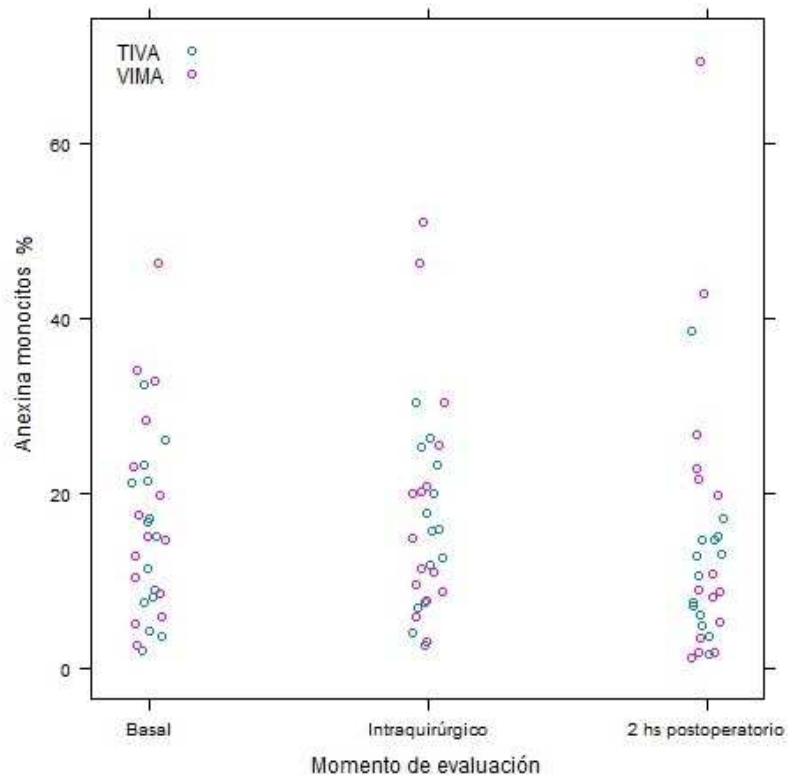


Figura 8– Distribución de los valores de Anexina monocitos % en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

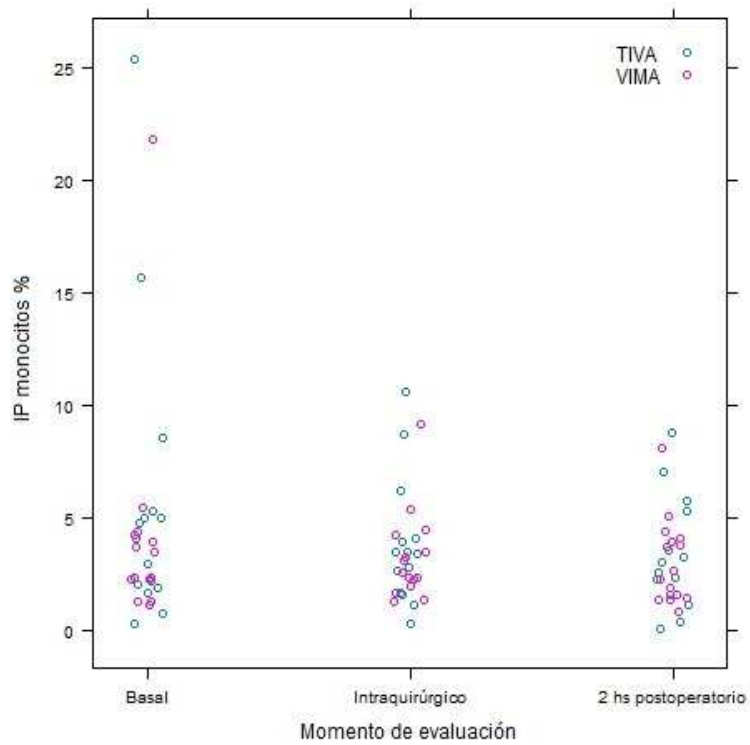


Figura 9 – Distribución de los valores de IP monocitos % en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

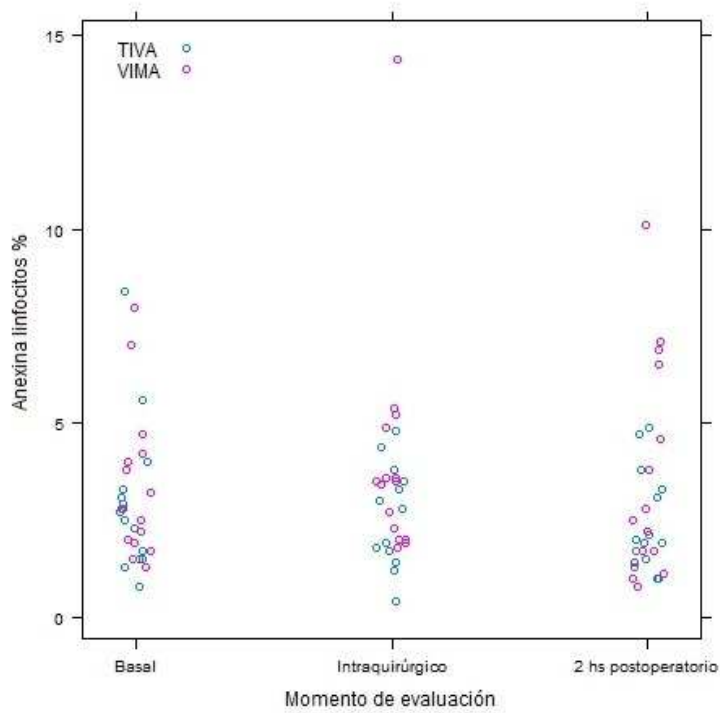


Figura 10 – Distribución de los valores de Anexina linfocitos % en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

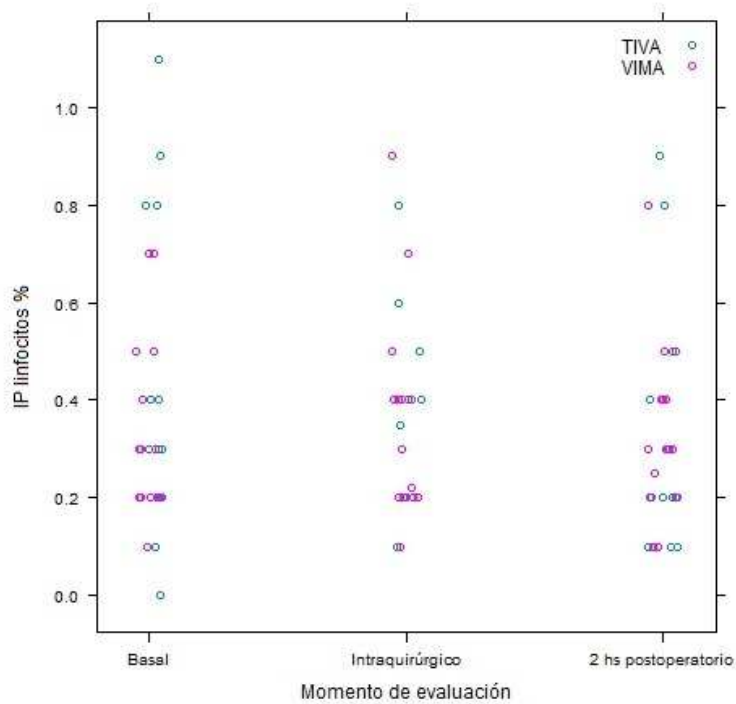


Figura 11 – Distribución de los valores de IP linfocitos % en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

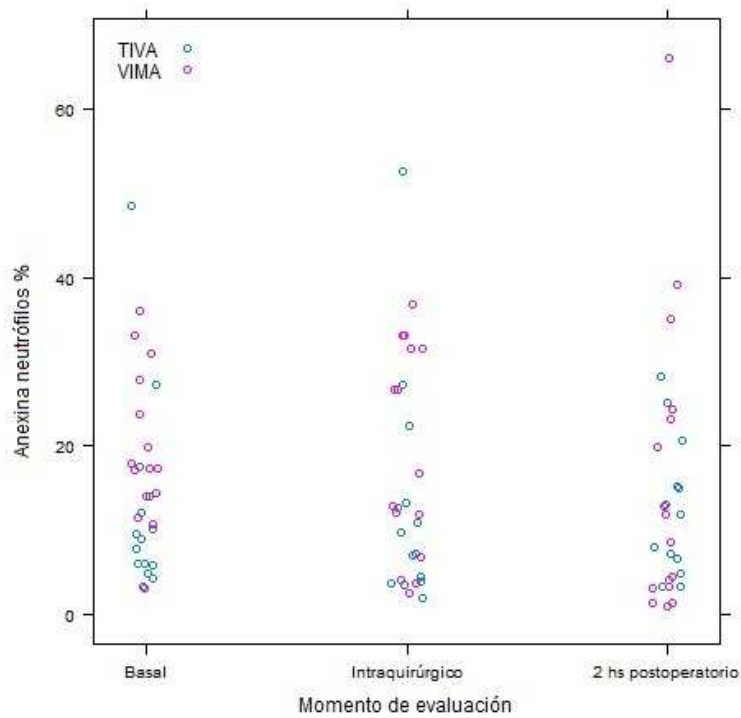


Figura 12 – Distribución de los valores de Anexina neutrófilos % en cada uno de los momentos de evaluación según grupo. Diferencias significativas en el momento basal entre ambos grupos ($p=0,010$; Test de la U de Mann-Whitney).

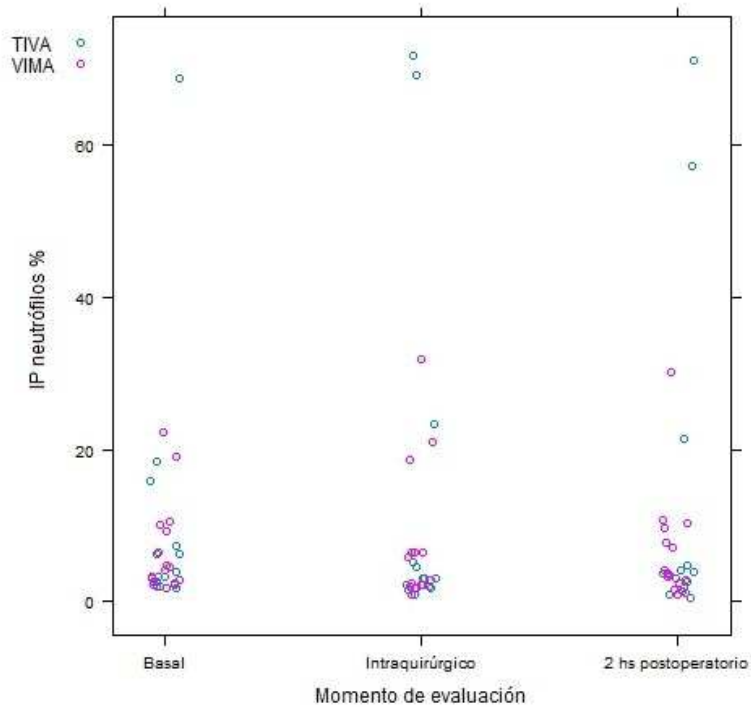


Figura 13– Distribución de los valores de IP neutrófilos % en cada uno de los momentos de evaluación según grupo.

Tabla 4

Parámetro	Grupo	Basal			Intraquirúrgico			2 hs postoperatorio		
		Mediana (50%)	Q1 (25%)	Q3 (75%)	Mediana (50%)	Q1 (25%)	Q3 (75%)	Mediana (50%)	Q1 (25%)	Q3 (75%)
Anexina Neutrófilos (%)	TIVA	9,0	5,8	14,1	8,6	4,0	13,2	9,9	5,0	15,2
	VIMA	17,3	14,1	27,9	16,7	6,8	31,6	11,9	3,1	24,4
IP Neutrófilos (%)	TIVA	3,3	2,5	7,4	3,0	1,9	5,3	3,4	1,4	4,7
	VIMA	4,5	2,6	10,1	2,9	2,1	6,5	3,8	2,4	9,7
Anexina Monocitos (%)	TIVA	15,2	7,7	21,5	15,9	7,6	23,3	11,9	6,2	14,8
	VIMA	15,2	8,7	28,5	15,0	8,9	25,6	9,0	3,6	22,9
IP Monocitos (%)	TIVA	4,1	1,9	5,3	3,5	1,7	4,1	2,8	1,6	5,3
	VIMA	2,4	2,3	4,3	2,6	2,0	4,3	2,7	1,5	4,1
Anexina Linfocitos (%)	TIVA	2,7	1,5	3,3	2,4	1,7	3,5	2,0	1,5	3,3
	VIMA	2,8	1,9	4,2	3,5	2,0	4,9	2,5	1,4	6,5
IP Linfocitos (%)	TIVA	0,3	0,2	0,8	0,4	0,2	0,5	0,2	0,1	0,4
	VIMA	0,3	0,2	0,5	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4

DISCUSIÓN:

En el presente estudio se comparó la respuesta hemodinámica y endócrino-metabólica entre dos técnicas anestésicas, propofol y remifentanilo vs. sevoflurano y remifentanilo durante colecistectomías videolaparoscópicas.

En referencia a la respuesta hemodinámica, existió estabilidad hemodinámica en ambos grupos con disminución de los niveles de presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardíaca en el intra y post-quirúrgico respecto a los niveles basales, sin diferencias atribuibles a los métodos anestésicos. Al minuto post-intubación el grupo inhalatorio presentó valores de frecuencia cardíaca menores, sin relevancia clínica.

La respuesta de estrés anestésico-quirúrgico refleja cambios endócrinos, metabólicos e inmunológicos que ocurren luego de la injuria quirúrgica. La magnitud de esta respuesta es proporcional a la amplitud de la injuria siendo la extensión del trauma quirúrgico uno de los factores más importantes asociado a los cambios peri-operatorios de la respuesta inmune. Estos cambios aumentan la morbimortalidad postoperatoria en pacientes susceptibles.(7;17)

La técnica anestésica parece influir en la respuesta del organismo frente a la agresión quirúrgica por el efecto inmunomodulador de las distintas drogas. La anestesia ideal sería una anestesia “libre de estrés”.(18)

Los resultados hallados en este trabajo, coinciden con los de Lasinska et al, que no observaron diferencias significativas en las variables hemodinámicas comparando TCI de propofol con sevoflurano en cirugía de mama.(19) Ahmed et al, tampoco encontraron diferencias significativas en frecuencia cardíaca y

presión arterial cuando compararon TIVA, sevoflurano y anestesia peridural en cirugías abdominales bajas.(20)

En el presente estudio no se observaron incrementos en los niveles de lactato, glicemia y cortisol en las muestras intra-quirúrgicas y post-quirúrgicas respecto a los niveles basales en ningún grupo. Tampoco existieron diferencias significativas atribuibles a los diferentes tratamientos anestésicos. Ambas técnicas anestésicas fueron eficientes en suprimir la respuesta endócrino-metabólica.

Otros estudios difieren de este, sugiriendo que la respuesta metabólica es mejor atenuada cuando se utiliza TIVA como técnica anestésica. Ihn CH et al,(5) compararon la respuesta de estrés entre dos grupos, TIVA versus Sevoflurano durante histerectomías y observaron que las variables hemodinámicas fueron significativamente menores en el grupo TIVA que en el grupo inhalatorio, al igual que los valores de adrenalina, noradrenalina, cortisol y glucosa. Resultados similares obtuvieron Deyra et al(21) durante herniorrafias comparando propofol, sevoflurano y anestesia raquídea. Elena et al(7) durante colecistectomías videolaparoscópicas evidenciaron niveles de cortisol mayores en el grupo isoflurano que en el grupo TIVA. Otro estudio también evidenció que las concentraciones séricas de glucemia y lactato fueron menores con propofol-fentanilo comparado con anestesia balanceada.(22)

Los diferentes resultados obtenidos en estos estudios pueden deberse al uso de isoflurano como agente anestésico. Cuando se compararon los diferentes halogenados la anestesia con isoflurano se asoció a niveles más elevados de cortisol y mayor linfopenia que sevoflurano.(18)

En el periodo postoperatorio inmediato ocurren cambios profundos pero transitorios en el recuento leucocitario, y esto puede tener un rol importante en el desarrollo de inmunosupresión durante este periodo.(23)

El presente estudio no demostró diferencias en el recuento leucocitario entre grupos y tampoco entre los valores intra y post-operatorios respecto al basal. En el recuento leucocitario Elena et al, encontraron leucocitosis con neutrofilia en el postoperatorio de colecistectomías videolaparoscópicas comparando TIVA vs isoflurano pero sin diferencias entre las dos técnicas anestésicas.(3;7)

Varios estudios(3;7) sugieren que los inhalatorios pueden provocar disfunción inmune, causando linfocitopenia. Los mecanismos que median este daño celular todavía no están claros. Resultados contradictorios han sido obtenidos respecto a como influyen los diferentes anestésicos en el número y función linfocitaria.(22)

En este estudio evaluamos el desarrollo de apoptosis celular en neutrófilos, monocitos y linfocitos de pacientes sometidos a colecistectomías videolaparoscópicas bajo anestesia endovenosa total o balanceada. Para la detección de apoptosis pueden utilizarse diferentes métodos. En este estudio se utilizó anexina v conjugada con fluoresceína, que es una proteína recombinante que se une a los residuos de fosfatidilserina expuestos en la membrana celular de las células apoptóticas. Combinamos IP, un marcador de ADN impermeable a la membrana para diferenciar apoptosis de necrosis. Las muestras se analizaron con citometría de flujo. Con este método el lavado y transferencia de células puede dañar la membrana y alterar significativamente los resultados.

No se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de células apoptóticas en el intra-quirúrgico y post-quirúrgico respecto al basal ni tampoco entre técnicas anestésicas.

Loop et al,(24) estudiaron in Vitro la inducción de apoptosis en linfocitos T humanos comparando sevoflurano (8%), desflurano (18%) e isoflurano (5%) durante 24 horas y a través de que mecanismos se produjo la misma. Obtuvieron como resultado que tanto sevoflurano como isoflurano pero no desflurano indujeron apoptosis linfocitaria de manera dosis dependiente y mediada por activación de caspasas a través de la vía intrínseca o mitocondrial, pero no por vía extrínseca. Es difícil comparar estos resultados con los de este estudio, debido al uso de cultivos celulares, una concentración alta y exposición más prolongada a los agentes halogenados.

Recientemente se ha propuesto que los inhalatorios producen apoptosis alterando la homeostasis intracelular de calcio. La principal fuente intracelular de calcio es el retículo endoplasmático (RE), capaz de liberar calcio al citosol a través de dos receptores: inositol trifosfato (IP3) y rianodina. Cuando la liberación de calcio es excesiva, se produce sobrecarga del mismo en el citosol y la mitocondria, con alteración del potencial de membrana mitocondrial y acúmulo de radicales libres del oxígeno (ERO), ambos inductores de apoptosis.(25)

Yang Hui et al,(26) estudiaron los efectos de concentraciones equipotentes (2 CAM) de isoflurano, sevoflurano y desflurano en linfocitos B de pollo, midiendo marcadores de apoptosis (anexina v, IP y caspasa3), concentración de calcio en RE, citosol y mitocondria. Obtuvieron como resultado que los tres halogenados indujeron apoptosis linfocitaria asociada a una excesiva activación de los receptores IP3, con depleción de calcio en el RE y aumento del mismo en citosol y mitocondrial. Este estudio utilizó concentraciones altas durante 24 horas y en cultivos celulares lo que es difícil de extrapolar a nuestro escenario clínico.

Distintos estudios reportaron que los agentes halogenados podrían contribuir al desarrollo de Enfermedad de Alzheimer a través de este mecanismo, ya que la activación de caspasa 3 producida por sobrecarga de calcio mitocondrial, estimula la formación de proteína B-amiloide a nivel cerebral.(25;26)

El balance normal entre sustancias pro-oxidantes y anti-oxidantes puede resultar transitoriamente alterado como consecuencia del trauma quirúrgico y de las drogas utilizadas para la inducción y mantenimiento de la anestesia.(22)

Se especula que sevoflurano es capaz de producir ERO como el radical hidroxilo, radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno y de alterar el flujo de los electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial, además de promover la lipoperoxidación, debilitando el sistema de enzimas antioxidantes en diversos tejidos.(27)

La estructura química fenólica del propofol es similar a la de los antioxidantes naturales como el alfa-tocoferol, lo que le confiere propiedades antioxidantes actuando como “consumidor” de radicales libres y debido a esto podría tener un rol en la modulación de la apoptosis.(10;11) También se atribuyeron sus propiedades antioxidantes a la capacidad para estimular el sistema de la heme oxigenasa (HO1). El propofol es capaz de prevenir la peroxidación lipídica, proteger contra el estrés oxidativo e incrementar las propiedades antioxidantes del plasma.(31)

Delogu et al⁽²³⁾, estudiaron la apoptosis de linfocitos cd4 y cd8, generación de radicales libres a nivel mitocondrial y los niveles de glutatión reductasa en pacientes sometidos a cirugía electiva bajo anestesia balanceada con isoflurano, obtuvieron como resultado a las 24 hs post-quirúrgicas un aumento del porcentaje de linfocitos apoptóticos, asociado a una alteración del estado redox mitocondrial a favor pro-oxidante. Resultados similares fueron descriptos por Chung et al, que encontraron un aumento en la apoptosis de neutrófilos expuestos a sevoflurano (al 1% y 3% durante 1 hora) de manera dosis dependiente asociada a un aumento en los ERO intracelulares.⁽²⁹⁾ Un estudio⁽³⁰⁾ realizado in Vivo demostró resultados opuestos, la exposición de neutrófilos a sevoflurano disminuyó la apoptosis a las 24 hs, sin embargo esto podría ser perjudicial ya que los neutrófilos tienen un rol principal en la respuesta inflamatoria y un retardo en la apoptosis de los mismos llevaría a un aumento en los ERO e inflamación sostenida.⁽³¹⁾

Otros estudios no encontraron diferencias en las propiedades oxidantes/antioxidantes entre propofol y sevoflurano. Allaouchiche et al⁽¹¹⁾, compararon la producción de radicales libres y el consumo de glutatión peroxidasa en lavado broncoalveolar y en sangre de cerdos a las 2 y 4 hs de ser expuestos a desflurano (1CAM), sevoflurano (1CAM) y propofol (8mg/kg/h). El grupo propofol, mostró menores niveles de ERO y menor consumo de glutatión peroxidasa que desflurano. El grupo sevoflurano no mostró un aumento en el nivel de ROS. Resultados similares obtuvieron Erbas et al⁽¹⁰⁾ que compararon los efectos de la perfusión de propofol, sevoflurano y desflurano sobre el sistema oxidante /antioxidante en pacientes sometidos a colecistectomía videolaparoscópica, demostrando que tanto propofol como sevoflurano aumentaron la capacidad antioxidante en cambio desflurano aumento el estrés oxidativo.

En los estudios en los que se evidenció un aumento en la apoptosis celular con sevoflurano, utilizaron este halogenado como agente anestésico único, a diferencia del presente estudio donde se utilizó anestesia balanceada con sevoflurano más remifentanilo a lo cual podrían atribuirse las diferencias en los resultados encontrados.

CONCLUSIÓN

La anestesia endovenosa total y la anestesia balanceada fueron igualmente eficaces en suprimir la respuesta de estrés anestésico-quirúrgico en pacientes sometidos a colecistectomías videolaparoscópicas. Ninguna de las técnicas anestésicas produjo cambios en los marcadores de apoptosis estudiados.

Deberían realizarse estudios futuros con mayor número de pacientes.

ANEXO 1:

TABLA DE ALEATORIZACIÓN

Paciente	Grupo asignado
1	1
2	2
3	1
4	2
5	1
6	1
7	2
8	2
9	1
10	1
11	2
12	2
13	1
14	2
15	2
16	2
17	1
18	1
19	2
20	2
21	2
22	1
23	2
24	2
25	1
26	1
27	1
28	2
29	1
30	1

ANEXO 2: PLANILLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS:



Servicio de Anestesia Analgesia y Reanimación
Hospital Escuela Eva Perón



EVALUACION DE LA APOPTOSIS LEUCOCITARIA EN DOS TECNICAS ANESTESICAS: INHALATORIA VS ENDOVENOSA

Protocolo de evaluación de pacientes

Nº de protocolo:
Grupo

Fecha:
Edad:

Sexo:
Talla:
BMI:

T. quirurgico:
T. anestésico:

PARÁMETROS HEMODINÁMICOS:

	BASAL	POST INTUBACIÓN	POST INCISIÓN	FIN CIRUGÍA
TAS				
TAD				
FC				

USO DE ATROPINA: SI NO DOSIS:

USO DE ETILEFRINA: SI NO DOSIS:

LABORATORIO:

	BASAL	INTRAPERATORIA	2 HS POP
HTO			
LEUCOCITOS			
GLUCEMIA			
CORTISOL			
LACTATO			

ANEXINA

	BASAL	INTRAOPERATORIA	2 HS POP
NEUTRÓFILOS			
LINFOCITOS			
MONOCITOS			

IP

	BASAL	INTRAOPERATORIA	2 HS POP

AGRADECIMIENTOS

- Dr. Gustavo Elena, por la redacción y revisión crítica del trabajo.
- Dr. German Sotto, por el aporte científico y revisión crítica del trabajo.
- Lic. en Estad. Guillermina Harvey, por su amplio trabajo en los resultados e interpretación de lo realizado.
- Residentes e Instructores de Anestesiología del Hospital Escuela “Eva Perón” por su colaboración en la realización del estudio.
- Fundación de Anestesiología de Rosario, por su colaboración económica.
- A mi familia por acompañarme.

BIBLIOGRAFIA

1. Schneemilch C; Schilling G: Effects of general anaesthesia on inflammation. *Best practice and Research Clinical Anaesthesiology*. 2004, 18 (3): 493-507.
2. Scholl R; Bekker A; Babu R: Neuroendocrine and Immune Responses to Surgery. *Anesthesiology*. 2012, 30:3-15.
3. Elena G: Evaluación de la funcionalidad de los neutrófilos de pacientes sometidos a colecistectomía por videolaparoscopia bajo anestesia general. *Revista Argentina de Anestesiología*. 2008, 66,5: 399-417.
4. Colucci DG; Puig NR; Hernandez-Pando R: Influence of anaesthetic drugs on immune response: from inflammation to immunosuppression. *OA Anaesthetics*. 2013, 30, 1: 3-21.
5. Ihn CH; Joo JD; Kim DW; 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. *Journal of International Medical Research*. 2009, 37: 1760-1771.
6. Ionescu D; Margarit S; Hadade A; et al: Choice of anesthetic technique on plasma concentrations of interleukins and cell adhesion molecules. *Perioperative Medicine Journal*. 2013, 2: 1-8.
7. Graziola E; Elena G; Gobbo M; et al: Estudio sobre la respuesta de estrés, hemodinámica e inmunológica de dos técnicas anestésicas (inhalatoria e intravenosa) en colecistectomías videolaparoscópicas. *Revista Argentina de Anestesiología*. 2005, 52: 208-216.
8. Osman E; Khafagy H; Yasser M; et al: In vivo effects of different anesthetic agents on apoptosis. *Korean journal Anesthesiology*. 2012, 63, 1: 18-24.
9. Zhang Y; Dong Y; Wu X; et al: The Mitochondrial Pathway of Anesthetic Isoflurane-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285, 6: 4025-4037.
10. Erbas Mesut; Demiraran Yavuz; et al: Comparación de los efectos de la perfusión de sevoflurano, desflurano y del propofol sobre el sistema oxidante/antioxidante durante la anestesia general. *Revista Brasileira de Anestesiología*. 2015; 65(1): 68-72.

11. Allaouchiche Bernard; Debon Richard; et al: Oxidative Stress Status during exposure to Propofol, Sevoflurane and Desflurane. *Critical Care and Trauma*. 2001; 93: 981-5.
12. Hicks Juan; Torres-Ramos Yessica; et al: Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2006; 14 (4): 223-26.
13. Mellon RD; Simone AF; Rappaport BA: Use of anesthetic agents in neonates and young childrens. *Anaesthesia y Analgesia*. 2007, 104: 509-20.
14. Elena G: Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*. 2002, 60,6: 391-401.
15. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007, 35: 495–516.
16. Roth-Isigkeit A; Borstel TV; Seyfarth M; Schmucker P. Perioperative serum levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 b, IL-6, IL-10 and soluble IL-2 receptor in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass without and with correction for hemodilution. *Clin. Exp. Immunol*. 1999, 118: 242-46
17. Longas Valien J; Navarro Hernando A; et al: Estudio de la respuesta celular inmune de tres técnicas de anestesia para histerectomía abdominal simple. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*. 2007; 54: 523-28.
18. Omera Magdy, MD. Do volatile Inhalation Anesthetics Modify the Immune Response in Surgical Patients? *Alexandria Journal of Anaesthesia and Intensive Care*. 2006, 9: 34-44.
19. Lasinska-Kowara Magdalena; Fardel-Reszkiewicz Ewelina; et al: Effects of sevoflurano versus target-controlled infusions of propofol on hemodynamics during elective breast surgery in healthy women. *Anestezjologia Intensywva Terapia*. 2009; 41(3): 135-9.
20. Ahmed Wafaa; Hamdi Nuha: Effects of different anesthetic techniques on inflammatory cytokines response and t lymphocyte subsets in patients undergoing lower abdominal surgery. *Ain Shams Journal of Anesthesiology*. 2012; 5: 43-55.
21. Derya Acar; Karakaş Erkilic Ezgui; et al: The Effects of Different Anaesthetic Techniques on Surgical Stress Response During Inguinal Hernia Operations. *Turk J Anaesth Reanim* 2015; 43: 91-9
22. Mujagi Zlata; Čičko Elsada. Serum levels of glucose and lactate in patients treated under total intravenous anesthesia with propofol-fentanyl and under balanced anesthesia with isoflurane-fentanyl. *Biochemia Medica*. 2007; 17(1):71-8.
23. Delogu Giovanna; Moretti Sonia; et al: Mitochondrial perturbations and oxidant stress in lymphocytes from patients undergoing surgery and general anesthesia. *Arch Surg*. 2001; 1190-6.
24. Loop Torsten; Dovi-Akue David; et al: Volatile Anesthetics induce Caspase-dependent, mitochondria-mediated apoptosis in Human T Lymphocytes in vitro. *Anesthesiology*. 2005; 102, (6): 1147-57.
25. Wei Huafeng; Xie Zhongcong: Anesthesia, Calcium Homeostasis and Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2009; 6(1): 30-5.

26. Yang Hui; Liang Ge; et al: Inhalational Anesthetics Induce Cell Damage by Disruption of Intracellular Calcium Homeostasis with Different Potencies. *Anesthesiology*. 2008; 109(2): 243-250.
27. Bezerra Francisco; Bezerra Nilton; et al: Evaluación de Parámetros Antioxidantes en Ratones Tratados con Sevoflurano. *Rev Bras Anesthesiol*. 2010; 60: 2: 93-97
28. Li Volti Giovanni; Murabito Paolo; et al: Antioxidant properties of propofol: when oxidative stress sleeps with patients. *EXCLI Journal*. 2006; 5:25-32.
29. Chung Hang-, Zon Tsan; et al: Sevoflurane induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food and Chemical Toxicology*. 2006; 44(8): 1399-1407.
30. Tyther R; O'Brien J: Effect of sevoflurane on human neutrophil apoptosis. *Eur J Anaesthesiol*. 2003 Feb; 20(2):1115
31. Leonard S.A; Redmond H.P: Effects of volatile and intravenous anesthetic agents on neutrophil function. *International Anesthesiology Clinic*. 2003; 41(1): 21-9.

