

Revista Colombiana de Anestesiología

Colombian Journal of Anesthesiology

www.revcolanest.com.co



Investigación científica y tecnológica

Efectos de múltiples exposiciones a sevoflurano a dosis sub-CAM en la neuroapoptosis y la función cognitiva en el periodo neonatal



Alejandro Neira^{a,*}, Luisa Fernanda Aguirre^b, Rosa Margarita Gómez^c,
Fernando Ríos Barbosa^d, Jairo Antonio Pérez^e y Alejandra Margarita Muñoz^f

^a Especialista en Anestesiología, Universidad de La Sabana, Master Universidad de Salamanca, Grupo de Investigación en Anestesia Mandrágora, Grupo de Neurociencias US, Hospital Universitario La Samaritana, Bogotá, Colombia

^b Especialista en Anestesiología, Universidad de La Sabana, Grupo de Investigación en Anestesia Mandrágora, Hospital Universitario La Samaritana, Bogotá, Colombia

^c Directora Grupo de Neurociencia US, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

^d Especialista en Anestesiología, Director de Posgrados Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Grupo de Neurociencias US, Chía, Colombia

^e Especialista en Anestesiología y Cuidado Intensivo, Coordinador Anestesiología, Hospital Universitario La Samaritana, Grupo de Investigación en Anestesia Mandrágora, Profesor Clínico Universidad de La Sabana, Intensivista Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, Colombia

^f Especialista Grupo de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 19 de julio de 2013

Aceptado el 5 de febrero de 2014

On-line el 19 de mayo de 2014

Palabras clave:

Apoptosis
Sevoflurano
Ratas posnatales
Cognitivo

R E S U M E N

Introducción: Recientes estudios han sugerido que los niños con múltiples exposiciones anestésicas tienen un mayor riesgo de deterioro neurocognitivo.

Objetivo: Analizar los efectos neurodegenerativos a nivel histológico, cognitivo y del comportamiento posterior a exposiciones repetidas al sevoflurano a dosis inferiores a la concentración alveolar mínima en ratas neonatales.

Métodos: Se expusieron ratas Wistar de 5-7 días durante una hora a sevoflurano al 2,3%; una, 2 o 3 veces con intervalos de 24 h entre exposición. Posteriormente se determinó el efecto del anestésico en la neuroapoptosis mediante marcación inmunohistoquímica con caspasa-3, Fox-3 y CD95. El aprendizaje fue evaluado con el laberinto acuático de Morris, y el comportamiento relacionado a ansiedad, con laberinto elevado en cruz.

Resultados: En todos los grupos experimentales se evidenció apoptosis neuronal medida por caspasa-3, siendo más marcada en el grupo de sevoflurano y en grupos de primera exposición. En laberinto elevado en cruz se encontró un tiempo total de permanencia en brazos abiertos (t test $p=0,113$) estadísticamente no significativo con respecto al grupo control. En el laberinto acuático de Morris se encontró diferencia estadísticamente significativa (t test $p<0,001$) cuando se compara el tiempo de realización de la prueba con respecto al grupo control.

* Autor para correspondencia: Hospital Universitario La Samaritana, Cra. 8 No. 0 - 55 Sur, Bogotá, Colombia.

Correo electrónico: aalejandro.neira@gmail.com (A. Neira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rca.2014.02.006>

0120-3347/© 2013 Sociedad Colombiana de Anestesiología y Reanimación. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Conclusiones: La exposición a sevoflurano en ratas neonatales durante periodos cortos y repetidos induce muerte neuronal posiblemente por apoptosis a través de la activación de caspasa-3. Como consecuencia produce déficit de aprendizaje, principalmente en la adquisición de memoria espacial.

© 2013 Sociedad Colombiana de Anestesiología y Reanimación. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Effects of multiple exposures to sevoflurane at sub-MAC doses on neuroapoptosis and cognitive function during the neonatal period

A B S T R A C T

Keywords:

Apoptosis
Sevoflurane
Postnatal rats
Cognitive

Introduction: Recent studies have suggested that children who are exposed multiple times to anesthesia have an increased risk of neurocognitive impairment.

Objective: To analyze at a histological level the neurodegenerative, cognitive and behavioral effects following repeated exposures to sevoflurane at doses below the minimum alveolar concentration in neonatal rats.

Methods: Wistar rats were exposed to 2.3% sevoflurane, one, two or three times for 1 h, in the course of 5–7 days, with 24-h intervals between each exposure. The neuroapoptotic effect of the anesthetic agent was subsequently determined using immunohistochemical labeling with caspase-3, Fox-3 and CD95. Learning was assessed with the Morris Water Maze, and the anxiety-related behavior was assessed with the Elevated Plus-Maze.

Results: Every experimental group showed evidence of neuronal apoptosis measured with caspase-3; however, the apoptosis was more evident in the sevoflurane group and in the first exposure groups. The total time spent in the open arms of the Elevated Plus-Maze (t test $p = 0.113$) was not statistically significant as compared to the control group. When comparing the test time vs. the control group, the Morris Water Maze showed a statistically significant difference (t test $p < 0.001$).

Conclusions: Sevoflurane exposure of neonate rats for short and repeated time intervals induces neuronal death probably due to apoptosis, through caspase-3 activation. This results in learning deficit, particularly in terms of spatial memory acquisition.

© 2013 Sociedad Colombiana de Anestesiología y Reanimación. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Los numerosos avances en procedimientos quirúrgicos, diagnósticos y terapéuticos han abierto en los niños nuevas posibilidades de repetidas intervenciones que requieren para su realización la administración de anestesia general¹. En consecuencia, fetos y niños cuyas etapas del desarrollo neuronal se inicia en el tercer trimestre de gestación y continúa hasta los 2 a 3 años² se exponen en varias y repetidas oportunidades a diferentes anestésicos en un periodo muy vulnerable.

Dentro de los anestésicos inhalados el sevoflurano ha sido el más frecuentemente usado en la población pediátrica. Debido a sus propiedades, como menor pungencia y bajo coeficiente de partición sangre-gas, permite realizar una inducción anestésica inhalatoria rápida, sin necesidad de un acceso venoso de entrada, en el mantenimiento conserva la ventilación espontánea del paciente durante el acto anestésico y permite una rápida recuperación, características que son muy llamativas en dicha población^{1,3}.

Esta técnica ha permitido realizar múltiples procedimientos en pacientes pediátricos para cirugía general, neurocirugía, urología, oftalmología, gastroenterología, odontología, cirugía

ortopédica, cirugía cardiovascular, toma de imágenes diagnósticas etc.

Diferentes estudios han sugerido que la exposición a diferentes anestésicos en etapas tempranas del neurodesarrollo puede ser un factor de riesgo para la aparición de alteraciones en el aprendizaje, en el comportamiento⁴⁻⁷ y en la inducción de neuroapoptosis⁸. Adicionalmente, se ha evidenciado que estos efectos se incrementan con tiempos prolongados y acumulados de exposición^{6,9}.

Concretamente, se ha encontrado que los niños que tienen múltiples exposiciones anestésicas a temprana edad tienen mayor riesgo de generar trastornos del aprendizaje^{5,6,10}. Estos datos sugieren que los niños expuestos a anestésicos en etapas de neurodesarrollo pueden no lograr todo su potencial cognitivo en comparación con niños no expuestos a anestesia y cirugía, convirtiéndose recientemente estos hallazgos en interés de investigación en salud pública.

Teniendo en cuenta que en la práctica clínica actual es frecuente la exposición corta y el uso de dosis sub-CAM para anestesia general balanceada, este estudio pretende analizar la relación entre exposiciones repetidas a sevoflurano a dosis sub-CAM y la aparición de cambios neurodegenerativos a nivel histopatológico, cognitivo y del comportamiento,

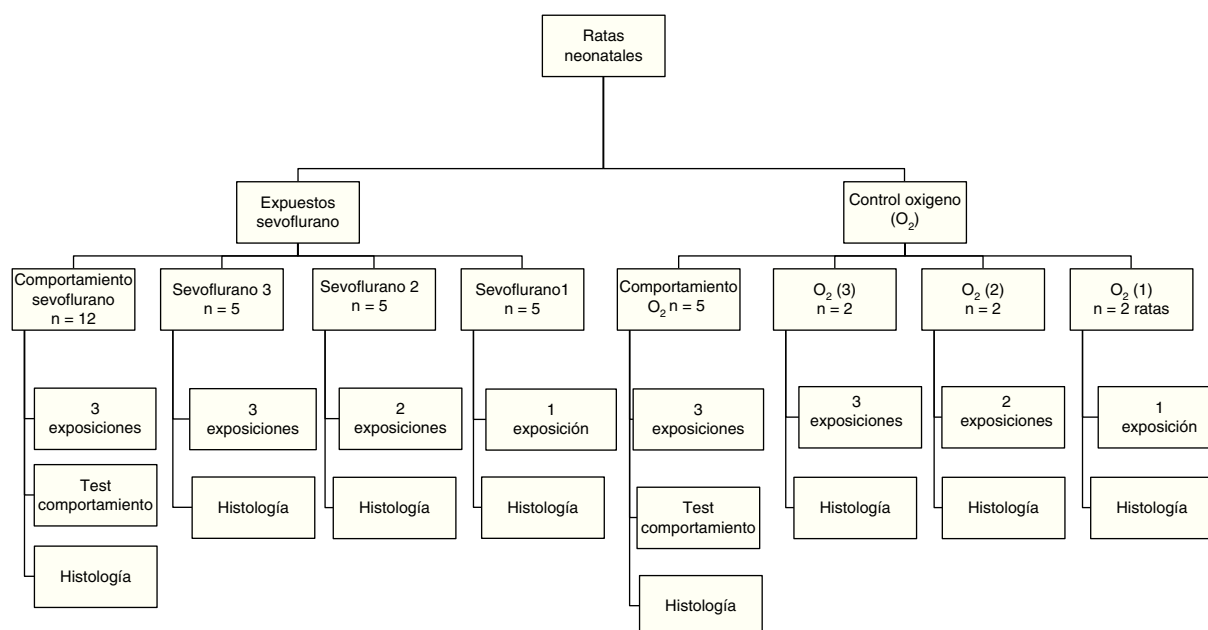


Figura 1 – Flujograma de grupos expuestos y controles. Se detalla el número (n) de animales dispuestos para cada experimento. Los grupos llamados Sevoflurano fueron ratas expuestas a sevoflurano 2,3% por una hora. Los grupos llamados O₂ fueron ratas expuestas a oxígeno 40% por una hora.
Fuente: Autores.

y ello mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica, detección de caspasa-3, Fox 3 y CD95 en tejido neuronal y aplicación de pruebas del comportamiento en ratas neonatales expuestas a este anestésico.

Materiales y métodos

Tratamiento animal y anestesia

Este fue un estudio experimental prospectivo controlado con protocolos basados en procesos operacionales estandarizados. Se utilizaron ratas Wistar de día 5 a 7 postnatal (5P-7P) (Charles Rivers, EE. UU.), y el tamaño de muestra se calculó utilizando la ecuación de Snedecor y Cochran, resultando un $n = 30$ ratas para cada grupo. Siguiendo las recomendaciones 3 R de Russell y Burch y las recomendaciones del *Internacional Laboratory Animal Research* (ILAR) se redujo el número a $n = 25$ para el grupo expuestos y a $n = 11$ para los grupos controles. El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital Universitario La Samaritana y La Universidad de La Sabana. Los animales se alojaron en el Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional y recibieron agua y comida *ad libitum*.

Las ratas neonatales recibieron distintas exposiciones de una hora con sevoflurano al 2,3% (aproximadamente 0,7 concentración alveolar mínima), más una concentración de oxígeno al 40%, mientras que los grupos control recibieron únicamente oxígeno al 40%. Las concentraciones de oxígeno y de sevoflurano se midieron continuamente mediante analizador de gases (GE Datex-Ohmeda, Tewksbury, MA, EE. UU.). La

temperatura de la cámara de anestesia se mantuvo mediante cobija térmica ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Para todos los modelos animales se instauró monitorización de saturación, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria con el equipo de vigilancia de signos vitales (Multi-parameter patient monitor Model TR900A, XuzhounTianrong Medical & Communication Equipment Co., Ltd, China) mediante un pulsioxímetro neonatal sobre el tórax del modelo animal y capnógrafo nasal.

La distribución y el número de animales de los grupos experimentales para las distintas exposiciones se muestran en la [figura 1](#). *Grupos expuestos*: las ratas se distribuyeron en 3 grupos, con una, 2 o 3 exposiciones a sevoflurano con intervalos de 24 h entre exposición. *Grupos controles*: fueron distribuidos de igual manera pero se expusieron a oxígeno al 40%. Al finalizar los animales fueron sacrificados para estudios inmunohistoquímicos con los diferentes marcadores.

Adicionalmente se conformaron grupos de comportamiento, que consistían en ratas que recibieron 3 secciones en el periodo neonatal de sevoflurano con sus respectivos controles y que fueron llevadas a pruebas de comportamiento en el día 60 posnatal (60P), cuando fueron sacrificadas para estudios inmunohistoquímicos.

Se determinó pH y presión parcial de oxígeno (PO_2) y dióxido de carbono (PCO_2), glucosa, hemoglobina, sodio, potasio, cloro y nitrógeno ureico en las ratas neonatales mediante muestras transcárdicas de sangre arterial. Al finalizar los ensayos se analizaron las muestras sanguíneas usando un analizador de gases en sangre (i-STAT Protable Clinical Analyzer; i-STAT Corp., East Windsor, NJ, EE. UU.) con cartuchos CG8+ (Abbott Point of Care Inc., Abbott Park, IL, EE. UU.).

Histología e inmunohistoquímica

Posterior al sacrificio se disecaron los cerebros y se fijaron en paraformaldehído al 4% y luego se mantuvieron en formalina tamponada al 3,7% hasta su procesamiento inmunohistoquímico. Los cerebros se cortaron coronalmente y se incluyeron en parafina para coloración de hematoxilina-eosina de rutina y de inmunohistoquímica. Para esta última, las láminas se trataron para el desenmascaramiento de antígenos con buffer Tris-EDTA y se bloquearon sitios inespecíficos con albúmina sérica bovina al 10% en tris buffer salino por 2 h a temperatura ambiente y se aplicaron anticuerpos primarios anti caspasa-3 en ratón 1:50 (Sigma), anti CD-95 en ratón 1:50 (Sigma) y anti-Fox-3 1:1000 (Sigma), con una incubación por 8 h a 4 °C; como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón biotinilado, y finalmente el conjugado Streptavidin-HRP (Vector). Se hizo coloración de contraste con hematoxilina de Harris.

Se realizó análisis morfológico en los cortes de hematoxilina-eosina y se tomaron fotografías de los hallazgos importantes. Para la técnica de inmunohistoquímica se analizaron el hipocampo, la corteza prefrontal y el tálamo, ubicando 5 campos para cada una de las áreas en cada modelo animal experimental y control. Para la tabulación de la inmunotinción de cada uno de los marcadores (anti-caspasa-3, anti-CD95, anti-Fox-3) se utilizó una escala semicuantitativa en donde cero es negativo para tinción, 1 leve tinción, 2 moderada tinción y 3 severa tinción.

Pruebas de comportamiento

Se realizaron pruebas de comportamiento en las ratas de 60P que habían recibido sevoflurano en su periodo neonatal, y en sus controles. Las funciones de memoria y aprendizaje fueron determinadas por el laberinto acuático de Morris, y el comportamiento social, por el laberinto elevado en cruz.

Laberinto acuático de Morris

Evalúa la memoria espacial mediante la colocación de una rata en una piscina (150 cm de diámetro y 60 cm de altura) con agua hasta una altura de 1,0 cm arriba de la cima de una plataforma de 10 cm de diámetro. Cada rata fue colocada en la piscina para la búsqueda de dicha plataforma durante 60-120 s, realizando un entrenamiento una vez al día por 7 días. Las distancias recorridas y el tiempo en localizar la plataforma se registraron mediante el sistema de videograbación continua, y los datos fueron analizados usando el software de detección de movimiento ANY-maze versión 4.84.

Laberinto elevado en Cruz

Es un dispositivo con 4 brazos distribuidos en forma de cruz; cada brazo mide 50 × 12 cm y están elevados 50 cm sobre el suelo. Dos de sus brazos (brazos cerrados [BC]), están colocados uno al frente del otro y tienen paredes laterales de 40 cm de altura. Los otros dos brazos (brazos abiertos [BA]) son de iguales dimensiones y con igual orientación, pero carecen de paredes laterales. Con esta herramienta se evalúa la exploración de la rata en un nuevo ambiente que presenta 2 zonas diferentes: una potencialmente aversiva (BA) y otra segura (BC), basado en el miedo incondicionado que tiene los roedores a los espacios abiertos. Se calculó para cada rata

la actividad exploratoria, midiendo los diferentes parámetros como el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, tiempo que permanecen en los brazos abiertos y cerrados, número total de entradas, que son índices de diferentes componentes como ansiedad y actividad motora. El porcentaje de tiempo que permanece en los brazos abiertos se usó como índice de ansiedad relacionada con el comportamiento. Igualmente todos los procedimientos fueron filmados y grabados en vídeo para su análisis en ANY-maze versión 4.84.

Análisis estadístico

Se describieron los datos según su naturaleza: variables cuantitativas en medias y desviaciones estándar, y variables cualitativas en frecuencias y porcentajes; se describieron tanto variables independientes como desenlace. Se evaluó la distribución de las variables cuantitativas mediante test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, y según su resultado se decidió la realización de t test para muestras independientes (de contar con 2 grupos de muestras) o test ANOVA (para análisis de varios grupos con distribución normal a la vez); de ser necesario para inspeccionar el origen de la diferencia, se ejecutó análisis post hoc-test de Scheffe. Para análisis de variables cuantitativas sin distribución normal se recurrió al test no paramétrico de U Mann-Whitney. Para variables cualitativas, como nominales dicotómicas y el análisis de menos de 25 datos, se realizó test exacto de Fischer. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas las que presentaran una $p < 0,05$ para cada contraste de hipótesis. Para el análisis inmunohistoquímico se realizó un recuento semicuantitativo con grados leve, moderado y severo.

Resultados

Inmunohistoquímica para caspasa-3

Para el análisis de los tejidos se hizo énfasis en 3 áreas del cerebro: el hipocampo, la corteza prefrontal y el tálamo (fig. 2). Se ubicaron 5 campos en cada área. Se utilizó una escala semicuantitativa y los promedios se aproximaron al número entero.

Hipocampo

Como se observa en la tabla 1, en el hipocampo 2 de los grupos control, O₂(1) y O₂(2), tuvieron marcación positiva en intensidad severa y moderada, respectivamente, específicamente en los estratos granular y piramidal (fig. 3A), y el grupo control O₂(3) no mostró marcación. Los grupos expuestos a sevoflurano fueron positivos en intensidad moderada para el grupo sevoflurano 1, y leve para los grupos sevoflurano 2 y sevoflurano 3. En los grupos de comportamiento (que se evaluaron 2 meses después de las exposiciones) se observó marcación negativa en el grupo de comportamiento oxígeno y marcación leve para comportamiento sevoflurano (fig. 3B y C).

Corteza prefrontal

En la tabla 2 se verifica que en la corteza también hubo marcación positiva en los grupos O₂(1) y O₂(2) (fig. 4A). En los grupos

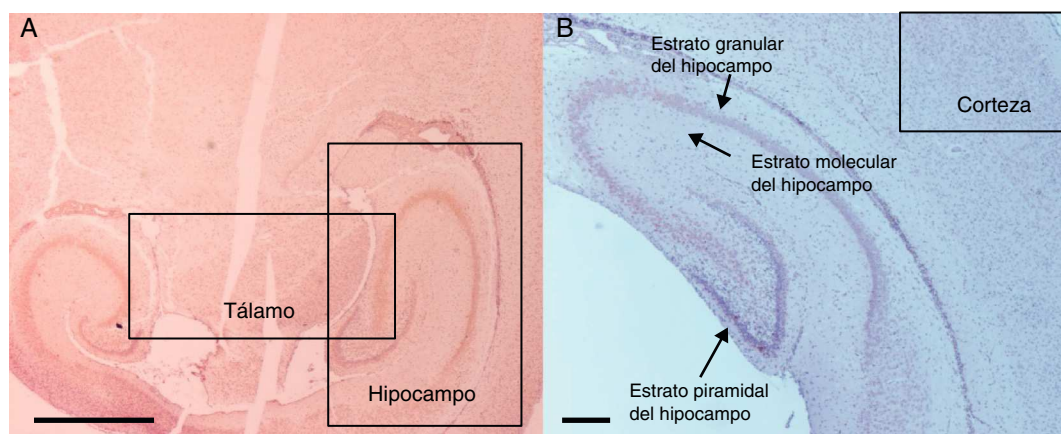


Figura 2 – Microfotografías de histología de zonas encefálicas evaluadas en un cerebro de rata neonatal expuesto a sevoflurano. Se muestran las distintas áreas estudiadas. 2 A) Tálamo e hipocampo, corte transversal. Barra escala 1 mm. 2 B) Corteza prefrontal y estratos del hipocampo, corte coronal. Barra escala 100 μ m. Las secciones se tiñeron para inmunohistoquímicamente revelar la activación de caspasa-3.
Fuente: Autores.

expuestos hubo marcación positiva en intensidad moderada en sevoflurano 1 y leve en sevoflurano 2 y sevoflurano 3 (fig. 4 B y C). En los grupos de comportamiento los resultados fueron iguales a los encontrados en el hipocampo: negativo para el comportamiento, las distancias recorridas y el tiempo en localizar la plataforma de oxígeno, y leve para el comportamiento sevoflurano.

Tálamo

En la tabla 3 se observa que, al igual que en el hipocampo y la corteza prefrontal, 2 de los grupos control marcaron positivo para caspasa-3, O₂(1) y O₂(2) (intensidad leve para cada uno de los grupos). En los grupos expuestos todos dieron marcación positiva, moderada para el grupo sevoflurano 1 (fig. 5A) y leve para los otros 2 grupos expuestos (fig. 5B). En los grupos de

Tabla 1 – Datos de inmunotinción en hipocampo por grupos. Se utilizó una escala semicuantitativa en la que 0 es negativo para tinción, 1 leve tinción, 2 moderada tinción y 3 severa tinción

Grupo/Animal	1	2	3	4	5	X	Aprox
O ₂ (1)	2,8	3				2,9	3
O ₂ (2)	2,8	1,4				2,1	2
O ₂ (3)	0	0				0	0
Sevoflurano 1	1,2	3	2,8	0		1,8	2
Sevoflurano 2	0	2,4	3	0	0	1,08	1
Sevoflurano 3	3	2,6	0	0	0	1,12	1
Comportamiento oxígeno	0	0	0	0		0	0
Comportamiento sevoflurano	1,4	0	1,8	0	0	0,4	0,64

Fuente: Autores.

Aprox: aproximación a número entero; X: promedio.

Tabla 2 – Datos de inmunotinción en corteza prefrontal por grupos

Grupo/Animal	1	2	3	4	5	Promedio	
O ₂ (1)	2,8	2,8				2,8	3
O ₂ (2)	2	0				1	1
O ₂ (3)	0	0				0	0
Sevoflurano 1	2	3	3	0	3	2,2	2
Sevoflurano 2	0	1	3	0	0	0,8	1
Sevoflurano 3	3	2,2	0	0	0	1,04	1
Comportamiento oxígeno	0	0	0	0		0	0
Comportamiento sevoflurano	0,8	0	1,6	0	0	0,76	1

Fuente: Autores.

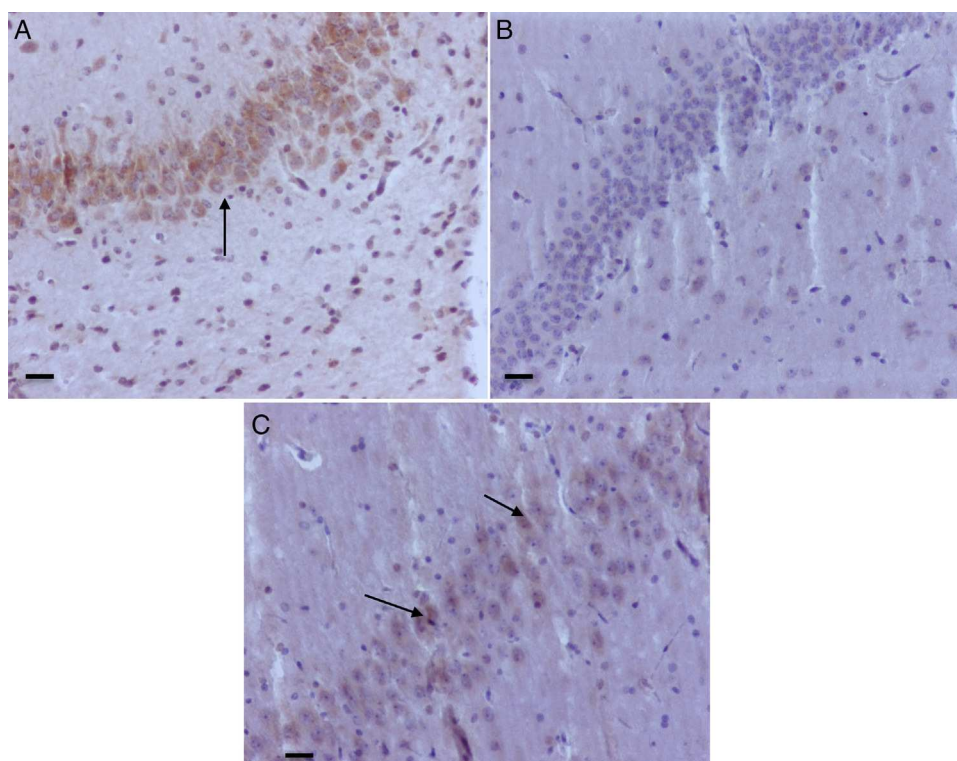


Figura 3 – Estratos granulares de hipocampo de diferentes grupos. A) Rata neonatal del grupo control O₂; obsérvese la positividad del marcador anti-caspasa-3 (fecha). B) Rata adulta del grupo comportamiento-oxígeno, sin positividad para el marcador anti-caspasa-3 C) Rata adulta del grupo comportamiento-sevoflurano; presenta leve positividad para anti-caspasa-3 en el estrato granular (flechas). Barra escala 100 μm.

Fuente: Autores.

comportamiento el marcador fue negativo en esta zona tanto para comportamiento oxígeno como para comportamiento sevoflurano (fig. 5C).

Morfología

El análisis morfológico de las ratas neonatales no reveló lesiones en neuronas ni células de glía. En contraste, en las ratas adultas (expuestas a oxígeno o sevoflurano y a las cuales se les realizaron pruebas de comportamiento 60 días después) se observaron lesiones en neuronas principalmente en la corteza y en el hipocampo. En las ratas

adultas control (comportamiento oxígeno) se observaron focos pequeños de muerte neuronal en la corteza (fig. 6A), y allí se observaron neuronas con marcación positiva para caspasa-3 (fig. 6B).

En el grupo de ratas adultas expuestas a sevoflurano se observaron focos de muerte neuronal en corteza pero más extensos que los de los animales control. Allí también se observaron neuronas con marcación positiva para caspasa-3 (fig. 7A y B). Igualmente en el hipocampo se observaron focos moderados de muerte neuronal en el estrato piramidal, en los animales de comportamiento oxígeno y severos en los de comportamiento sevoflurano (fig. 8A y B). En el tálamo no

Tabla 3 – Datos de inmunotinción en tálamo por grupos

		Tálamo							
Campo explorado		1	2	3	4	5	Promedio		
O ₂ (1)		1	1				1		1
O ₂ (2)		1	1				1		1
O ₂ (3)		0	0				0		0
Sevoflurano 1		1	3	2,2	1,6	1,6	1,88		2
Sevoflurano 2		0	1,2	3	0	0	0,84		1
Sevoflurano 3		1,4	1,4	0	0	0	0,56		1
Comportamiento oxígeno		0	0	0	0		0		0
Comportamiento sevoflurano	1	0	0	0	1	0,2	0	0	0,275

Fuente: Autores.

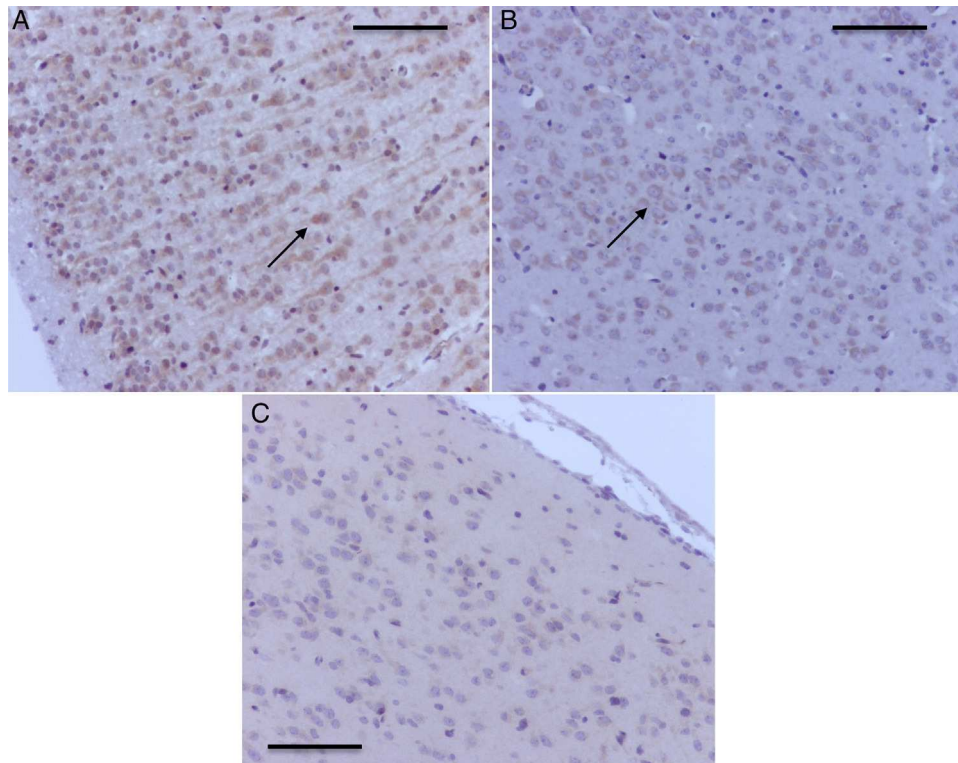


Figura 4 – Microfotografías representativas de corteza prefrontal con activación para caspasa-3. A) Rata del grupo O₂(1) con una exposición. Nótese la marcación positiva severa en las neuronas corticales B) Rata del grupo sevoflurano 1. Obsérvese la marcación positiva moderada en las neuronas de la corteza prefrontal (flecha) C) Rata del grupo sevoflurano 2, con la marcación positiva leve en las neuronas (flechas). Barra escala 50 μ m.
Fuente: Autores.

Tabla 4 – Tiempo en brazos abiertos, en segundos

Tratamiento	n	Promedio	DE	Datos	
Expuestos	8	498,54 $\pm$ 40,07	492,9 (1) 446,5 (4) 492,3 (7),	522,2 (2) 563,2 (5), 446,0 (8)	529,4 (3) 495,8 (6)
Oxígeno	5	418,70 $\pm$ 104,35	232,6 (9) 464,2 (12)	454,7 (10) 464,5 (13)	477,5 (11)

DE: desviación estándar.

Los números entre paréntesis a continuación de los datos son el número de cada animal.

Tabla 5 – Promedio duración en brazos abiertos, en segundos

Tratamiento	n	Promedio	DE	Datos		
Expuestos	8	43,14 $\pm$ 21,31	25,9 (1) 93,9 (5)	37,3 (2) 31,0 (6)	40,7 (3) 44,8 (7)	34,3 (4) 37,2 (8)
Oxígeno	5	32,92 $\pm$ 9,07	25,8 (9)	41,3 (10)	43,4 (11)	30,9 (12) 23,2 (13)

DE: desviación estándar.

Los números entre paréntesis a continuación de los datos son el número de cada animal.

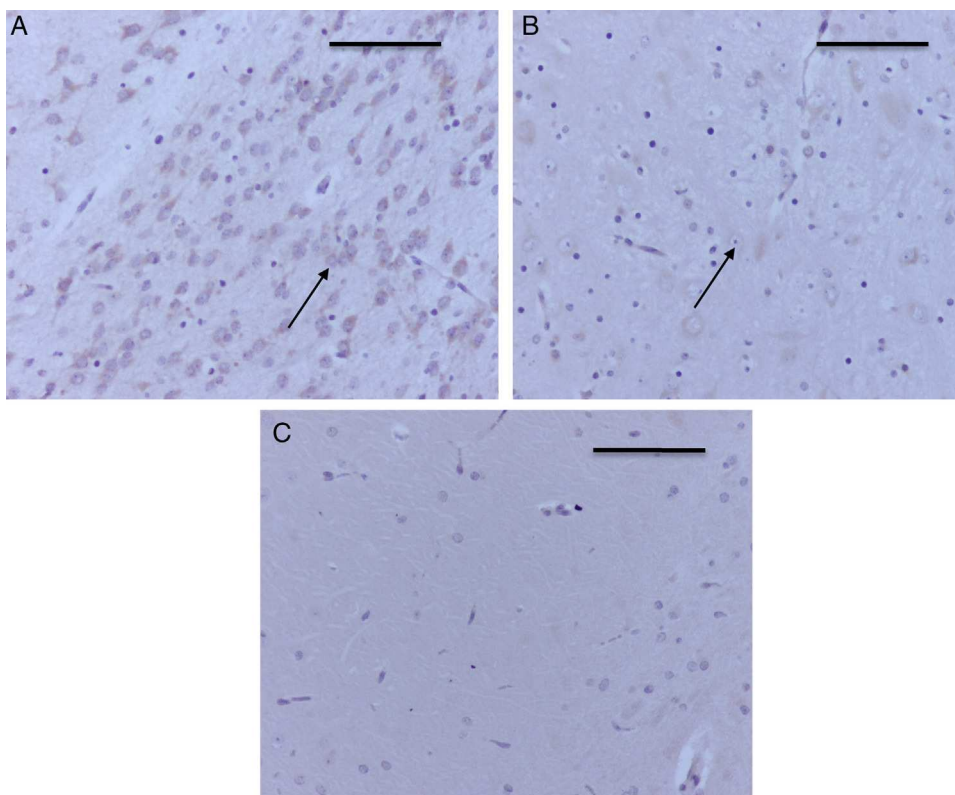


Figura 5 – Inmunoperoxidasa para caspasa-3 en tálamo. A) Rata del grupo sevoflurano 1; obsérvese la marcación positiva moderada en las neuronas del tálamo (flechas). B) Rata del grupo sevoflurano 2; obsérvese la marcación positiva leve en las neuronas del tálamo (flecha). C) Rata del grupo comportamiento-sevoflurano; obsérvese la ausencia de marcación en las neuronas. Barra escala 50 μ m.

Fuente: Autores.

se observaron focos de muerte neuronal en ninguno de los grupos de animales (fig. 8C).

Pruebas de comportamiento

Laberinto elevado en cruz

En general, se observa diferencia entre el tiempo de permanencia en los brazos abiertos entre los sujetos del grupo

expuesto y el de los controles, mostrando que permanecen más tiempo en los brazos cerrados los no expuestos a sevoflurano, coincidiendo con el comportamiento normal de las ratas, que muestran preferencia por los brazos cerrados.

Las ratas expuestas a sevoflurano permanecieron más tiempo en los brazos abiertos ($43,14 \pm 21,31$ s), en comparación con las del grupo control ($32,92 \pm 9,07$) (tabla 4 y fig. 9). Las ratas no expuestas a sevoflurano permanecieron más tiempo en los

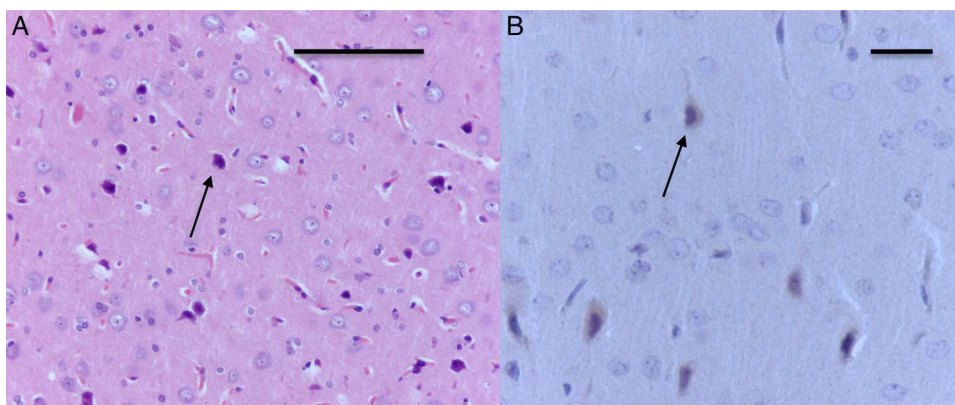


Figura 6 – Corte de corteza de rata del grupo comportamiento-oxígeno. A) Se observan focos pequeños de muerte neuronal (flecha) (H-E). Barra escala 50 μ m. B) Inmunohistoquímica para anti-caspasa-3; obsérvese las neuronas necróticas y la marcación positiva leve para el marcador (flecha). Barra escala 20 μ m (H-E).

Fuente: Autores.

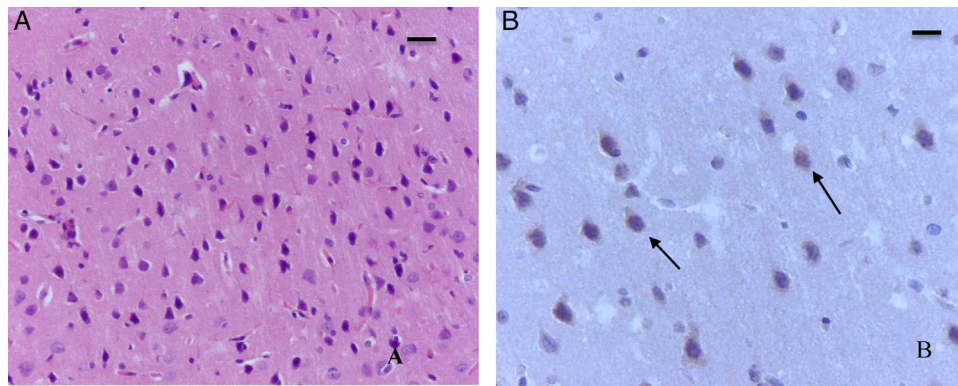


Figura 7 – Corte de corteza de rata del grupo comportamiento-sevoflurano. A) Coloración de HE. Se observan focos extensos de muerte neuronal (flechas). Barra escala 25 μ m. B) Inmunohistoquímica para caspasa-3. Se detallan las neuronas necróticas y la marcación positiva leve para el marcador (flechas). Barra escala 15 μ m.

Fuente: Autores.

brazos cerrados ($13 \pm 3,94$ s), coincidiendo con el comportamiento normal de las ratas, quienes normalmente muestran preferencia por los brazos cerrados (tabla 5 y fig. 9).

Laberinto acuático de Morris

Al evaluar la distancia total atravesada, el número de entradas a la zona de la isla, los tiempos en la zona de la isla y la distancia recorrida hasta la primera entrada a la isla no se vieron diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, los

ratones expuestos recorrieron una mayor distancia antes de llegar a la plataforma y encontraron más veces la plataforma (tablas 6 y 7).

Discusión

Frecuentemente prematuros, recién nacidos a término, lactantes y mujeres en gestación deben ser llevados en repetidas

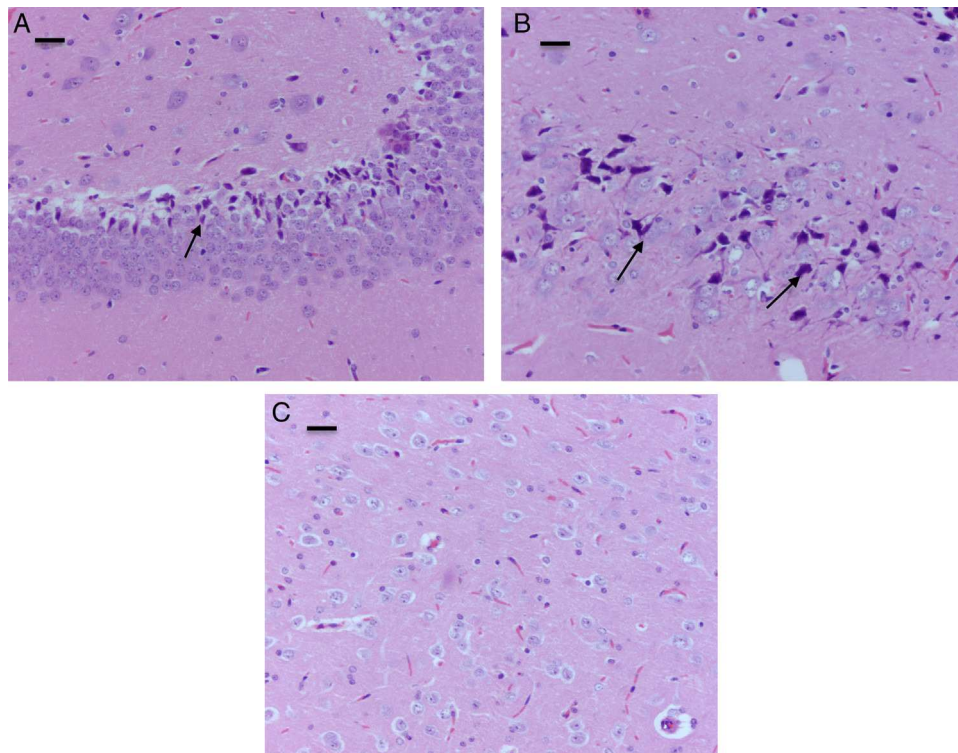


Figura 8 – Focos moderados de muerte neuronal en el estrato piramidal. A) Coloración de H-E. Corte de hipocampo de rata del grupo comportamiento-sevoflurano. Se observan focos moderados de muerte neuronal en el estrato piramidal. B) Coloración de H-E. Corte de hipocampo de rata del grupo comportamiento-sevoflurano. Se observan focos de moderados de muerte neuronal (flechas). C) Coloración de H-E. Corte de tálamo de un animal del grupo comportamiento-sevoflurano; no se observan focos de muerte neuronal. Barra escala 25 μ m.

Fuente: Autores.

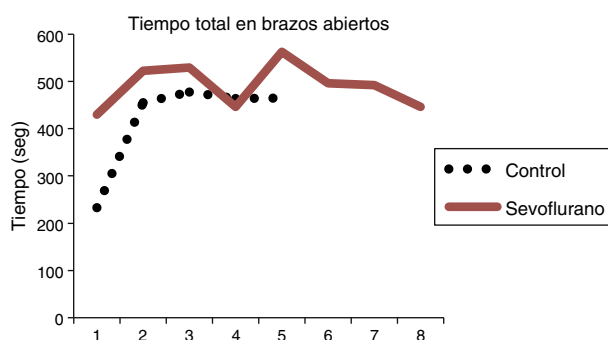


Figura 9 – Laberinto elevado en cruz. Tiempo de permanencia en brazos abiertos.
Fuente: Autores.

ocasiones a procedimientos quirúrgicos o diagnósticos bajo anestesia general o sedación.

Durante la práctica diaria mundial, la anestesia inhalatoria ha sido la técnica más común de la anestesia pediátrica, y debido a sus propiedades, como menor pungencia y bajo coeficiente de partición sangre-gas. Dentro de los anestésicos inhalados el sevoflurano es el más frecuentemente usado en la población pediátrica actualmente.

Nuestros resultados muestran que en ratas neonatas expuestas a sevoflurano, independientemente del régimen anestésico, se produjo muerte neuronal, aun en bajas dosis. Existe fuerte evidencia en modelos animales que la exposición a diferentes anestésicos induce daños morfológicos en células del cerebro y déficit cognitivo^{11,12}. En el desarrollo del cerebro se observó en diferentes animales experimentales un daño dependiendo de la dosis y la duración, siendo estas últimas relevantes en la clínica y mostrando déficit cognitivo a largo plazo¹³. En cuanto a los mecanismos potenciales

involucrados, se conoce que los anestésicos interactúan con los receptores de GABA y con los del NMDA, dando como resultado neuroapoptosis y otros mecanismos de daño. En esta investigación observamos un aumento en el número de células apoptóticas (caspasa-3 positivas) en el hipocampo, la corteza prefrontal y el tálamo, confirmando que una de las vías de muerte neuronal es la apoptosis a través de la activación de caspasa-3. Se ha reportado que los anestésicos pueden inducir apoptosis por daño en la mitocondria y salida del citocromo C al citosol en el citoplasma celular¹⁴, disparando cambios celulares que culminan en la activación de caspasa-3^{15,16}. Otras investigaciones en esta línea sugieren que los anestésicos aumentan las señales que promueven la muerte celular programada y activan Bax y p53¹⁴, y al mismo tiempo disminuyen las cascadas de señalización de supervivencia tales como pERK, Bclx y Bcl-2^{15,17}. Además, muestran que la exposición de anestésicos en un cerebro en desarrollo puede producir daños excitotóxicos asociados a la expresión de la proteína transportadora de iones¹³.

En cuanto a las regiones del cerebro estudiadas (hipocampo, corteza prefrontal y tálamo), mostraron afectación, como lo reporta la literatura y corresponden a las zonas que reciben e integran información sensorial, que son críticas en la función neurocognitiva. A nivel celular se afectan las neuronas y las células gliales con daños en la oligodendroglia con consecuencias en el neurocomportamiento¹³.

Es importante destacar que las ratas expuestas a oxígeno mostraron también marcación positiva a este marcador, lo que puede significar que el oxígeno puede ser neurotóxico e inducir muerte neuronal por apoptosis en este estado de desarrollo.

De otra parte, es necesario tener en cuenta la edad de exposición, el rango de vulnerabilidad de los diferentes tipos celulares neuronales, el anestésico y la dosis aplicada¹³. Un ejemplo es el trabajo de Zhan et al.¹⁸, en el que encontraron en láminas de hipocampo un incremento del calcio intracelular

Tabla 6 – Distancia recorrida hasta la primera entrada a la plataforma (metros)

Tratamiento	N	Promedio	DE	Datos
Expuestos	31	13,6306	± 12,1651	7,625 ⁽¹⁾ , 15,606 ⁽¹⁾ , 0,389 ⁽¹⁾ , 33,313 ⁽²⁾ , 24,563 ⁽²⁾ , 11,296 ⁽²⁾ , 39,072 ⁽³⁾ , 5,423 ⁽³⁾ , 15,979 ⁽³⁾ , 9,751 ⁽⁴⁾ , 37,098 ⁽⁵⁾ , 12,384 ⁽⁵⁾ , 9,580 ⁽⁵⁾ , 1,178 ⁽⁵⁾ , 22,460 ⁽⁶⁾ , 24,404 ⁽⁶⁾ , 7,771 ⁽⁶⁾ , 3,330 ⁽⁶⁾ , 2,706 ⁽⁷⁾ , 32,498 ⁽⁹⁾ , 3,199 ⁽⁹⁾ , 10,759 ⁽¹⁰⁾ , 2,767 ⁽¹⁰⁾ , 2,784 ⁽¹⁰⁾ , 3,436 ⁽¹⁰⁾ , 2,429 ⁽¹¹⁾ , 2,377 ⁽¹¹⁾ , 26,678 ⁽¹²⁾ , 16,292 ⁽¹²⁾ , 1,513 ⁽¹²⁾ , 33,888 ⁽¹²⁾
Oxígeno	14	8,9711	± 10,6347	7,864 ⁽¹³⁾ , 12,985 ⁽¹³⁾ , 2,873 ⁽¹³⁾ , 5,491 ⁽¹⁴⁾ , 4,379 ⁽¹⁴⁾ , 19,885 ⁽¹⁵⁾ , 39,087 ⁽¹⁶⁾ , 0,806 ⁽¹⁶⁾ , 1,975 ⁽¹⁷⁾ , 1,638 ⁽¹⁷⁾ , 17,744 ⁽¹⁸⁾ , 1,300 ⁽¹⁸⁾ , 7,629 ⁽¹⁸⁾ , 1,939 ⁽¹⁸⁾

DE: desviación estándar.

Los números en paréntesis seguidos a los valores corresponden al número de animales.

Tabla 7 – Número de entradas a la zona de la plataforma

Tratamiento	N	Promedio	DE	Datos
Expuestos	48	0,65	± 0,48	1 ⁽¹⁾ , 0 ⁽¹⁾ , 1 ⁽¹⁾ , 1 ⁽¹⁾ , 1 ⁽²⁾ , 1 ⁽²⁾ , 1 ⁽²⁾ , 0 ⁽²⁾ , 1 ⁽³⁾ , 1 ⁽³⁾ , 0 ⁽³⁾ , 1 ⁽³⁾ , 0 ⁽⁴⁾ , 1 ⁽⁴⁾ , 0 ⁽⁴⁾ , 0 ⁽⁴⁾ , 1 ⁽⁵⁾ , 1 ⁽⁵⁾ , 1 ⁽⁵⁾ , 1 ⁽⁵⁾ , 1 ⁽⁶⁾ , 1 ⁽⁶⁾ , 1 ⁽⁶⁾ , 0 ⁽⁷⁾ , 0 ⁽⁷⁾ , 1 ⁽⁷⁾ , 0 ⁽⁷⁾ , 0 ⁽⁸⁾ , 0 ⁽⁸⁾ , 0 ⁽⁸⁾ , 0 ⁽⁸⁾ , 0 ⁽⁸⁾ , 0 ⁽⁹⁾ , 1 ⁽⁹⁾ , 0 ⁽⁹⁾ , 1 ⁽⁹⁾ , 1 ⁽¹⁰⁾ , 1 ⁽¹⁰⁾ , 1 ⁽¹⁰⁾ , 1 ⁽¹¹⁾ , 0 ⁽¹¹⁾ , 1 ⁽¹¹⁾ , 0 ⁽¹¹⁾ , 1 ⁽¹²⁾ , 1 ⁽¹²⁾ , 1 ⁽¹²⁾ , 1 ⁽¹²⁾
Oxígeno	24	0,58	± 0,50	0 ⁽¹³⁾ , 1 ⁽¹³⁾ , 1 ⁽¹³⁾ , 1 ⁽¹³⁾ , 0 ⁽¹⁴⁾ , 1 ⁽¹⁴⁾ , 0 ⁽¹⁴⁾ , 1 ⁽¹⁴⁾ , 0 ⁽¹⁵⁾ , 1 ⁽¹⁵⁾ , 0 ⁽¹⁵⁾ , 0 ⁽¹⁵⁾ , 0 ⁽¹⁶⁾ , 1 ⁽¹⁶⁾ , 0 ⁽¹⁶⁾ , 1 ⁽¹⁶⁾ , 0 ⁽¹⁷⁾ , 0 ⁽¹⁷⁾ , 1 ⁽¹⁷⁾ , 1 ⁽¹⁸⁾ , 1 ⁽¹⁸⁾ , 1 ⁽¹⁸⁾ , 1 ⁽¹⁸⁾

DE: desviación estándar.

Los números en paréntesis seguidos a los valores corresponden al número de animales.

de ratas adultas expuestas a isoflurano, indicando un mecanismo independiente que resulta en un déficit cognitivo. Xie et al.¹⁹ exponen que las ratas con anestesia (isoflurano) desarrollan un incremento de la activación de caspasa.

En ratas adultas que fueron sometidas durante su etapa neonatal se presentaron focos extensos de muerte neuronal en la corteza y el hipocampo. En las ratas adultas expuestas únicamente a oxígeno también se observaron focos de muerte neuronal leve, mucho menos extensos en estas mismas ubicaciones. Estas lesiones se vieron reflejadas en cambios de comportamiento al hacer las pruebas de memoria y ansiedad, en las que tanto la corteza como el hipocampo están comprometidos. En relación con la memoria espacial, los animales expuestos a sevoflurano recorrieron, en el laberinto acuático de Morris, una mayor distancia antes de llegar a la plataforma, en comparación con los expuestos a oxígeno, mostrando dificultades en la memoria. En cuanto a la ansiedad, las ratas expuestas a sevoflurano mostraron más ansiedad al permanecer más tiempo en los brazos abiertos en comparación con los controles. Estos hallazgos son similares a otros previos. Es así como se ha comprobado que el uso de sevoflurano con exposiciones al 3% durante 6 h en ratones neonatales (C57BL/6) de 6 días mostraron aumento en el número de células apoptóticas, causando déficit de aprendizaje en los adultos²⁰. Los estudios de Stratmann et al.²¹ muestran que el uso de anestésicos como el isoflurano en ratas de 7 y 60 días expuestas 4 h da como resultado una disminución de la proliferación en ratas de 7 días y un aumento en la diferenciación en ratas de 60 días, sosteniendo la hipótesis de que el isoflurano afecta la función de neurocognición a largo plazo en relación con la neurogénesis del hipocampo en el giro dentado²¹.

También se ha comprobado que los anestésicos, además de producir neuroapoptosis, intervienen en la sinaptogénesis durante el desarrollo del cerebro; esto se realizó en ratas de 16 días con exposiciones de 2 h, y este periodo de desarrollo se caracteriza por intensa sinaptogénesis en la corteza cerebral, dando como resultado muerte celular y cambios significativos en el patrón dendrítico de las 5 capas de la corteza. Pero en el caso del sevoflurano hay un aumento significativo en la densidad de las espinas dendríticas, revelando diferencias con los otros anestésicos²².

Kodama et al.²³ demostraron que los ratones adultos tratados con anestésicos inhalados presentan deterioro de la memoria a largo plazo, sin anomalías significativas detectadas por pruebas de campo abierto y laberinto elevado en cruz en la actividad y ansiedad relacionada con el comportamiento, respectivamente.

Investigaciones recientes sugieren que la anestesia con 3% de sevoflurano por 2 h diarias durante 3 días induce problemas cognitivos y neuroinflamación que dependen del estado de desarrollo, del agente anestésico y del número de exposiciones, y que juegan un papel en la disfunción cognitiva¹⁰.

Zhang et al.²⁴ muestran resultados que sugieren que la anestesia con sevoflurano en animales prenatales induce activación de caspasa y pérdida de sinapsis, llevando a daños en el aprendizaje y la memoria.

Los resultados de nuestro estudio se correlacionan ampliamente con la literatura descrita. Respecto a la monitorización de signos vitales durante la exposición anestésica y su control, podemos observar en nuestro estudio que las ratas expuestas

a sevoflurano tuvieron una tendencia a presentar menores valores de saturaciones de oxígeno y frecuencia cardíaca, que fueron no estadísticamente significativos para la saturación de oxígeno (t test $p=0,86$) y estadísticamente significativos para la frecuencia cardíaca ($p<0,001$) cuando se compara el grupo de exposición a sevoflurano y el grupo control.

Estos resultados corresponden a la depresión del sistema nervioso y cardiorrespiratorio esperada por la exposición anestésica. Sin embargo, es importante aclarar que no presentaron hipoxemia (valor mínimo de 90%) ni bradicardia durante la exposición (valor mínimo de 151 latidos/min).

En resumen, se puede decir que el sevoflurano a dosis sub-CAM y en tiempos cortos de exposición induce neurodegeneración y que el comportamiento en adultos parece estar asociados a susceptibilidad del cerebro pero no afecta el funcionamiento del sistema nervioso. Además, la memoria espacial de ratas adultas expuestas tiene una respuesta baja que se correlaciona con el análisis de los estudios de comportamiento. Es necesario continuar la investigación enfocados en la prevención de la neurotoxicidad anestésica y poder establecer los límites de seguridad con mayor precisión, buscando el mejor beneficio para nuestros pacientes pediátricos²⁵.

Conclusiones

La exposición repetida a sevoflurano a dosis sub-CAM durante periodos cortos en la edad neonatal no altera significativamente el comportamiento asociado a ansiedad en la edad adulta en ratas. Sin embargo, puede causar déficit de aprendizaje, principalmente en la adquisición de memoria espacial.

En ratas adultas que fueron sometidas durante su etapa neonatal se presentaron focos extensos de muerte neuronal en la corteza y en el hipocampo.

En las ratas adultas expuestas únicamente a oxígeno también se observaron focos de muerte neuronal leve, mucho menos extensos en estas mismas ubicaciones.

Estas lesiones se vieron reflejadas en cambios de comportamiento al hacer las pruebas de memoria y ansiedad, en las cuales tanto la corteza prefrontal como el hipocampo están comprometidos.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Universidad de La Sabana, Sociedad Colombiana de Anestesiología y Reanimación, Premio en Investigación 2011, XXIX Congreso de Anestesiología y Reanimación y el Hospital Universitario La Samaritana.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Facultad de Medicina Universidad de La Sabana, Hospital Universitario La Samaritana, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Dra. Lucía Botero, S.C.A.R.E. y Myriam Leguizamón.

REFERENCIAS

1. Davis PJ, Cladis FP, Motoyama EK. *Smith's Anesthesia for Infants and Children*. 8th ed Philadelphia: Mosby-Elsevier; 2011. p. 4-7.
2. Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: Relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol*. 1978;4:345-56.
3. Lerman J, Sikich N, Kleinman S, Yentis S. The pharmacology of sevoflurane in infants and children. *Anesthesiology*. 1994;80:814-24.
4. Loepke AW, Soriano SG. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth Analg*. 2008;106:1681-707.
5. Mellon RD, Simone AF, Rappaport BA. Use of anesthetic agents in neonates and young children. *Anesth Analg*. 2007;104:509-20.
6. Wilder RT, Flick RP, Sprung J, Katusic SK, Barbaresi WJ, Mickelson C, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. *Anesthesiology*. 2009;110:796-804.
7. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience*. 2005;135:815-27.
8. Stratmann G, Sall JW, May LD, Bell JS, Magnusson KR, Rau V, et al. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology*. 2009;110:834-48.
9. Lu Y, Wu X, Dong Y, Xu Z, Zhang Y, Xie Z. Anesthetic sevoflurane causes neurotoxicity differently in neonatal naïve and Alzheimer disease transgenic mice. *Anesthesiology*. 2010;112:1404-16.
10. Shen X, Dong Y, Xu Z, Wang H, Miao C, Soriano SG, et al. Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. *Anesthesiology*. 2013;118:502-15.
11. Creeley CE, Olney JW. The young: Neuroapoptosis induced by anesthetics and what to do about it. *Anesth Analg*. 2010;110:442-8.
12. Hudson AE, Hemmings HC. Are anaesthetics toxic to the brain? *Br J Anaesth*. 2011;107:30-7.
13. Brambrink AM, Back SA, Riddle A, Gong X, Moravec MD, Dissen GA, et al. Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain. *Ann Neurol*. 2012;72:525-35, 1.
14. Shu Y, Patel SM, Pac-Soo C, Fidalgo AR, Wan Y, Maze M, et al. Xenon pretreatment attenuates anesthetic-induced apoptosis in the developing brain in comparison with nitrous oxide and hypoxia. *Anesthesiology*. 2010;113:360-8.
15. Cattano D, Young C, Straiko MMW, Olney JW. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg*. 2008;106:1712-4.
16. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. *Cell Death*. *N Engl J Med*. 2009;361:1570-83.
17. Ma D, Williamson P, Januszewski A, Nogaro M-C, Hossain M, Ong LP, et al. Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology*. 2007;106:746-53.
18. Zhan X, Fahlman CS, Bickler PE. Isoflurane neuroprotection in rat hippocampal slices decreases with aging: changes in intracellular Ca₂ regulation and N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca₂ influx. *Anesthesiology*. 2006;104:995-1003.
19. Xie Z, Culley DJ, Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, et al. The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid β -protein level in vivo. *Ann Neurol*. 2008;64:618-27.
20. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology*. 2009;110:628-37.
21. Stratmann G, May LDV, Sall JW, Alvi RS, Bell JS, Ormerod BK, et al. Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day-old rats. *Anesthesiology*. 2009;110:849-61.
22. Briner A, de Roo M, Dayer A, Muller D, Habre W, Vutskits L. Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during synaptogenesis. *Anesthesiology*. 2010;112:546-56.
23. Kodama M, Satoh Y, Otsubo Y, Araki Y, Yonamine R, Masui K, et al. Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory. *Anesthesiology*. 2011;115:979-91.
24. Zhang B, Tian M, Zheng H, Zhen Y, Yue Y, Li T, et al. Effects of anesthetic isoflurane and desflurane on human cerebrospinal fluid α [beta] and τ level. *Anesthesiology*. 2013;119:52-60.
25. Ibla JC. Anesthesia and neurodegeneration: Where is the missing link? *Rev Colomb Anestesiol*. 2011;39:471-5.