



Artículo original

Genotoxicidad y citotoxicidad del sevoflurane en dos líneas celulares humanas *in vitro* con radiación ionizante

Genotoxicity and cytotoxicity of sevoflurane in two human cell lines *in vitro* with ionizing radiation

Alcaraz M¹; Quesada S¹; Armero D²; Martín-Gil R³; Olivares A¹; Achel GD⁴

¹ Departamento de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina/Odontología. Universidad de Murcia. 30100 Espinardo. Murcia. España.

² Departamento de Enfermería. Facultad de Enfermería. Universidad de Murcia. 30100 Espinardo. Murcia. España.

³ Departamento de Anestesia. Virgen de la Arrixaca. Hospital General Universitario, 30120. El Palmar. Murcia. España.

⁴ Centro de Biología Aplicada a la radiación, Instituto de Investigación Radiológica y Ciencias Médicas, Comisión de Energía Atómica de Ghana, Legon-Accra, Ghana.

Alcaraz M; Quesada S; Armero D; Martín-Gil R; Olivares A, Achel GD. Genotoxicity and cytotoxicity of sevoflurane in two human cell lines *in vitro* with ionizing radiation. *Colomb Med.* 2014; 45(3): 104-9

© 2014 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten.

Historia:

Recibido: 9 Abril 2013

Revisado: 11 Julio 2014

Aceptado: 15 Agosto 2014

Palabras clave:

Anestesia, genotoxicidad, micronúcleos, efectos de la radiación, sevoflurano

Keywords:

Anaesthesia, genotoxicity, micronucleus, radiation effects, sevoflurane

Resumen

Objetivo: Determinar la capacidad genotóxica del anestésico sevoflurano en células expuestas a radiación ionizante.

Métodos: La genotoxicidad del sevoflurane se determinó mediante el test del bloqueo citocinético de linfocitos humanos irradiados bloqueados con citochalasin. La capacidad citotóxica se determinó mediante el test de viabilidad celular e inhibición del crecimiento celular (MTT) en células PNT2 (epiteliales de próstata), comparando sus resultados con los inducidos por diferentes dosis de rayos X.

Resultados: Se ha determinado un efecto citotóxico del sevoflurane sobre las células PNT2 que presenta correlación con la dosis administrada y el tiempo de estudio utilizado ($p > 0.001$), así como un efecto genotóxico con características dosis-dependientes ($p > 0.001$). Sin embargo, con volúmenes de sevoflurane puro inferiores a 30 μL no encontramos efecto citotóxico sobre las células PNT2.

Conclusión: Sevoflurane muestra una significativa capacidad genotóxica *in vitro* determinada mediante el test de micronúcleos en linfocitos humanos irradiados con bloqueados citocinético mediante citochalasin.

Abstract

Objective: To determine the *in vitro* toxicity of different concentrations of sevoflurane in cells exposed to X-ray.

Methods: The genotoxic effects of sevoflurane were studied by means of the micronucleus test in cytokinesis-blocked cells of irradiated human lymphocytes. Subsequently, its cytotoxic effects on PNT2 (normal prostate) cells was determined using the cell viability test (MTT) and compared with those induced by different doses of X-rays.

Results: A dose- and time-dependent cytotoxic effect of sevoflurane on PNT2 cells was determined ($p > 0.001$) and a dose-dependent genotoxic effect of sevoflurane was established ($p > 0.001$). However, at volumes lower than 30 μL of sevoflurane at 100%, a non-toxic effect on PNT2 cells was shown.

Conclusion: sevoflurane demonstrates a genotoxic capacity as determined *in vitro* by micronucleus test in cytokinesis-blocked cells of irradiated human lymphocytes.

Autor de correspondencia:

Miguel Alcaraz. Departamento de Radiología y Medicina Física, Facultad de Medicina / Odontología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo 30100-Murcia. Tel: 0034 868883601. Fax: 00 34 868884150. E-mail: mab@um.es.

Introducción

El sevoflurano es un anestésico general ampliamente utilizado, especialmente adecuado en los procedimientos quirúrgicos cortos y en cirugía ambulatoria¹. Sus principales ventajas son la inducción rápida de la anestesia mientras se mantiene la respiración espontánea y su contribución a la estabilidad hemodinámica del paciente². Su toxicidad fue inicialmente descubierta mientras se buscaban los efectos del sevoflurano en la función hepática³. Se ha implicado en la producción de metabolitos tóxicos, y en la inducción de hipertermia maligna⁴.

La exposición a la inhalación de anestésicos genera «activaciones» de pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya sea directamente, mediante la interacción con la cadena de transporte de electrones mitocondriales; o indirectamente, a través de una cascada de señalización en la que receptores-G acoplados a la proteína, proteinquinasas, y canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) juegan un papel importante. Esta atenuación de la respiración puede causar una fuga de electrones desde la matriz mitocondrial interna y aumentar la generación de ROS^{5,6}. El Sevoflurano también puede desencadenar directamente la formación de peroxinitros y aumentar significativamente el H_2O_2 intracelular y/o el peróxido, superóxido y óxido nítrico (NO) en los neutrófilos polimorfonucleares periféricos tras 1 h de tratamiento. Por otra parte, también se ha demostrado la intensificación del agotamiento del glutatión intracelular (GSH) en neutrófilos. Estos resultados son importantes ya que demuestran el estrés oxidativo inducido por la administración de sevoflurano que se realiza por medio del incremento de la concentración de ROS^{6,7}.

El estrés oxidativo inducido por el aumento de los niveles de ROS también es el mecanismo clásico por el cual las radiaciones ionizantes inducen su daño genotóxico. El test de micronúcleos se ha utilizado con éxito para evaluar este daño genotóxico^{8,9} tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”. Además, usando esta técnica se han descrito que la administración de diversas sustancias antioxidantes tiene efectos genoprotectores contra el daño cromosómico inducido por la radiación ionizante¹⁰⁻¹².

En este estudio pretendemos determinar un posible efecto genotóxico del sevoflurano mediante el ensayo de micronúcleos. Para ello, vamos a cuantificar el número de micronúcleos por cada 1,000 células binucleadas en muestras de sangre expuestas a sevoflurano y compararla con las muestras de sangre controles y expuestas a radiación ionizante, cuyo efecto genotóxico está asumido por numerosos autores.

Materiales y Métodos

Productos químicos y reactivos

Sevoflurano se obtuvo de Abbot (Madrid, España) y se administró puro en diferentes volúmenes (5-40 μ L). RPMI 1640, F10, PHA, DMSO, citochalasin B, estreptomycin, penicilina, fosfato salino tamponado (PBS) y 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT), se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España). El suero fetal bovino se obtuvo de Gibco (EE.UU.); el ácido acético glacial y el etanol se obtuvieron de Scharlao SL (Madrid, España), el metanol se obtuvo de Panreac (Madrid, España); la heparina sodica al 5% se obtuvo de

Laboratorios Rovi (Madrid, España) y el ácido rosmarínico (RO) al 95% se obtuvo de Extrasynthese (Genay, Francia).

Curva de supervivencia celular y cuantificación de viabilidad: prueba de MTT

Condiciones de la línea y de cultivo celular

La línea celular PNT2 utilizada se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) Colección de Cultura, Agencia de Protección de la Salud (Catálogo n° 95012613, HPACC, Reino Unido). Se realizaron ensayos durante todo el estudio para confirmar la ausencia de Mycoplasma spp. Las células PNT2 (células epiteliales normales de próstata humana) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (FBS) (10%), glutamina (2 mM) y estreptomycin más penicilina (100 μ g/mL y 100 UI/mL, respectivamente). Todos los procesos se realizaron en una cámara de flujo laminar vertical Cultair ASB tipo II. Los cultivos de células PNT2 se mantuvieron a 37° C y una humedad relativa del 95%, en atmósfera de CO_2 al 5%, en una incubadora Cytoperm®. El medio de cultivo se cambió cada dos días o cuando la acidificación lo recomendaba mediante el indicador de pH (rojo fenol). Tras la irradiación, todas las placas se incubaron durante 24, 48 y 72 h, sin realizar cambios del medio de cultivo. Para determinar los posibles efectos radioprotectores se incluyeron pocillos de control positivo conteniendo 20 μ L de DMSO (0.2%) y RO al 25 μ M en los estudios de supervivencia celular.

Prueba de MTT

Para analizar los efectos del sevoflurano sobre la viabilidad celular y la supervivencia celular en las células PNT2, se utilizó el test de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-tetrazolio bromuro de difenil (MTT) para períodos de incubación de 24, 48 y 72 h. Brevemente: los cultivos celulares se incubaron en 200 μ L de medio y se dejaron adherir durante 24 h. Después del tratamiento con las dosis antes mencionadas de sevoflurano, y para los tiempos de incubación mencionados, se añadió medio de crecimiento suplementado y 50 μ L de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo en placas de 96 pocillos que se incubaron a 37° C durante 4 h en una atmósfera de CO_2 al 5%. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 900 rpm durante 8 min para eliminar cuidadosamente el medio y el MTT no metabolizado y se añadieron 100 μ L de DMSO a cada pocillo para solubilizar el MTT adquirido por las células vivas. Tras agitar durante 30 min a temperatura ambiente, las placas se leyeron con un espectrofotómetro Multiskan® MCC/340P utilizando 570 nm para la lectura y 690 nm para las longitudes de onda de referencia. Los pocillos de control negativo se utilizaron para determinar la línea de base cero. Cada experimento se repitió en tres ocasiones.

Efecto Genotóxico: MN (MNCB)

Las muestras de sangre y el procedimiento de irradiación: las muestras de sangre periférica humana fueron donadas por seis mujeres jóvenes supuestamente sanas no fumadoras que fueron heparinizadas. El sevoflurano se administró al 100% en tres volúmenes diferentes (5, 20 y 40 μ L); 20 μ L de RO (25 μ M) y de DMSO (0.2%), respectivamente se añadieron a 2 mL de sangre para determinar sus posibles efectos genoprotectores y se incluyeron como controles positivos. Las muestras se homogeneizaron inmediatamente antes de la irradiación con rayos X.

Técnica de cultivo

El test de micronúcleos (MN) se llevó a cabo en linfocitos irradiados y bloqueados citocinéticamente tras la irradiación con rayos X (MNCB), siguiendo el método descrito por Fenech (1985)¹³ y adaptado por la Agencia Internacional de Energía Atómica (2011). Brevemente: las muestras de sangre (0.5 mL) se cultivaron a 37° C durante 72 h en 4.5 mL de medio F-10 que contenía suero bovino fetal al 15%, 1.6 µg/mL de fitohemaglutinina, 1% de penicilina/estreptomicina y 1 µg/mL de glutamina. Cuarenta y cuatro horas después de la iniciación de los cultivos de linfocitos, se añadieron 150 µL de citocalasina B a una concentración de 6 µg/mL. A las 72 h, los linfocitos se trataron con una solución hipotónica (KCl 0.075 M) durante 3 min y se fijaron usando metanol:ácido acético (3:1). Las preparaciones se secaron al aire y se tiñeron con May-Grünwald Giemsa 24 h más tarde. Cada experimento se repitió en tres ocasiones.

Recuento de micronúcleos

Se analizaron los cultivos por triplicado para cada volumen de sevoflurano o muestra estudiada. En cada una, se analizaron 3,000 células citocinéticamente bloqueadas (3,000 CB/muestra estudiada) para determinar la frecuencia de micronúcleos (MN/500 CB) que fueron examinadas por dos especialistas a doble ciego utilizando un microscopio óptico Zeiss (Oberkochem, Alemania), con un aumento de 400x para examinar las preparaciones y una amplificación de 100x para confirmar la presencia o ausencia de MN en las células, de acuerdo con criterios previamente recomendados^{8,9}.

Irradiación

Las muestras fueron expuestas a rayos X con un aparato Andrex de SMART 200E (YXLON International, Hamburgo, Alemania) con 4.5 mA, 36 cm distancia foco objeto (FOD) y temperatura ambiente. Las dosis de radiación fueron monitorizadas mediante un dosímetro universal UNIDOS[®] con cámaras de ionización PTW Farme[®] TW 30010 (PTW-Freiburg, Freiburg, Alemania) en el interior de la cabina de irradiación y las dosis de rayos X fueron confirmadas posteriormente mediante dosímetros de termoluminiscencia (TLD) (GR-200[®], Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China). Los TLDs fueron suministrados y medidos por el CIEMAT (Ministerio de Industria y Energía, España). En el ensayo de micronúcleos de linfocitos humanos con bloqueo citocinético (CBMN) se irradiaron con 2 Gy de rayos X, mientras que para obtener la curva de supervivencia celular y la cuantificación de la viabilidad celular (prueba de MTT) se administraron diferentes dosis de rayos X (5, 10, 15, 20 y 0 Gy como control).

Análisis estadístico

En el estudio de genotoxicidad, se ha determinado el grado de dependencia y correlación entre variables mediante análisis de varianza complementado por contraste de medias ($p < 0.05$). Las medias cuantitativas se compararon mediante análisis de regresión y correlación lineales. Además, se utilizó la fórmula descrita por Sarma y Kesavan (1993)^{8,9} para determinar la capacidad de protección mediante la expresión: Magnitud de Protección (%) = $((F_{\text{control irradiado}} - F_{\text{irradiadas-tratadas}}) / F_{\text{control irradiado}}) \times 100$. Donde $F_{\text{control irradiado}}$ = frecuencia de MN en linfocitos de sangre no tratados pero irradiados y $F_{\text{irradiadas-tratadas}}$ = frecuencia de MN en linfocitos de sangre tratadas con las sustancias e irradiada.

En los ensayos de citotoxicidad, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para comparar los porcentajes de supervivencia celular en los cultivos con diferentes concentraciones de sevoflurano, complementado con la menor deferencia significativa analizada con contraste de pares y medias. Los análisis se llevaron a cabo mediante la transformación logarítmica de los datos para cumplir con las condiciones de ANOVA.

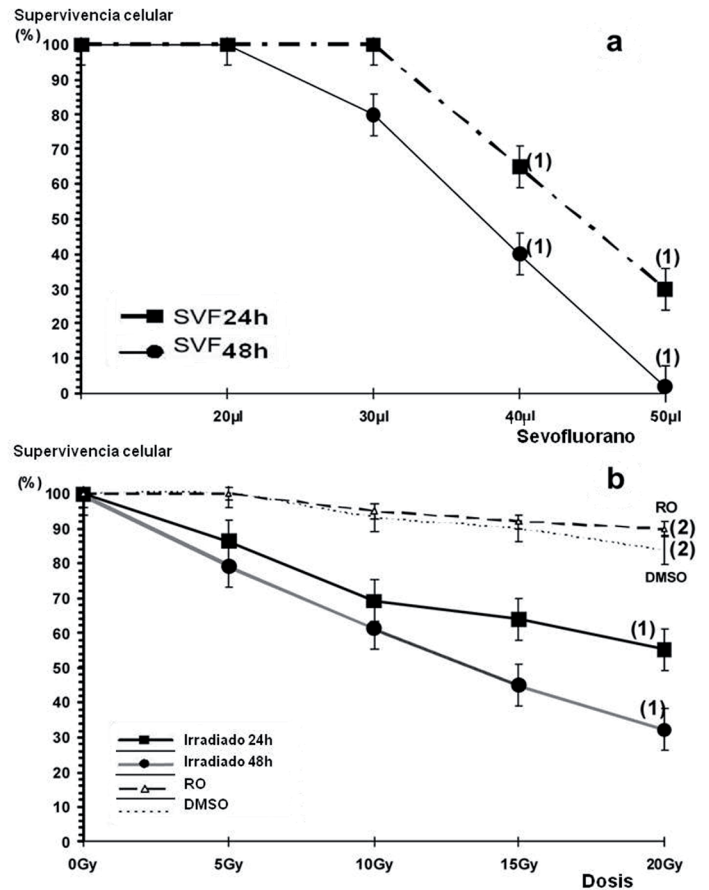


Figura 1. a) Efecto de diferentes volúmenes de sevoflurano sobre la viabilidad celular de las células PNT2. b) efectos de las dosis de radiación sobre la viabilidad celular de PNT2 después de 24 y 48 h de incubación. Los resultados se expresan como un porcentaje de células PNT2 supervivientes respecto al control (RO: ácido rosmarínico 25 µM irradiado e incubado durante 48 h; DMSO: dimetil sulfóxido al 0,2% irradiado e incubado durante 48 h) (1) $p < 0.001$ versus control, (2) $p < 0.001$ versus control irradiado.

Resultados

En los estudios de citotoxicidad, el tratamiento de células PNT2 con volúmenes crecientes de sevoflurano durante 24 y 48 h muestra una disminución de la viabilidad celular, dosis y tiempo dependiente ($p < 0.001$) (Fig. 1a). Todos los volúmenes superiores a 30 µL de sevoflurano mostraron un grado significativo de citotoxicidad (Fig. 1a). La exposición a rayos X sola también muestra una disminución de la viabilidad celular, dosis y tiempo dependiente ($p < 0.001$) (Fig. 1b). La administración de 20 µL de RO (25 µM) o DMSO (0.2%) antes de la irradiación con rayos X aumentó la supervivencia de las células PNT2 de forma significativa, lo que expresa una significativa capacidad radioprotectora ($p < 0.001$) (Fig 1b).

En el estudio genotóxico, la frecuencia basal de MN/500 CB fue de 10 ± 2 MN/500 CB para los controles no irradiados de

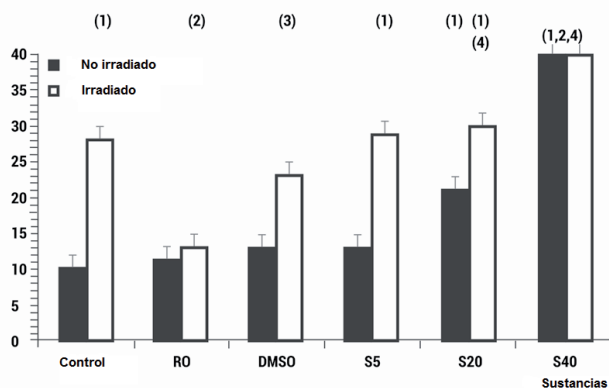


Figura 2. El efecto genotóxico (Frecuencia de MN/500CB) de diferentes volúmenes de sevoflurano y rays X: C control, RO ácido rosmarínico, DMSO dimetil sulfóxido y S₅, S₂₀, S₄₀ son diferentes volúmenes de sevoflurano (en µL) administrado solo o antes de la irradiación ((1) $p < 0.001$ versus control no irradiado, (2) $p < 0.001$ versus control irradiado, (3) $p < 0.01$ versus control irradiado, (4) $p < 0.001$ frente a S₅ no irradiada.

los linfocitos humanos utilizados en el ensayo citogenético. La irradiación con 2 Gy de rayos X produce un aumento significativo en la aparición de MN, que llegó a 28 ± 4 MN/500 CB ($p < 0.001$), lo que expresa un daño genotóxico inducido por los rayos X (Fig. 2). La administración de RO y DMSO utilizado como controles positivos de un agente radioprotector, muestra una disminución significativa en la frecuencia de aparición de MN cuando se administra antes de la irradiación ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente). Esto expresa la capacidad genoprotectora de estas sustancias contra el daño cromosómico inducido por los rayos X (Fig. 2); determinándose magnitudes de protección de 53.6% y 18.0%, respectivamente.

La administración de sevoflurano muestra un incremento significativo de la frecuencia de aparición de MN dosis-dependiente, en comparación con la frecuencia en sus controles ($p < 0.001$) (Fig. 1b), lo que expresa la existencia de un efecto genotóxico inducido por el sevoflurano. El efecto genotóxico producido por la administración de sevoflurano no muestran diferencias significativas con el inducido por la administración de sevoflurano junto con la irradiación, excepto cuando se utilizan las dosis o volúmenes de sevoflurano más pequeños (5 µL) ($p < 0.01$).

Discusión

La frecuencia de aparición de micronúcleos es una medida fiable tanto de la rotura cromosómica como de la pérdida de fragmentos en los cromosomas; lo que la caracteriza de otras pruebas o ensayos citogenéticos. Este daño cromosómico es un indicador de genotoxicidad y en última instancia, puede dar lugar a la inducción de aneuploides, constituyendo también un acontecimiento importante en la carcinogénesis^{6,13}. Nuestro objetivo ha sido comparar el daño cromosómico inducido por el sevoflurano con el daño inducido por los rayos X mediante la evaluación de su capacidad genotóxica utilizando el ensayo de micronúcleos.

En estudios previos, nosotros hemos utilizado este ensayo de micronúcleos para determinar la capacidad genotóxica

de la radiación ionizante *in vivo* con rayos X^{14,15}, e *in vitro* con radiación gamma^{10-12,16} tanto con dosis altas de radiación¹⁷ como en el umbral de sensibilidad del test (48 cGy)^{18,19}. También hemos utilizado el ensayo de MN para determinar el efecto genoprotector de diferentes sustancias antioxidantes frente al daño cromosómico inducido por los rayos X *in vivo* en médula ósea de ratón (PCEs)^{14,15} o *in vitro* con radiación gamma en cultivos de linfocitos bloqueados con citocalasina B^{9,16,18} en presencia o ausencia de diferentes sustancias que proporcionan una protección química con/sin presencia de tioles^{10,14,15}. Nuestros resultados en este estudio muestran capacidades genotóxicas similares a las descritas para los rayos X y unas capacidades genoprotectoras de las sustancias antioxidantes ensayadas similares a las que hemos descrito previamente, especialmente cuando los antioxidantes están presentes en el medio biológico antes de la irradiación *in vivo* en médula ósea de ratón^{10,14} e *in vitro* en linfocitos humanos bloqueados mediante citocalasina-B^{8,9}.

Nuestros resultados en este estudio muestran un efecto genotóxico dosis-dependiente del sevoflurano determinado mediante el ensayo CBMN tras haber corregido las dosis de sevoflurano que eran citotóxicas en las curvas de supervivencia (MTT) en las células PNT2. Nosotros hemos identificado un efecto genotóxico del Sevoflurano con las características de un poderoso agente mutagénico y con características similares a las descritas para la radiación gamma o los rayos X.

En este sentido, los primeros estudios determinaron un incremento en la frecuencia de aparición de MN, por lo que se sugirió un posible efecto genotóxico del sevoflurano²⁰. Sin embargo, otros estudios posteriores describieron resultados contradictorios. Se ha descrito un incremento de cromátides hermanas (SCE) en pacientes adultos sometidos a anestesia tras una exposición de 60 min al anestésico^{21,22}. Este incremento de SCE en el grupo expuesto a las sustancias anestésicas se obtuvo al compararlos con otro grupo de personal médico tomado como grupo control²²; sin embargo, en otro estudio, el incremento de la SCE en niños sometidos a anestesia con sevoflurano durante 50 min de exposición no pudo establecer incremento significativo de MN, sumándose a algunas descripciones realizadas sobre personas ocupacionalmente expuestas a la inhalación de gases anestésicos y a otros pacientes expuestos a sevoflurano²³ en donde no se muestra efecto genotóxico.

Diferentes autores describen que los resultados obtenidos por el ensayo de MN (ensayo de CBMN y Cometa) se contradicen con los obtenidos mediante el ensayo de SCE²⁴. En estos estudios, el ensayo de MN bajo condiciones de exposición ocupacional con un nivel bajo de sevoflurano no se asocia con un aumento en la frecuencia de aparición de MN²⁴. Nuestro estudio muestra que las dosis pequeñas de sevoflurano (5 µL) no son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de MN, lo que podría interpretarse como que no tiene un efecto genotóxico a esta dosis. Sin embargo, nosotros hemos sugerido que el ensayo de MN tiene una limitación cuando se utiliza para evaluar la genotoxicidad del sevoflurano: el ensayo de MN tiene un umbral de sensibilidad muy alta (límite de detección), por lo que los agentes (químicos o físicos) que no son intensamente genotóxicos pueden no ser detectados. En realidad, el principal inconveniente del ensayo de micronúcleos (CBMN) está en la variabilidad de la frecuencia basal de micronúcleos,

por lo que sólo en la exposición a radiaciones ionizantes *in vivo* superiores a 20-30 cGy pueden ser detectadas por la técnica²⁵. Así, como también ocurre en nuestro estudio, agentes físicos o dosis ligeramente tóxicas de sevoflurano en exposiciones a corto plazo, pueden no inducir un incremento en la frecuencia de MN y tener un efecto genotóxico indetectable bajo numerosas condiciones experimentales, lo que podría llevar a la conclusión de que no tienen ninguna capacidad mutagénica o genotóxica

Posiblemente por ello, algunos autores han descrito la ausencia de efecto genotóxico de pequeñas dosis de sevoflurano utilizando el ensayo Cometa^{23,24}. Además, también se debe reseñar que la incubación de PBL con 1% de DMSO, como el que se utiliza como un disolvente para los anestésicos en los procedimientos de rutina, puede producir una disminución de la longitud del cometa dificultando la determinación de su efecto²³. En este estudio²³ se describe que el daño del ADN por sevoflurano no era diferente al observado para sus controles realizados con DMSO; y por lo tanto, concluyó que pequeñas dosis de sevoflurano no ejercen actividad genotóxica *in vitro*. Sin embargo, los autores también describen una disminución en la longitud media del cometa en una disolución con DMSO del anestésico, y sugieren que podrían explicarse de dos formas: (i) por la estabilización de las paredes celulares por el DMSO, o (ii) por la influencia inhibitoria de la isoforma CYP2E del citocromo P450 responsable de la activación de componentes del sevoflurano y otros análogos²³.

Nuestros resultados con DMSO y con las dosis más bajas de sevoflurano (5 µL) son también similares entre sí y no presentan diferencias significativas. El DMSO es un potente antioxidante con las características clásicas similares a los radioprotectores más potentes que contienen azufre (tioles) y muestran una significativa capacidad de genoprotección, tanto *in vivo* como *in vitro*, disminuyendo el daño inducido por la radiación ionizante. Esta capacidad genoprotectora podría atribuirse a su capacidad antioxidante, eliminadora de radicales libres, en los sistemas biológicos cuando se administra antes de la irradiación^{8,9}. Dado que el efecto de sevoflurano también podría ser debido a la inducción de un estrés oxidativo, el DMSO utilizado para disolverlo podría ayudar a ocultar su efecto genotóxico sobre todo con las dosis más bajas de sevoflurano. Cuando las dosis de sevoflurano son suficientemente altas, provoca una genotoxicidad significativa *in vivo* que se asemeja con la respuesta descrita con el ensayo del Cometa⁶, en donde se describe un aumento sustancial de la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica en todos los grupos de animales expuestos. Nuestros resultados también demuestran una genotoxicidad significativa del sevoflurano cuando se administra a altas dosis, que alcanza un máximo de incremento de aparición de MN con dosis pre-tóxicas (40 µL); lo que es comparativamente es muy parecido a la capacidad genotóxica inducida por la exposición a 2 Gy de rayos X.

Diferentes estudios han descrito que el pretratamiento con sevoflurano ayuda a la genoprotección frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS). Pero además, el sevoflurano también pueden desencadenar directamente la formación de peroxinitritos aumentando significativamente el H₂O₂ intracelular, el anión superóxido y los niveles de óxido nítrico (NO) en PMN tras 1 h de tratamiento, incrementando así el agotamiento de glutatión endógeno intracelular (GSH)⁷. Así, el estrés oxidativo sería el

mecanismo de acción utilizado por el sevoflurano para inducir el daño cromosómico, de una forma similar al mecanismo de acción de los rayos X.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento combinado de sevoflurano+rayos X produce un efecto aditivo o sinérgico, lo que explicaría el aumento de la genotoxicidad observada en el presente estudio. Las especies reactivas derivadas del NO inhiben enzimas, fragmentan el ADN, modifican bases, destruyen los lípidos de membrana oxidándolos, y consumen antioxidantes celulares; lo que explica el efecto que hemos descrito en el tratamiento combinado de sevoflurano+IR. La GSH, el más importante tiol intracelular es considerado como un radioprotector por su capacidad para actuar como básico en un importante número de reacciones de desintoxicación⁹. Una disminución de los niveles intracelulares de GSH, por lo tanto, aumenta la sensibilidad de las células a una posterior acción de la radiación. La observación de los resultados de nuestros tratamientos combinados utilizando sevoflurano e IR, sugiere que podría actuar el sevoflurano de una manera similar al efecto de radiosensibilización que se produce con el cisplatino cuando se administra junto con radiaciones ionizantes, como se ha descrito previamente por diferentes autores⁶.

Los mecanismos de acción descritos en el estrés oxidativo, la formación de radicales libres y una caída en los niveles endógenos de antioxidantes celulares inducidos por el sevoflurano son similares a los mecanismos de acción descritos para explicar el efecto mutagénico de los rayos X⁹ y la radiación y con cesio radiactivo⁸ en lo que respecta a la muerte celular y a su capacidad genotóxica. Diferentes autores han sugerido el uso de suplementos alimentarios con antioxidantes para reducir el daño genotóxico causado por los gases anestésicos residuales en la exposición ocupacional, con objeto de reducir el efecto genotóxico y el estrés oxidativo producidos. Del mismo modo, otros autores también han descrito que el uso de diferentes sustancias antioxidantes incluidas dentro una la dieta humana (como conteniendo RO) puede ofrecer protección contra el daño biológico inducido por IR en los trabajadores expuestos a la radiación y pacientes sometidos a los exámenes radiológicos en radiodiagnóstico y medicina nuclear^{8,9}.

Conclusión

La administración *in vitro* de sevoflurano a dosis altas, aunque no tóxicas, es genotóxica para las células mostrando un capacidad genotóxica similar a la inducida por 2 Gy de rayos X.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado gracias a una beca del Programa Nacional Español I + D del del Ministerio español de Ciencia y Tecnología CENIT denominado SENIFOOD; D. Achel forma parte de trabajo gracias a una beca predoctoral (GHA10021) de la Agencia Internacional de la Energía Atómica (IAEA); y A. Olivares gracias a una ayuda de investigación de la Fundación Séneca (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, España).

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Michel F, Constantin JM. Sevoflurane inside and outside the operating room. *Expert Opin Pharmacother*. 2009; 10: 861–87.
2. Goa KL, Noble S, Spencer CM. Sevoflurane in paediatric anaesthesia: a review. *Paediatr Drugs*. 1999; 1: 127–53.
3. Karabiyik L, Sardas S, Polat U, Kocaba SNA, Karakaya AE. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied *in vivo* using the comet assay. *Mutat Res*. 2001; 492: 99–107.
4. Migita T, Mukaida L, Kobayashi M, Hamada H, Kawamoto M. The severity of sevoflurane-induced malignant hyperthermia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012; 56: 351–6.
5. Bienengraeter MW, Weihrauch D, Kersten JR, Papel PS, Wartier DC. Cardio protection by volatile anesthetics. *Vagcal Pharmacol*. 2005; 42: 243–52.
6. Brozovic G, Orsolich N, Rozgaj R, Kasuba V, Knezevic F, Knezevic AH, *et al*. DNA damage and repair after exposure to sevoflurane *in vivo*, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. *J Appl Genet*. 2010; 51: 79–86.
7. Wong CH, Liu TZ, Chye SM, Lu FJ, Liu YC, Lin ZC, *et al*. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorpho nuclear neutrophils. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44: 1399–407.
8. Alcaraz M, Acevedo C, Castillo J, Benavente-García O, Armero D, Vicente V, *et al*. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol*. 2009; 82: 605–9.
9. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernández H, *et al*. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011; 40: 310–4.
10. Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuño A, *et al*. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced *in vivo* by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agr Food Chem*. 2000; 48: 1738–45.
11. Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Lorente J, Alcaraz M, Dato MJ. Radioprotective effects against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays as a function of polymerization grade of grape seed extracts. *J Med Food*. 2001; 4: 117–23.
12. Del Baño MJ, Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Martín-Gil R, Acevedo C, *et al*. Radioprotective-antigenic effects of Rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 2064–8.
13. Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res*. 1985; 147: 29–36.
14. Castillo J, Alcaraz M, Benavente-García O, Preedy VR, Watson RR, editors. Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract. Olives and olive in health and disease prevention. Oxford: Academic Press; 2010. pp. 951–58.
15. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M. Radioprotective effects *in vivo* of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves against X-rays-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulphur-containing compounds. *J Med Food*. 2002; 5: 125–35.
16. Sánchez-Campillo M, Gabaldón JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, *et al*. Rosmarinic acid, a photoprotective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47: 386–92.
17. Serna A, Alcaraz M, Navarro JL, Acevedo C, Vicente V, Canteras M. Biological dosimetry and Bayesian analysis of chromosomal damage in thyroid cancer patients. *Radiat Prot Dosimetry*. 2007; 19: 1–9.
18. Alcaraz M, Gómez-Moraga A, Dato MJ, Navarro JL, Canteras M. Efecto genotóxico inducido por la exposición a rayos X durante exploraciones complejas de radiodiagnóstico médico. *Oncología*. 2002; 25: 159–68.
19. Navarro JL, Alcaraz M, Gómez-Moraga A, Vicente V, Canteras M. Absence of chromosomic and genotoxic damage from the radiation dose administered in scintigraphic examinations. *Rev Esp Med Nucl*. 2004; 23: 174–82.
20. Robbiano L, Mereto E, Moraudo AM, Pastor P, Brambilla G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats expressed to halogenates anesthetics. *Mutat Res*. 1998; 413: 1–6.
21. Luleci N, Sakarya M, Topçu I, Luleci E, Erinçler T, Solak M. Effects of sevoflurane on cell division and levels of sister chromatid exchange. *Anesthesiol intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2005; 40: 213–6.
22. Wiesner G, Hoerauf K, Salioegendofer K, Sodozyriski P, Hart M, Reudiger HW. High level but not low-level occupational exposure to inhaled anesthetics is associated with genotoxicity in the micronucleus assay. *Anesth Analg*. 2001; 92: 118–21.
23. Szyfter K, Szulc R, Mikstacki A, Stachecki I, Rydzanicz M, Jalszynski P. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane *in vitro* and *in vivo*. *J Appl Genet*. 2004; 45: 369–74.
24. Wiesner G, Schiewe-Langgartner F, Lindner R, Gruber M. Increased formation of sister chromatid exchanges, but not of micronuclei, in anaesthetists exposed to low levels of sevoflurane. *Anaesthesia*. 2008; 63: 861–4.
25. Vral A, Fenech M, Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure. *Mutagenesis*. 2011; 26: 11–7.