



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

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



ARTIGO CIENTÍFICO

Pré-condicionamento com dexmedetomidina protege contra lesões induzidas por lipopolissacarídeos em células epiteliais alveolares humanas



Lei Zhang^{a,b}, Xian-Jin Zhou^{b,c}, Li-Ying Zhan^{a,b}, Xiao-Jing Wu^{a,b}, Wen-Lan Li^{a,b}, Bo Zhao^{a,b}, Qing-Tao Meng^{a,b,*} e Zhong-Yuan Xia^{a,b,*}

^a Wuhan University, Renmin Hospital, Department of Anesthesiology, Wuhan, Hubei, China

^b Wuhan University, Renmin Hospital, Laboratory of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Wuhan, Hubei, China

^c Tongji University, First Maternity and Infant Hospital, Department of Anesthesiology, Shanghai, China

Recebido em 17 de março de 2016; aceito em 27 de fevereiro de 2017

Disponível na Internet em 18 de agosto de 2017

PALAVRAS-CHAVE

Dexmedetomidina;
Lipopolissacarídeos;
Pré-
condicionamento;
Lesão pulmonar
aguda;
Células epiteliais
alveolares

Resumo

Justificativa e objetivos: Dexmedetomidina (DEX) demonstrou ter efeito pré-condicionante e também efeitos protetores contra lesão organizada. Neste estudo, com células A549 (células epiteliais alveolares humanas), investigamos se o pré-condicionamento com DEX proporcionaria proteção contra lesão pulmonar aguda (LPA) *in vitro*.

Métodos: Células A549 foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos (n = 5): controle, DEX, lipopolissacarídeos (LPS) e D-LPS (DEX + LPS). Administramos solução de PBS (tampão fosfato-alcalino) ou DEX. Após 2 h de pré-condicionamento, o meio foi renovado e as células desafiadas com LPS por 24 h nos grupos LPS e D-LPS. Em seguida, malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), Bcl-2, Bax, caspase-3 e em A549 foram testados. Apoptose também foi avaliada nas células.

Resultados: Em comparação com o grupo LPS, o pré-condicionamento com DEX reduziu a apoptose ($26,43\% \pm 1,05\%$ vs. $33,58\% \pm 1,16\%$, $p < 0,05$) em células A549, o que está correlacionado com a diminuição de MDA ($12,84 \pm 1,05$ vs. $19,16 \pm 1,89$ nmol.mg⁻¹ de proteína, $p < 0,05$) e aumento da atividade de SOD ($30,28 \pm 2,38$ vs. $20,86 \pm 2,19$ U.mg⁻¹ de proteína, $p < 0,05$). O pré-condicionamento com DEX também aumentou o nível de Bcl-2 ($0,53 \pm 0,03$ vs. $0,32 \pm 0,04$, $p < 0,05$) e diminuiu o nível de Bax ($0,49 \pm 0,04$ vs. $0,65 \pm 0,04$, $p < 0,05$), caspase-3 ($0,54 \pm 0,04$ vs. $0,76 \pm 0,04$, $p < 0,05$) e citocromo c.

Conclusão: O pré-condicionamento com DEX tem efeito protetor contra LPA *in vitro*. Os potenciais mecanismos envolvidos são inibição da morte celular e melhoria da antioxidação.

© 2017 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mail: 674612814@qq.com (Z.Y. Xia).

KEYWORDS

Dexmedetomidine;
Lipopolysaccharides;
Preconditioning;
Acute lung injury;
Alveolar epithelial
cell

Dexmedetomidine preconditioning protects against lipopolysaccharides-induced injury in the human alveolar epithelial cells

Abstract

Background and objectives: Dexmedetomidine (DEX) has demonstrated the preconditioning effect and shown protective effects against organ injury. In this study, using A549 (human alveolar epithelial cell) cell lines, we investigated whether DEX preconditioning protected against acute lung injury (ALI) in vitro.

Methods: A549 were randomly divided into four groups ($n=5$): control group, DEX group, lipopolysaccharides (LPS) group, and D-LPS (DEX + LPS) group. Phosphate buffer saline (PBS) or DEX were administered. After 2 h preconditioning, the medium was refreshed and the cells were challenged with LPS for 24 h on the LPS and D-LPS group. Then the malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), Bcl-2, Bax, caspase-3 and the cytochrome c in the A549 were tested. The apoptosis was also evaluated in the cells.

Results: Compare with LPS group, DEX preconditioning reduced the apoptosis ($26.43\% \pm 1.05\%$ vs. $33.58\% \pm 1.16\%$, $p < 0.05$) in the A549, which is correlated with decreased MDA (12.84 ± 1.05 vs. 19.16 ± 1.89 nmol.mg⁻¹ protein, $p < 0.05$) and increased SOD activity (30.28 ± 2.38 vs. 20.86 ± 2.19 U.mg⁻¹ protein, $p < 0.05$). DEX preconditioning also increased the Bcl-2 level (0.53 ± 0.03 vs. 0.32 ± 0.04 , $p < 0.05$) and decreased the level of Bax (0.49 ± 0.04 vs. 0.65 ± 0.04 , $p < 0.05$), caspase-3 (0.54 ± 0.04 vs. 0.76 ± 0.04 , $p < 0.05$) and cytochrome c.

Conclusion: DEX preconditioning has a protective effect against ALI in vitro. The potential mechanisms involved are the inhibition of cell death and improvement of antioxidation.

© 2017 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A lesão pulmonar aguda (LPA) e sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA), são uma condição relativamente comum em pacientes críticos, associada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade e caracterizada por edema pulmonar com alto teor de proteína e insuficiência respiratória hipoxêmica grave que podem ser o resultado de muitos insultos clínicos, inclusive sepse e pneumonia.¹⁻³ Embora haja uma intensa pesquisa e uma melhor compreensão da fisiopatologia de LPA/SARA, não há tratamentos farmacológicos específicos que comprovem seus benefícios. Portanto, as taxas de morbidade e mortalidade permanecem significativas em 35%–40%.³⁻⁵

Há relatos de que o pré-condicionamento oferece proteção efetiva contra LPA por meio de estímulo prévio.^{6,7} Atualmente, o pré-condicionamento tem sido amplamente estudado na prática clínica por seu potencial de oferecer uma oportunidade única de exercer efeitos protetores. Hoje sabemos que a proteção pode ser provocada de forma mais segura por muitos fármacos, como dexmedetomidina (DEX).^{8,9}

O uso de DEX como sedativo é comum em contextos clínicos. Recentemente, pesquisadores descobriram que DEX tem potencial para imitar o efeito do pré-condicionamento e mostrou efeitos protetores contra lesões organizadas causadas por lipopolissacarídeos (LPS).^{10,11} Essa evidência indica que DEX pode ter efeito protetor contra LPA. Neste estudo, usamos o modelo de lesão A549 induzida por LPS para simular LPA *in vitro*, investigamos se o pré-condicionamento com

DEX produziria proteção contra LPA. Também investigamos os efeitos do pré-condicionamento com DEX na morte celular e na função da antioxidação para obter uma melhor percepção do(s) mecanismo(s).

Material e métodos**Cultura celular e tratamentos**

Células humanas de linhagem epitelial alveolar (A549) foram obtidas do *China Center for Type Culture Collection* (CCTCC, Wuhan University, Wuhan, China). As células A549 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com soro bovino fetal (10%), glutamina (2 mmol.L), penicilina (100 U.mL⁻¹) e estreptomicina (100 mg.mL⁻¹) e mantidas em ambiente úmido a 37 °C e CO₂ a 5%.

As A549 na fase logarítmica de crescimento foram semeadas em uma placa de 96 poços (2×10^3). Após a cultura durante a noite, essas células foram randomicamente separadas em quatro grupos de tratamento diferentes: os grupos DEX (Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd., Jiangsu, China) e D-LPS receberam DEX (10 µg.mL⁻¹) e os grupos controle e LPS (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) receberam o mesmo volume de solução tampão-fosfato salina (PBS). Após duas horas de exposição ao agente farmacológico, cada placa de poços foi lavada e as células foram desafiadas com LPS (50 µg.mL⁻¹) por 24 horas nos grupos LPS e D-LPS. Em seguida, as células foram coletadas para análise posterior.

Mensuração da formação de malondialdeído (MDA) e da atividade de superóxido dismutase (SOD)

O nível de formação de MDA e a atividade de SOD foram determinados como marcadores de estresse oxidativo com kits comercialmente disponíveis (Jiancheng Biologic Project Co., Nanjing, China). A concentração de proteína foi determinada com o kit de análise de proteína BCA (BestBio Co., Shanghai, China), de acordo com o protocolo do fabricante.

Western blotting

As células foram homogeneizadas e a concentração de proteína do sobrenadante foi determinada com o método BCA. O sobrenadante com 50 µg de proteína foi separado por SDS-PAGE e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Os anticorpos primários incluíram caspase-3, Bcl-2, Bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e β-actina (Abcam, Cambridge, MA, EUA). A membrana foi então incubada com um anticorpo secundário antiovelho conjugado com HRP (1:20.000; Pierce) por uma hora e o "borramento" (*blotting*) foi desenvolvido com um kit de detecção de quimioluminescência SuperSignal (Pierce). O *immunoblotting* foi visualizado com um processador de raios x Kodak 102 (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA) e analisado com o programa Quantity One-4.2.3 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Ensaio de liberação do citocromo-c

Conforme descrito anteriormente,¹² as células A549 foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, permeabilizadas com Triton x-100 a 0,1% por 10 minutos e bloqueadas com 3% de soro dissolvido em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram então sondadas com anticorpo anticitocromo-c (1:100; Santa Cruz Biotechnology) durante a noite a 4 °C. As células foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (1:200; Biovision, China) por duas horas no escuro a 37 °C. Após a lavagem, as imagens das células coradas foram obtidas com um microscópio de fluorescência.

Deteção de apoptose por citometria de fluxo

Com um kit de detecção de apoptose de anexina (Annexin v-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit – BioVision, MA, EUA), as células apoptóticas foram avaliadas via análise da citometria de fluxo (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).¹³ Os dados foram analisados com o programa CellQuest (BD Biosciences).

Análise estatística

Os dados de cinco experimentos independentes foram expressos em média ± EPM. Anova e o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) foram feitos para determinar a significância estatística. Diferenças significativas foram estabelecidas em $p < 0,05$.

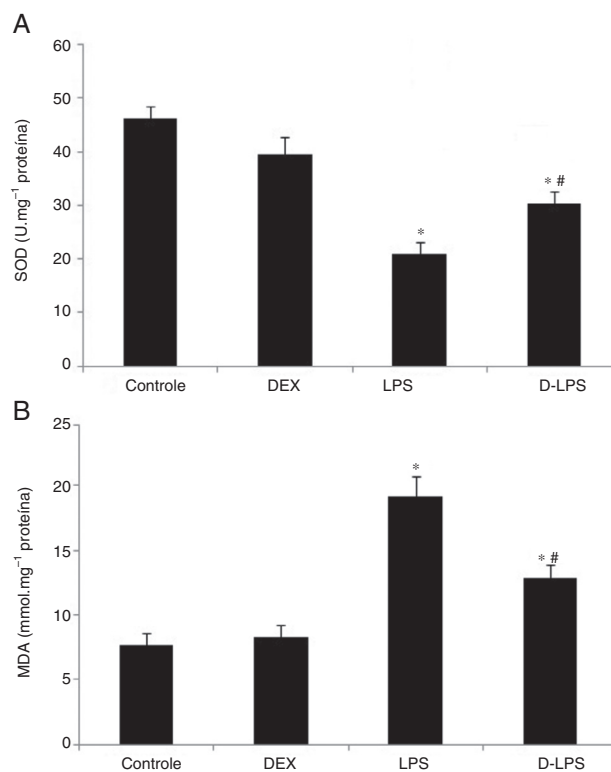


Figura 1 (A) Atividade de SOD em A549. (B) Níveis de MDA em A549. Controle, sem lesões; DEX, dexmedetomidina; LPS, lipopolissacarídeos; D-LPS, DEX+LPS. Valores expressos em média + EPM, $n = 5$ para cada grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo controle e # $p < 0,05$ vs. grupo LPS.

Resultados

Efeitos de DEX sobre o estresse oxidativo em A549

Em comparação com o grupo controle, os LPS diminuíram a atividade de SOD em A549 ($46,34 \pm 2,24$ U.mg⁻¹ de proteína vs. $20,86 \pm 2,19$ U.mg⁻¹ de proteína, $p < 0,05$) (fig. 1A) e aumentaram a formação de MDA ($7,68 \pm 0,92$ nmol.mg⁻¹ de proteína vs. $19,16 \pm 1,8$ nmol.mg⁻¹ de proteína, $p < 0,05$) (fig. 1B). Esse efeito foi significativamente atenuado pelo pré-condicionamento com DEX ($30,28 \pm 2,38$ U.mg⁻¹ de proteína e $12,84 \pm 1,05$ nmol.mg⁻¹ de proteína, $p < 0,05$ vs. grupo LPS).

Efeitos de DEX sobre a expressão de Bcl-2, Bax e caspase-3

Em comparação com o grupo controle, os LPS diminuíram o nível de Bcl-2 ($0,79 \pm 0,03$ vs. $0,32 \pm 0,04$, $p < 0,05$) e aumentaram a expressão de Bax ($0,29 \pm 0,03$ vs. $0,65 \pm 0,04$, $p < 0,05$) em A549 (fig. 2A e 2B). Esse efeito foi significativamente atenuado pelo pré-condicionamento com DEX ($0,53 \pm 0,03$ e $0,49 \pm 0,04$, $p < 0,05$ vs. grupo LPS). Em comparação com o grupo controle, os LPS aumentaram a expressão da caspase-3 ($0,36 \pm 0,03$ vs. $0,76 \pm 0,04$, $p < 0,05$) em A549 (fig. 2C e 2D). Esse efeito foi

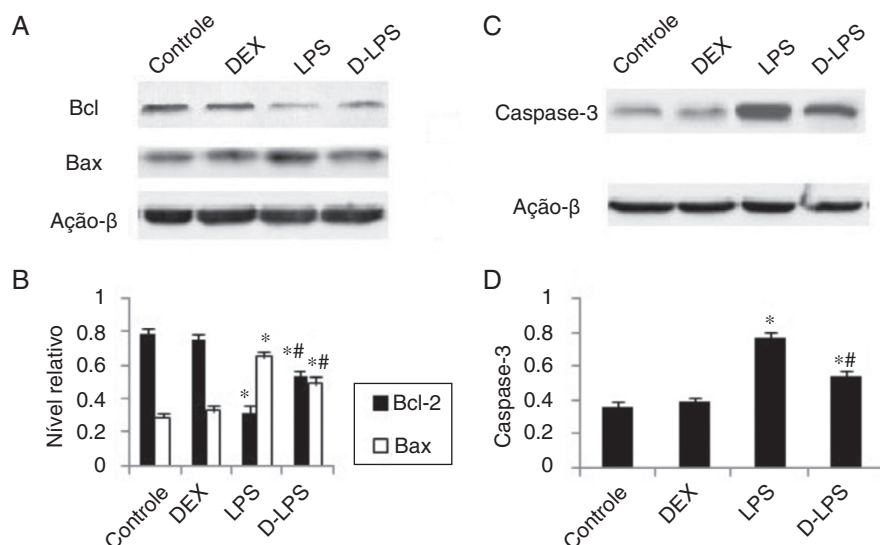


Figura 2 (A) Imagem representativa de Bcl-2 e Bax. (B) Níveis de Bcl-2 e Bax. (C) Imagem representativa de caspase-3. (D) Nível de caspase-3. Controle, sem lesões; DEX, dexmedetomidina; LPS, lipopolissacarídeos; D-LPS, DEX + LPS. Valores expressos em média + EPM, $n = 5$ para cada grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo controle e # $p < 0,05$ vs. grupo LPS.

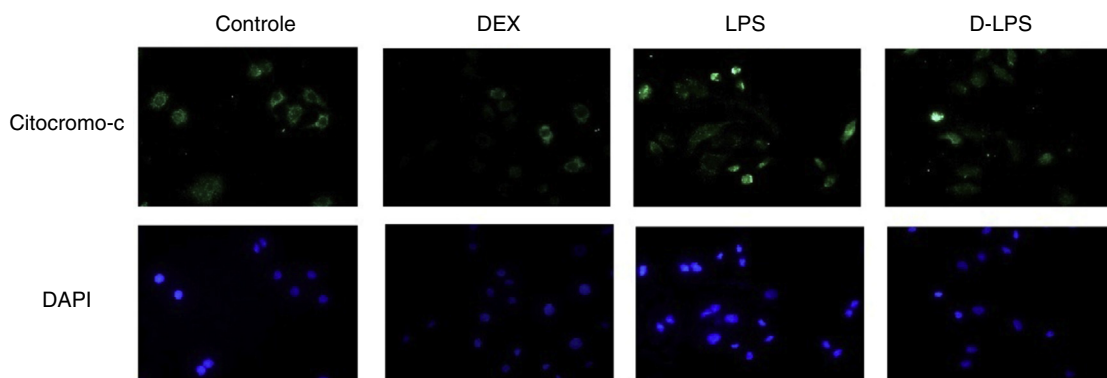


Figura 3 Seções representativas do citocromo-c. Controle, sem lesões; DEX, dexmedetomidina; LPS, lipopolissacarídeos; D-LPS, DEX + LPS. A fluorescência verde mostra o citocromo-c e a fluorescência azul (DAPI) mostra o DNA. Ampliação original 400 \times .

significativamente atenuado pelo pré-condicionamento com DEX ($0,54 \pm 0,04$, $p < 0,05$ vs. grupo LPS).

Efeitos de DEX sobre a liberação de citocromo-c

O citocromo-c do espaço intermembranar mitocondrial no citoplasma é um passo crítico na progressão da via apoptótica intrínseca. No grupo controle, o citocromo-c apresentou nível bem pouco detectável, enquanto LPS resultou em aumentos significativos. Esse efeito dos LPS foi atenuado pelo pré-condicionamento com DEX (fig. 3).

Efeitos de DEX sobre apoptose

Em comparação com o grupo controle, os LPS aumentaram a porcentagem de células apoptóticas em A549 ($1,57\% \pm 0,52\%$ vs. $33,58\% \pm 1,16\%$, $p < 0,05$) (fig. 4A e 4B). Esse efeito foi significativamente atenuado pelo pré-condicionamento com DEX ($26,43\% \pm 1,05\%$, $p < 0,05$ vs. grupo LPS).

Discussão

Este estudo demonstrou que o pré-condicionamento com DEX diminuiu significativamente a lesão induzida por LPS em A549. Os principais achados são os seguintes: (1) o pré-condicionamento com DEX reduziu a formação de MDA e aumentou a atividade de SOD em A549; (2) o pré-condicionamento com DEX aumentou a relação Bcl-2/Bax e diminuiu os níveis de caspase-3 e citocromo-c; (3) o pré-condicionamento com DEX atenuou a apoptose em A549. Esses dados fornecem a primeira evidência de que o pré-condicionamento com DEX atenua a lesão em células A549 causada por LPS.

Estudos relataram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na lesão induzida por LPS.^{14,15} Em linha com estudos anteriores, também observamos o estresse oxidativo induzido por LPS pelo aumento de MDA, mas uma redução de SOD em A549. MDA é o produto de degradação dos radicais livres derivados do oxigênio e da peroxidação lipídica. Portanto, o aumento de MDA implica

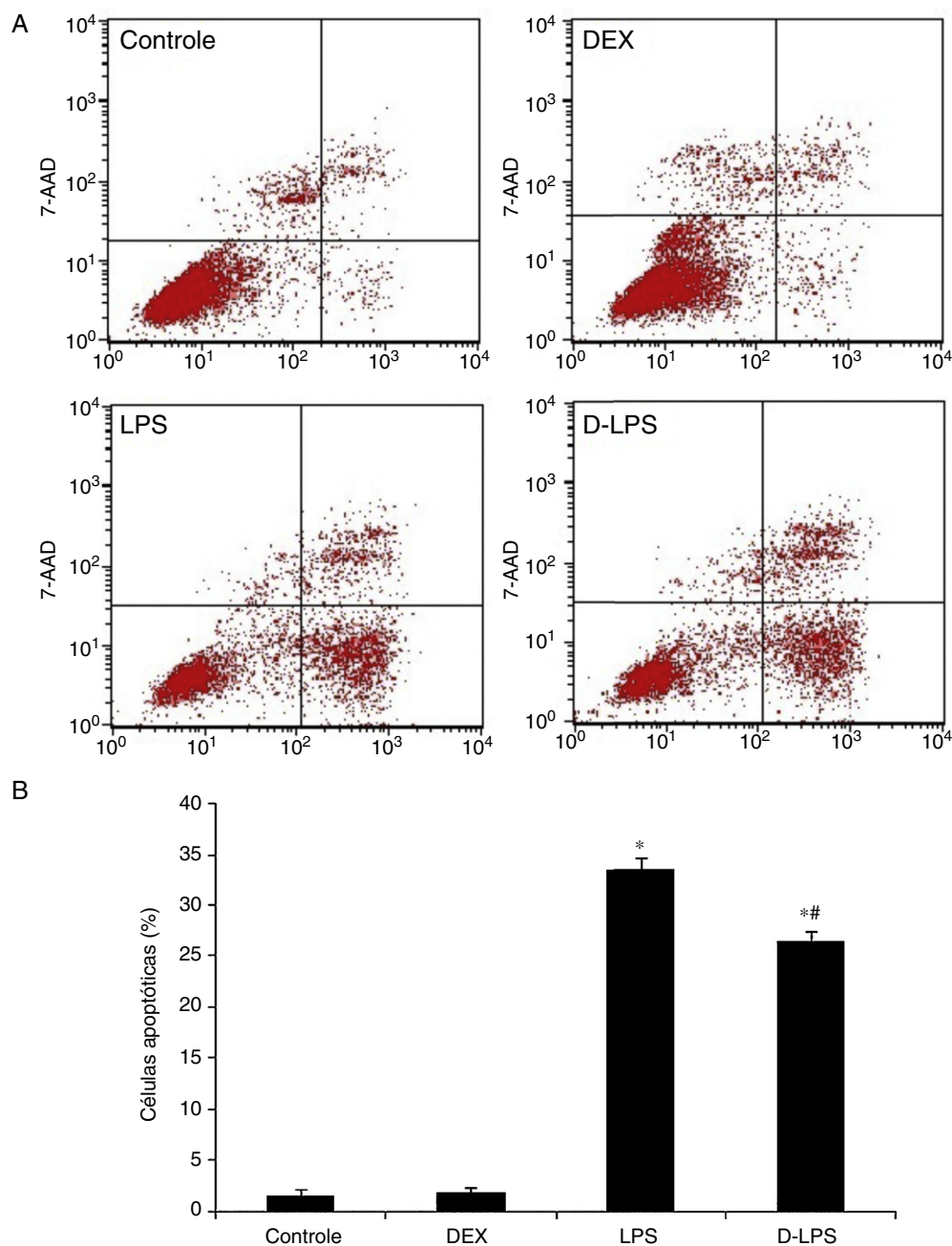


Figura 4 (A) Imagem representativa da citometria de fluxo. (B) O grau de apoptose celular. Controle, sem lesões; DEX, dexmedetomidina; LPS, lipopolissacarídeos; D-LPS, DEX + LPS. Valores expressos em média + EPM, $n = 5$ para cada grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo controle e # $p < 0,05$ vs. grupo LPS.

comprometimento da estrutura normal da membrana e lesão tecidual oxidativa.¹⁶ Em contraste, SOD é considerada uma importante enzima antioxidante intracelular com múltiplas funções biológicas. O aumento da enzima antioxidante SOD pode indicar a capacidade celular de eliminação e extinção de radicais livres.^{17,18} Estudos anteriores também relataram que DEX impediu as reações de peroxidação com o aumento de SOD, mas diminuiu o MDA nos tecidos.^{19,20} No experimento, nossos resultados demonstraram obviamente que o pré-condicionamento com DEX resultou em aumento da atividade de SOD e diminuição de MDA em A549. Essas descobertas sugerem que o pré-condicionamento com DEX

poderia exercer proteção contra o dano oxidativo induzido por LPS em A549 e modular assim a lesão e disfunção celular.

Várias evidências indicaram o envolvimento do estresse oxidativo nos mecanismos patológicos subjacentes da apoptose induzida por LPS em A549.^{21,22} Como sugerido em nossos resultados, também descobrimos que os LPS apresentaram uma proporção significativamente reduzida de Bcl-2/Bax associada ao aumento de MDA e à diminuição da atividade de SOD em A549. Tanto Bcl-2 quanto Bax pertencem à família Bcl-2. Porém, Bcl-2 pode ser considerado um componente celular importante que não apenas protege contra a morte celular apoptótica, mas também influencia múltiplos

eventos celulares. Em estudos recentes, descobriu-se que Bcl-2 fornece proteção contra lesões induzidas por LPS em alguns órgãos, inclusive A549.^{23,24} Em contraste, Bax exibe ações proapoptóticas. Quando há superexpressão de Bax, canais ou poros podem ser formados para permitir a liberação de fatores como o citocromo-c das mitocôndrias para propagar a apoptose.²⁵ Portanto, a relação das proteínas Bcl-2/Bax é provavelmente crítica para a sobrevivência celular após a lesão.²⁴ No presente estudo, os resultados indicaram que DEX aumentou a expressão de Bcl-2 e diminuiu a expressão de Bax e levou a um aumento da relação Bcl-2/Bax.

A liberação de citocromo-c e a ativação da caspase-3 são um ponto crucial na cascata apoptótica e podem ser reguladas pela relação Bcl-2/Bax.²⁶ Estudos anteriores mostraram que a geração excessiva de oxidação pode causar a liberação de citocromo-c e a ativação de caspase-3. O processo pode ser deprimido pela Bcl-2. O citocromo-c liberado e a caspase-3 ativada clivam a jusante os alvos celulares críticos envolvidos na condensação de cromatina, fragmentação do DNA e destruição do citoesqueleto, expressam assim as dramáticas alterações morfológicas da apoptose.²⁵⁻²⁷ Demonstrou-se que os LPS são uma das formas de induzir a liberação de citocromo-c e a ativação de caspase-3 em A549.²⁸ No presente estudo, os dados também mostram que a liberação de citocromo-c e a ativação de caspase-3 aumentaram significativamente após a administração de LPS em A549, em linha com os estudos anteriores. Além disso, observamos que a liberação de citocromo-c e a ativação de caspase-3 foram deprimidas pelo pré-condicionamento com DEX.

A apoptose é um processo fundamental da morte celular que ocorre por meio da ativação de vias de sinalização distintas e envolve uma regulação de forma decrescente da relação Bcl-2/Bax e liberação de citocromo-c e ativação de caspase-3 *in vitro*.^{28,29} Como resultado final, as células são destruídas e formam órgãos apoptóticos.³⁰ LPS mostrou iniciar essa cascata apoptótica em A549.²⁴ Com um modelo de LPA *in vitro*, nossos dados demonstram redução significativa da apoptose após o pré-condicionamento com DEX, o que correlacionou com a regulação de forma crescente da relação Bcl-2/Bax e depressão da ativação de caspase-3 e liberação de citocromo-c.

Contudo, nosso estudo descritivo tem algumas limitações óbvias que precisam ser abordadas, tais como um único momento de coleta de amostra, o breve período de observação e a falta de correlação com as mensurações clínicas de LPA. Além disso, apenas investigamos a concentração de DEX, que é muito grande para a prática clínica. Em comparação com a clínica, uma grande dose é geralmente usada em laboratório.^{31,32} Em experimentos, alguns estudos relataram até o uso de doses mais altas. Esses podem estar relacionados a diferentes espécimes.^{31,32} A relação entre a dose e o efeito permanece obscura. Portanto, estudos relacionados à relação dose-efeito precisam de uma exploração mais abrangente do modelo.

Sumário

Nossos dados mostram que o pré-condicionamento com DEX pode efetivamente atenuar a lesão induzida por LPS em

A549. Os efeitos protetores podem envolver uma redução do estresse oxidativo e da morte celular induzida por LPS. Esses resultados experimentais sugeriram DEX pode ser eficaz no tratamento de LPA induzido por LPS.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Yang B, Huang W, Han J, et al. Study of the role of epidermal growth factor on lung fluid transport in rabbits with acute lung injury caused by endotoxin. *Exp Ther Med*. 2012;4:611-4.
2. Vincent JL, Sakr Y, Ranieri VM. Epidemiology and outcome of acute respiratory failure in intensive care unit patients. *Crit Care Med*. 2003;31:S296-9.
3. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:147-63.
4. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *New Engl J Med*. 2000;342:1334-49.
5. Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*. 2007;131:554-62.
6. Pang YL, Chen BS, Li SP, et al. The preconditioning pulmonary protective effect of volatile isoflurane in acute lung injury is mediated by activation of endogenous iNOS. *J Anesth*. 2012;26:822-8.
7. Li QF, Zhu YS, Jiang H, et al. Isoflurane preconditioning ameliorates endotoxin-induced acute lung injury and mortality in rats. *Anesth Analg*. 2009;109:1591-7.
8. Fang B, Li XQ, Bi B, et al. Dexmedetomidine attenuates blood-spinal cord barrier disruption induced by spinal cord ischemia reperfusion injury in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:373-83.
9. Wang H, Chen H, Wang L, et al. Acute hyperglycemia prevents dexmedetomidine-induced preconditioning against renal ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2014;29:812-8.
10. Tan F, Chen Y, Yuan D, et al. Dexmedetomidine protects against acute kidney injury through downregulating inflammatory reactions in endotoxemia rats. *Biomed Rep*. 2015;3:365-70.
11. Bagcik E, Ozkardesler S, Boztas N, et al. Effects of dexmedetomidine in conjunction with remote ischemic preconditioning on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Rev Bras Anesthesiol*. 2014;64:382-90.
12. Wang L, Huang H, Fan Y, et al. Effects of downregulation of microRNA-181a on H₂O₂-induced H9c2 cell apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:960362.
13. Dong S, Qu X, Li W, et al. The long non-coding RNA, GAS5, enhances gefitinib-induced cell death in innate EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma cells with wide-type EGFR via downregulation of the IGF-1R expression. *J Hematol Oncol*. 2015;8:43.
14. Zhang XY, Cao JB, Zhang LM, et al. Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in mice. *J Neuroinflamm*. 2015;12:20.
15. Cui K, Kou JQ, Gu JH, et al. Naja naja atra venom ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting inflammatory response and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:461.
16. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366:53-67.
17. Xiao J, Rui Q, Guo Y, et al. Prolonged manganese exposure induces severe deficits in lifespan, development and reproduction possibly by altering oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans*. *J Environ Sci*. 2009;21:842-8.

18. Benov L, Batinic-Haberle I. A manganese porphyrin suppresses oxidative stress and extends the life span of streptozotocin-diabetic rats. *Free Radical Res.* 2005;39:81–8.
19. Shou-Shi W, Ting-Ting S, Ji-Shun N, et al. Preclinical efficacy of dexmedetomidine on spinal cord injury provoked oxidative renal damage. *Ren Fail.* 2015;37:1190–7.
20. Li S, Yang Y, Yu C, et al. Dexmedetomidine analgesia effects in patients undergoing dental implant surgery and its impact on postoperative inflammatory and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:186736.
21. Lin WC, Chen CW, Huang YW, et al. Kallistatin protects against sepsis-related acute lung injury via inhibiting inflammation and apoptosis. *Sci Rep.* 2015;5:12463.
22. Kim W, Youn H, Kang C, et al. Inflammation-induced radioreistance is mediated by ROS-dependent inactivation of protein phosphatase 1 in non-small cell lung cancer cells. *Apoptosis.* 2015;20:1242–52.
23. Wang Z, Wu Q, Nie X, et al. Infusion of esmolol attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. *J Surg Res.* 2016;200:283–9.
24. Zhao J, Li X, Zou M, et al. miR-135a inhibition protects A549 cells from LPS-induced apoptosis by targeting Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452:951–7.
25. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 1997;139:1281–92.
26. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998;82:1111–29.
27. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770–6.
28. Veena VK, Popavath RN, Kennedy K, et al. In vitro antiproliferative, pro-apoptotic, antimetastatic and anti-inflammatory potential of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) by *Pseudomonas aeruginosa* strain FP10. *Apoptosis.* 2015;20:1281–95.
29. Lee US, Ban JO, Yeon ET, et al. Growth inhibitory effect of (E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal diacetate through induction of apoptotic cell death by increasing DR3 expression in human lung cancer cells. *Biomol Ther (Seoul).* 2012;20:538–43.
30. van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res.* 2000;45:549–59.
31. Chen SL, Zhou W, Hua FZ, et al. In vitro effect of dexmedetomidine on the respiratory burst of neutrophils. *Genet Mol Res.* 2016:15.
32. Whittington RA, Virag L, Gratuze M, et al. Dexmedetomidine increases tau phosphorylation under normothermic conditions in vivo and in vitro. *Neurobiol Aging.* 2015;36:2414–28.