



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

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



ARTIGO CIENTÍFICO

O efeito do pré-condicionamento anestésico com sevoflurano sobre as vias de transdução de sinal intracelular e a apoptose, em modelo experimental de autotransplante pulmonar[☆]



Ignacio Garutti^{a,b,*}, Francisco Gonzalez-Moraga^b, Guillermo Sanchez-Pedrosa^a,
Javier Casanova^a, Beatriz Martin-Piñeiro^c, Lisa Rancan^d, Carlos Simón^{e,f} e Elena Vara^d

^a Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Departamento de Anestesiologia, Madrid, Espanha

^b Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Farmacología, Madrid, Espanha

^c Fundación Jiménez Díaz, Departamento de Anestesiologia, Madrid, Espanha

^d Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Madrid, Espanha

^e Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Departamento de Cirugía Torácica, Madrid, Espanha

^f Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Cirugía, Madrid, Espanha

Recebido em 24 de dezembro de 2017; aceito em 13 de julho de 2018

Disponível na Internet em 17 de novembro de 2018

PALAVRAS-CHAVE

Transplante pulmonar;
Sevoflurano;
Inflamação;
Apoptose

Resumo

Justificativa: O pré-condicionamento anestésico atenua a resposta inflamatória durante a lesão de isquemia-reperfusão do pulmão. Os mecanismos moleculares para explicá-lo não são totalmente compreendidos. O objetivo de nossa investigação foi analisar o mecanismo molecular que explica os efeitos anti-inflamatórios do pré-condicionamento anestésico com sevoflurano, enfatizar seus efeitos sobre as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), o fator nuclear kappa beta (NF-κB) e a apoptose em modelo experimental de autotransplante pulmonar.

Métodos: Vinte porcos Large White submetidos à pneumonectomia e autoimplante de pulmão foram divididos em dois grupos de 10 membros com base no anestésico recebido (propofol ou sevoflurano). O grupo de pré-condicionamento anestésico recebeu sevoflurano a 3% após a indução da anestesia, que foi descontinuado quando a ventilação monopulmonar foi iniciada. O grupo controle não recebeu sevoflurano em qualquer momento durante todo o período do estudo. As vias de transdução de sinal intracelular (família MAPK), o fator de transcrição (NF-κB) e a apoptose (caspases 3 e 9) foram analisados durante o experimento.

Resultados: Os suínos que receberam pré-condicionamento anestésico com sevoflurano apresentaram valores mais baixos de MAPK-p38, MAPK-P-p38, c-Jun N-terminal quinases (JNK), NF-κB p50 intranuclear e caspases ($p < 0,05$) do que os suínos anestesiados com propofol intravenoso.

[☆] O estudo foi realizado no laboratório experimental do Hospital Geral Universitario Gregorio Marañón e no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Espanha.

* Autor para correspondência.

E-mail: ngaruttimartinez@yahoo.es (I. Garutti).

<https://doi.org/10.1016/j.bjan.2018.07.002>

0034-7094/© 2018 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conclusões: A proteção pulmonar do pré-condicionamento anestésico com sevoflurano durante o autotransplante pulmonar experimental está, pelo menos, parcialmente associada à atenuação das vias de MAPKs e NF κ B e aos efeitos antiapoptóticos.

© 2018 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Lung transplantation;
Sevoflurane;
Inflammation;
Apoptosis

The effect of anesthetic preconditioning with sevoflurane on intracellular signal-transduction pathways and apoptosis, in a lung autotransplant experimental model

Abstract

Background: Anesthetic pre-conditioning attenuates inflammatory response during ischemia-reperfusion lung injury. The molecular mechanisms to explain it are not fully understood. The aim of our investigation was to analyze the molecular mechanism that explain the anti-inflammatory effects of anesthetic pre-conditioning with sevoflurane focusing on its effects on MAPKs (mitogen-activated protein kinases), NF- κ B (nuclear factor kappa beta) pathways, and apoptosis in an experimental lung autotransplant model.

Methods: Twenty large white pigs undergoing pneumonectomy plus lung autotransplant were divided into two 10-member groups on the basis of the anesthetic received (propofol or sevoflurane). Anesthetic pre-conditioning group received sevoflurane 3% after anesthesia induction and it stopped when one-lung ventilation get started. Control group did not receive sevoflurane in any moment during the whole study period. Intracellular signal-transduction pathways (MAPK family), transcription factor (NF- κ B), and apoptosis (caspases 3 and 9) were analyzed during experiment.

Results: Pigs that received anesthetic pre-conditioning with sevoflurane have shown significant lower values of MAPK-p38, MAPK-P-p38, JNK (c-Jun N-terminal kinases), NF- κ B p50 intranuclear, and caspases ($p < 0.05$) than pigs anesthetized with intravenous propofol.

Conclusions: Lung protection of anesthetic pre-conditioning with sevoflurane during experimental lung autotransplant is, at least, partially associated with MAPKs and NF κ B pathways attenuation, and antiapoptotic effects.

© 2018 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Anestesiologia. 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 de isquemia-reperusão (LIR) está presente em uma grande variedade de situações clínicas; porém, é mais facilmente reconhecível em transplantes de órgãos sólidos. No pulmão, há diferentes mecanismos envolvidos na lesão pulmonar induzida por isquemia-reperusão (LPIR), como transplante de pulmão, ventilação monopulmonar, cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea etc. A LPIR é caracterizada por dano alveolar não especificado com alterações de permeabilidade, edema e hipoxemia secundária.¹ Após o transplante de pulmão, a LPIR representa um obstáculo significativo para o desfecho ideal de um paciente por ser a principal causa de falência primária do enxerto, o que está correlacionado com um aumento do nível de morbimortalidade após o transplante. Nos últimos anos, muitos estudos examinaram diferentes protocolos de tratamento para mitigar a LIR. Demonstrou-se que os agentes anestésicos halogenados são potencialmente úteis para fornecer o pré-condicionamento do órgão contra a isquemia, o que é denominado pré-condicionamento anestésico (PCA). Vários

estudos demonstraram sua eficácia em vários órgãos, como fígado, rim, coração, medula espinhal, cérebro e pulmão.²⁻⁷

Os efeitos anti-inflamatórios do PCA na LPIR foram testados anteriormente pelo nosso grupo no mesmo modelo de autotransplante de pulmão.⁷ Porém, os mecanismos moleculares pelos quais o PCA com sevoflurano oferece proteção contra a LPIR ainda não foram completamente esclarecidos. Os sistemas de sinalização intracelular (vias de transdução de sinal) podem modificar reversivelmente a atividade de muitas proteínas inflamatórias. A família de proteínas quinases ativadas por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinases* – MAPKs) compreende as vias de transdução do sinal intracelular que demonstraram desempenhar um papel importante no desenvolvimento de LIR. Vários estudos mostraram que a isquemia-reperusão pode ativar as MAPKs, proteger as células do esgotamento de oxigênio e modular a apoptose.⁸⁻¹⁰ Demonstrou-se que a via da MAPK fornece efeitos protetores contra a hipóxia em cardiomiócitos e está envolvida na preservação da célula de qualquer processo de privação de oxigênio, o que leva à redução da apoptose celular.^{9,10} Os três principais subtipos de MAPKs

[ERK (quinase regulada por sinal extracelular), MAPK p-38 e c-Jun N-terminal quinase (JNK)] foram implicados em respostas inflamatórias. Logo, o fato de as MAPKs terem sido implicadas na sinalização celular de vários processos inflamatórios levou as MAPKs a se tornarem o foco da análise de um grande número de estudos nos últimos anos. Esses estudos alteraram a direção das atuais iniciativas de pesquisa que tradicionalmente examinam o papel das citocinas pró-inflamatórias na LIR. Além disso, as vias de sinalização celular controlam a expressão gênica ao modificar a atividade dos chamados "fatores de transcrição". O fator nuclear κ B (NF- κ B) é um fator de transcrição induzível essencial para regular a expressão de muitos genes envolvidos na resposta inflamatória e na apoptose secundária à LPIR. Em um modelo miocárdico de isquemia-reperfusão observou-se que os efeitos vantajosos do PCA com sevoflurano derivam da diminuição da ativação do NF- κ B durante a reperfusão.¹¹

Nossa hipótese foi que os efeitos anti-inflamatórios de sevoflurano fornecem proteção contra LPIR por meio de diferentes mecanismos moleculares, inclusive as vias que regulam os sistemas de sinalização intracelular (principalmente MAPKs, NF- κ B e apoptose). Para testar essa hipótese, usamos amostras de sangue de animais de um estudo anterior conduzido por nossa equipe de pesquisa.⁷ O objetivo do presente estudo foi analisar os mecanismos moleculares que explicam os efeitos protetores do PCA com sevoflurano em modelo experimental de autotransplante pulmonar.

Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa e Experimentação Animal da instituição. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as legislações europeia e espanhola para o manejo e tratamento de animais experimentais.

Modelo animal e grupos de estudo

Vinte porcos Large White, entre 30 e 50 kg, foram submetidos ao autotransplante ortotópico de pulmão esquerdo (inclusive pneumonectomia esquerda, lobectomia craniana *ex situ* e reimplante do lobo caudal à esquerda), seguido de 30 minutos de reperfusão do enxerto. Os animais foram randomizados em bloco por números aleatórios (Microsoft Excel 2003) para receber propofol via perfusão contínua como manutenção anestésica durante todo o procedimento (controle: Grupo CON, $n = 10$) ou pré-condicionamento anestésico com sevoflurano desde a indução anestésica até o início do estágio de ventilação monopolunar (VMP) seguido de perfusão de propofol (sevoflurano: Grupo SEVO, $n = 10$).

Anestesia

A ingestão de água *ad libitum* foi permitida aos grandes porcos brancos, mas alimentos sólidos foram retirados por 18 horas antes de cada experimento. A pré-medicação foi feita com 10 mg.kg⁻¹ de cetamina intramuscular (Ketolar, Parker Davis). Uma vez na sala de cirurgia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a monitoração foi feita com oximetria de pulso e eletrocardiográfica. Um cateter de

artéria femoral foi inserido para registro da pressão arterial média (PAM). Além disso, introduzimos um Swan-Ganz na veia femoral e registramos a pressão média da artéria pulmonar (PMAP). O monitor de débito cardíaco (Edwards Lifesciences) e a técnica de termodiluição foram usados para medir o índice cardíaco.

A indução anestésica foi feita com propofol (4 mg.kg⁻¹; Diprivan, Fresenius K), fentanil (3 μ g.kg⁻¹; Fentanest, Kern Pharma) e atracúrio (0,6 mg.kg⁻¹; Tracrium, Glaxo Smith Kline). A intubação orotraqueal foi feita com um tubo endotraqueal de 6-7 mm com manguito. A ventilação mecânica controlada por volume foi usada com pressão expiratória final positiva (PEEP) de 5 cm H₂O e pressão de pico < 30 cm H₂O durante toda a duração do estudo. Um volume corrente de até 8 mL.kg⁻¹, frequência respiratória de 12-15 rpm e razão inspiratória/expiratória de 1:2 foram escolhidos para manter a PaCO₂ na faixa de 35-40 mmHg. FiO₂ foi mantida em 1 ao longo do procedimento. A infusão de cristaloides no intraoperatório foi mantida em 5-6 mL.kg⁻¹.h⁻¹. A anestesia foi mantida com perfusão contínua de propofol (8-10 mg.kg⁻¹.h⁻¹) (Grupo CON) ou sevoflurano a 3% desde o início da indução anestésica até o início da VMP seguida de perfusão de propofol (8-10 mg.kg⁻¹.h⁻¹) (Grupo SEVO). Doses suplementares de fentanil e atracúrio foram usadas quando necessário.

Protocolo cirúrgico

As técnicas cirúrgicas incluíram procedimentos preliminares, toracotomia, pneumonectomia esquerda, lobectomia craniana em mesa auxiliar, reimplante do lobo caudal e reperfusão. Esse procedimento foi extensivamente descrito anteriormente como um modelo a ser feito em suínos para estudar os estágios iniciais da LPIR.

Os animais foram esfregados com solução de betadine e todos os procedimentos invasivos subsequentes foram feitos sob condições assépticas. Uma traqueostomia cirúrgica foi feita, o tubo orotraqueal foi removido e um tubo de 6 mm foi inserido na traqueia através da traqueostomia. Isso facilitou tanto inserir quanto retraindo o tubo do brônquio direito durante o procedimento. Um cateter de artéria pulmonar 7F (Edwards Lifesciences) foi introduzido pela veia femoral e sua posição final na artéria pulmonar direita foi confirmada no intraoperatório. Um cateter de artéria femoral 7F foi usado para permitir a monitoração da pressão arterial e a coleta de sangue. Uma cistostomia suprapúbica foi feita para monitorar a produção de urina.

Após esses procedimentos preliminares, o suíno foi posicionado em decúbito lateral direito e uma toracotomia esquerda foi feita mediante a ressecção da quarta ou quinta costela. Para fazer a pneumonectomia esquerda, a artéria pulmonar, veia cranial, veia caudal e brônquio principal esquerdo foram dissecados progressivamente. A ventilação dos dois pulmões foi mantida em todos os suínos por 90 min. Posteriormente, os vasos pulmonares foram dissecados, o brônquio principal esquerdo foi seccionado e o tubo endotraqueal foi colocado no brônquio direito. Logo após a conclusão da pneumonectomia, um *bolus* de heparina endovenosa (300 IU.kg⁻¹; MaynePharma Spain) foi administrado para evitar trombose na artéria pulmonar pinçada. Em seguida, na mesa auxiliar, o pulmão esquerdo foi perfundido

através da artéria e das veias pulmonares com a solução da Universidade de Wisconsin e uma lobectomia craniana foi feita. O lobo caudal esquerdo foi então reimplantado no suíno e uma anastomose brônquica foi feita, bem como uma anastomose das artérias pulmonares e uma anastomose da veia inferior com o átrio esquerdo. A reperfusão do enxerto foi feita, inicialmente em direção retrógrada pelo despinçamento do átrio esquerdo, e, em seguida, o tubo endobrônquico foi puxado de volta para a traqueia, permitindo a ventilação dos dois pulmões. A artéria pulmonar esquerda foi então liberada e o fluxo sanguíneo foi mantido por 30 min. No fim do experimento, o animal foi submetido à eutanásia mediante uma injeção de cloreto de potássio sob anestesia profunda.

Momentos de avaliação e amostragem

Amostras de sangue e biópsias pulmonares foram coletadas nos seguintes momentos: pré-pneumectomia (PPn) – antes de completar a pneumectomia e com o animal sob VMP; pré-reperfusão (PRp) – antes da reperfusão e ventilação do lobo caudal esquerdo reimplantado; 10 min pós-reperfusão (Rp + 10') – 10 min após a reperfusão do lobo reimplantado; 30 min pós-reperfusão (Rp + 30') – 30 min após a reperfusão do lobo reimplantado.

Estudos bioquímicos em tecido pulmonar

Biópsias de tecido pulmonar foram feitas para estudos bioquímicos e quantificação de edema pulmonar. As duas primeiras amostras de tecido pulmonar (PPn e PRp) foram coletadas do lobo cranial (a amostra PRp foi retirada do lobo cranial, que permaneceu sobre a mesa auxiliar imediatamente antes da reperfusão do lobo caudal reimplantado) e as duas últimas (Rp + 10' e Rp + 30') foram coletadas do lobo caudal reimplantado. Cada amostra de tecido pulmonar foi dividida em duas partes: uma parte foi mantida congelada em tubos de polipropileno a -40°C até a quantificação do edema pulmonar; a outra parte foi colocada em um criotubo, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até a análise bioquímica.

Preparação de homogenatos dos tecidos

O tecido pulmonar foi rapidamente dissecado e congelado em gelo seco. As amostras congeladas foram pesadas e transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) com tampão de lise (4°C) a uma proporção de 10 mL de tampão; 1 g^{-1} de tampão de lise de tecido húmido consistiu em 1 mM de fluoreto de fenilmetil-sulfonil (PMSF; Sigma Chemical Company) e $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepstatina A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company) e leupeptina (Sigma Chemical Company) em solução salina tamponada com $1\times$ fosfato (pH 7,2) (Biofluids, Rockville, MD) com azida de sódio a 0,05% (Sigma Chemical Company). As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos com um homogeneizador elétrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminister, NY) na velocidade máxima e os tubos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas

três vezes para obter um processamento ótimo. Os homogenatos foram posteriormente descongelados em banho-maria a 37°C e centrifugados a 119.000 g (1 h a 4°C) para separar as organelas celulares. Os sobrenadantes foram congelados a -80°C para permitir a formação de agregados macromoleculares. Após o descongelamento a 4°C , os agregados foram sedimentados a 3.000 g (4°C) e o volume final do homogenato foi medido com uma pipeta graduada.

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) p-38, JNK e ERK

Os níveis foram determinados em tecido pulmonar com kits comerciais específicos de teste Elisa (Oncogene Science, Cambridge, MA).

Avaliação do estresse oxidativo

Hidroperóxidos lipídicos (LPO) refletiram o grau de oxidação lipídica da membrana e foram determinados com um kit específico para aplicação em tecido pulmonar (K-assay LPO-CC, Kamiya Biochemical Company, EUA).

Mediadores inflamatórios medidos por análise de western blot em tecido pulmonar

Hemoxigenase-1 (HO-1) e hemoxigenase-2 (HO-2), NF- κ B nuclear e citoplasmática e I κ B. Os resultados foram determinados por *western blot* com o uso de anticorpos específicos para anti-hemoxigenase I e anti-hemoxigenase II, anti-NF- κ B p-50, anti-NF- κ B p-52 e anti-NF- κ B p-65 (Chemicon International, Inc.). Após a lavagem das membranas, as proteínas foram visualizadas por quimiluminescência (sistema ECL, Amersham, Oakville, Ontário) e essas medidas foram registradas em unidades arbitrárias.

Caspases

Os níveis das caspases 3 e 9 foram determinados em tecido pulmonar através de um teste Elisa com o uso de kits comerciais específicos (respectivamente, Sigma, St Louis Missouri e Bionova, Espanha).

Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média e erro-padrão da média. Testes não paramétricos foram usados para todas as análises. O teste U de Mann-Whitney foi aplicado para estabelecer as diferenças entre os grupos analisados. Além disso, o teste de dados pareados de Wilcoxon foi usado para estudar a evolução dos valores intragrupo. Para comparar a atividade das caspases 3 e 9, o teste de Wilcoxon foi substituído pelo teste de Kruskal-Wallis. A significância estatística foi considerada em $p < 0,05$. O programa estatístico SPSS versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) foi usado durante todo o processo.

Resultados

Os animais dos grupos CON e SEVO eram semelhantes quanto ao peso ($34,3 \pm 14$ vs. $37,8 \pm 13$, $p = 0,43$), duração da isquemia pulmonar (97 ± 14 vs. $92 \pm 22,5$ min, $p = 0,09$) e duração da VMP (167 ± 73 vs. 184 ± 86 min, $p = 0,1$). A [tabela 1](#)

Tabela 1 Valores hemodinâmicos, respiratórios e gasométricos

	Grupo	BAS	PPn	PRp	Rp 10min	Rp 30min
PAM (mmHg)	CON	99 (4)	101 (4)	90 (4)	86 (4)	81 (5)
	SEVO	76 (4) ^a	85 (6)	83 (4)	74 (4)	73 (5)
PMAP (mmHg)	CON	26 (3)	28 (3)	27 (2)	29 (3)	29 (2)
	SEVO	20 (1) ^a	24 (2)	24 (2)	27 (2)	26 (2)
FC (bpm)	CON	99 (6)	94 (8)	103 (9)	95 (7)	93 (8)
	SEVO	107 (7)	110 (5)	106 (7)	102 (6)	105 (8)
IC (L . min ⁻¹ . m ⁻²)	CON	5,2 (0,4)	5,2 (0,5)	4,4 (0,4)	48 (0,6)	5,5 (1,1)
	SEVO	6,6 (0,8)	7,8 (1)	5,6 (0,6)	6 (1)	5,9 (0,8)
PaO ₂ (mmHg)	CON	330 (55)	206 (37)	302 (48)	250 (48)	297 (49)
	SEVO	305 (37)	169 (23)	315 (42)	329 (44) ^a	333 (49)
PvpO ₂ (mmHg)	CON	-	-	-	278 (52)	262 (41)
	SEVO	-	-	-	418 (29) ^a	391 (44) ^a
PaCO ₂ (mmHg)	CON	37 (2)	44 (3)	42 (3)	44 (4)	44 (5)
	SEVO	33 (1)	49 (11)	40 (2)	42 (2)	40 (2)
PvpCO ₂ (mmHg)	CON	-	-	-	36 (4)	36 (5)
	SEVO	-	-	-	33 (3)	32 (5)
PPAW (cmH ₂ O)	CON	20 (2)	26 (2)	25 (2)	22 (2)	21 (1)
	SEVO	19 (2)	27 (2)	26 (2)	22 (1)	22 (1)
PplatAW (cm H ₂ O)	CON	13 (1)	16 (1)	16 (1)	15 (1)	15 (1)
	SEVO	12 (1)	15 (1)	15 (1)	14 (1)	14 (1)

Dados expressos em média (erro-padrão da média).

PAM, pressão arterial média; PMAP, pressão média da artéria pulmonar; FC, frequência cardíaca; IC, índice cardíaco; PaO₂, pressão arterial de oxigênio; PvpO₂, pressão venosa pulmonar de oxigênio; PaCO₂, pressão arterial de dióxido de carbono; PvpCO₂, pressão venosa pulmonar de dióxido de carbono; PPAW, pressão de pico das vias aéreas; PplatAW, pressão de platô das vias aéreas; CON, grupo controle; SEVO, grupo sevoflurano; BAS, basal; PPn, pré-pneumectomia; PRp, pré-reperusão; Rp 10 min, 10 min pós-reperusão; Rp 30 min, 30 min pós-reperusão.

^a $p=0,05$ SEVO vs. CON group.

apresenta os dados hemodinâmicos, ventilatórios e gasométricos.

Comportamento das MAPKs

A pneumectomia induziu um aumento significativo da MAPK p-38 e de sua isoforma fosforilada (MAPK-P p-38) em ambos os grupos de animais, sem diferenças entre eles. Após a reperusão, níveis de MAPK p-38 e MAPK-P p-38 diminuíram em ambos os grupos, mas os valores obtidos para Rp + 30' foram significativamente menores ($p < 0,05$) no Grupo SEVO em comparação com o Grupo CON. Os valores de JNK-P foram significativamente menores no Grupo CON em todas as mensurações, exceto em PPn ($p < 0,05$). O Grupo SEVO mostrou níveis significativamente menores de ERK-P nas duas amostras colhidas antes da reperusão ($p < 0,05$), mas a reperusão induziu um aumento dessa proteína nos dois grupos analisados e, após a reperusão, os valores foram semelhantes entre os dois grupos (fig. 1) (tabela 2).

Comportamento do NF- κ B

A isquemia causou um aumento dos níveis de NF- κ B p-50 nuclear e citoplasmático e nuclear de p-65 nos dois grupos. Após a reperusão, um aumento de NF- κ B p-50 e p-65 nucleares foi observado nos dois grupos, enquanto houve aumento de NF- κ B p-52 apenas no Grupo CON. Após a reperusão, os níveis de IKB e de NF- κ B p-50 citoplasmático diminuíram e os níveis de NF- κ B p-65 nuclear aumentaram apenas no Grupo

CON. Na comparação dos dois grupos, descobrimos que os valores de NF- κ B p-50 foram significativamente menores no Grupo CON do que no Grupo SEVO (fig. 2) (tabela 3).

Comportamento das caspases

Os valores da caspase-3 obtidos no Grupo SEVO foram significativamente menores do que os obtidos no Grupo COM ($p < 0,05$) apenas antes da reperusão, enquanto os valores da caspase-9 foram significativamente menores no Grupo SEVO do que no Grupo CON ($p < 0,05$) antes e depois da reperusão (fig. 2).

Lesão pulmonar induzida por isquemia-reperusão (LPIR), estresse oxidativo e inflamação

Após a pneumectomia, antes e após a reperusão, os níveis de LPO aumentaram, foram significativamente maiores no Grupo CON em comparação com o Grupo SEVO ($p < 0,05$) (fig. 3). Diferença estatisticamente significativa não foi observada entre os grupos na análise dos níveis de HO-1 e HO-2.

Discussão

Neste estudo, mostramos que os efeitos benéficos do PCA com sevoflurano estão correlacionados com a atenuação da atividade das vias de transdução de sinal intracelular que regulam a inflamação e a apoptose.

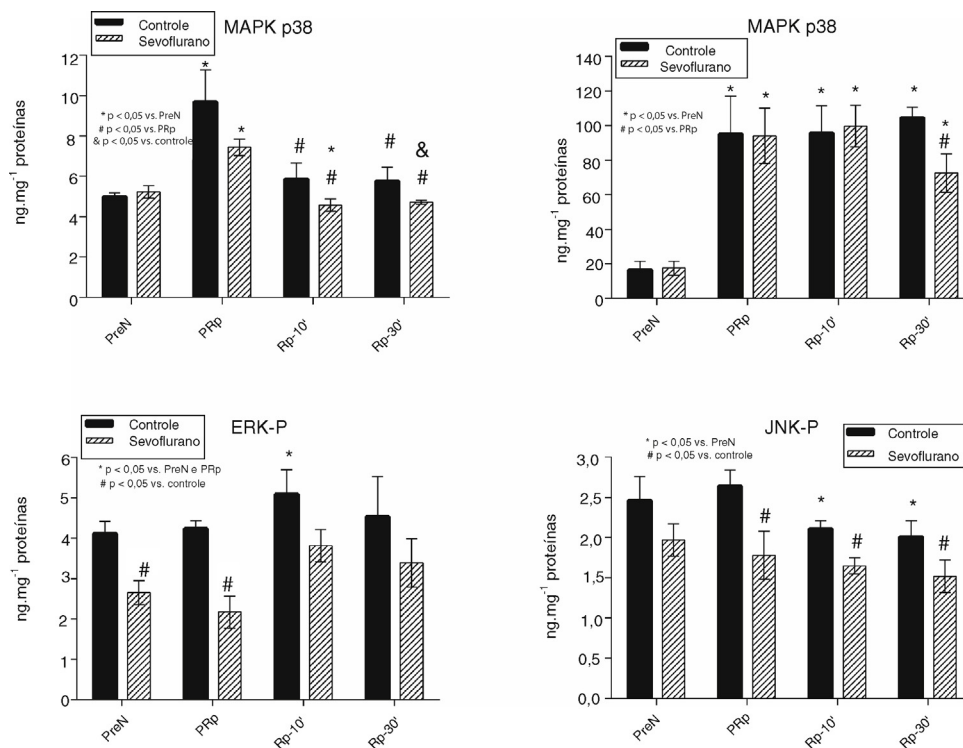


Figura 1 Valores da família MAPK durante o estudo. Os dados são expressos em média \pm erro-padrão da média. MAPK p-38, proteínas quinases ativadas por mitógenos p-38; JNK, c-Jun N-terminal quinase; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; -P, isoforma fosforilada; CON, grupo controle; SEVO, grupo sevoflurano; PreN, pré-pneumonectomia; PRp, pré-reperusão; Rp-10', 10 min pós-reperusão; Rp-30', 30 min pós-reperusão.

Tabela 2 Valores da família MAPK durante o estudo

	Grupo	PreN	PRp	Rp-10'	Rp-30'
MAPK p-38	CON	4,99 \pm 0,2	9,68 \pm 1,6 ^{b,c}	5,86 \pm 0,8 ^c	5,76 \pm 0,7 ^c
ng.mg ⁻¹ proteína	SEVO	5,23 \pm 0,3	7,44 \pm 0,4 ^b	4,58 \pm 0,3 ^{b,c}	4,72 \pm 0,1 ^{a,c}
MAPK-P p-38	CON	16,5 \pm 5	95,1 \pm 22 ^b	95,6 \pm 16 ^b	104,5 \pm 6 ^b
ng.mg ⁻¹ proteína	SEVO	17,5 \pm 4	94,1 \pm 16 ^b	99,7 \pm 12 ^b	72,6 \pm 11 ^{a,b}
JNK-P ng.mg ⁻¹	CON	2,46 \pm 0,3	2,64 \pm 0,2	2,11 \pm 0,1 ^c	2,01 \pm 0,2 ^c
proteína	SEVO	1,97 \pm 0,2	1,78 \pm 0,3 ^a	1,65 \pm 0,1 ^a	1,52 \pm 0,2 ^a
ERK-P ng.mg ⁻¹	CON	4,12 \pm 0,3	4,24 \pm 0,2	5,09 \pm 0,6	4,53 \pm 0,1
proteína	SEVO	2,65 \pm 0,3 ^a	2,17 \pm 0,4 ^a	3,82 \pm 0,4 ^{b,c}	3,39 \pm 0,6

Dados expressos em média \pm erro-padrão da média.

MAPK p-38, proteínas quinases ativadas por mitógenos p-38; JNK, c-Jun N-terminal quinase; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; -P, isoforma fosforilada; CON, grupo de controle; SEVO, grupo sevoflurano; PreN, pré-pneumonectomia; PRp, pré-reperusão; Rp-10', 10 min pós-reperusão; Rp-30', 30 min pós-reperusão.

^a $p < 0,05$ SEVO vs. CON.

^b $p < 0,05$ vs. PreN.

^c $p < 0,5$ vs. PRp.

Inflamação

Quando a LPIR ocorre, há um aumento dos parâmetros inflamatórios e dos marcadores de estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio e os mecanismos antioxidantes. Isso leva ao aumento de neutrófilos e macrófagos nos alvéolos, alterações na permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, edema alvéolo-intersticial e dano celular que afeta os pneumócitos

e aumenta a necrose e a apoptose.¹² O importante papel das vias MAPK e NF- κ B na regulação positiva de vários mediadores inflamatórios e sua relação com a apoptose durante os estados pró-inflamatórios são bem conhecidos.^{13,14} O desenvolvimento de LPIR está associado à ativação de cascatas de sinalização intracelular pró-inflamatórias nas células do parênquima pulmonar, que amplificam a resposta inflamatória. A ativação de MAPK durante a reperusão contribui para respostas inflamatórias agudas e apoptose de enxertos

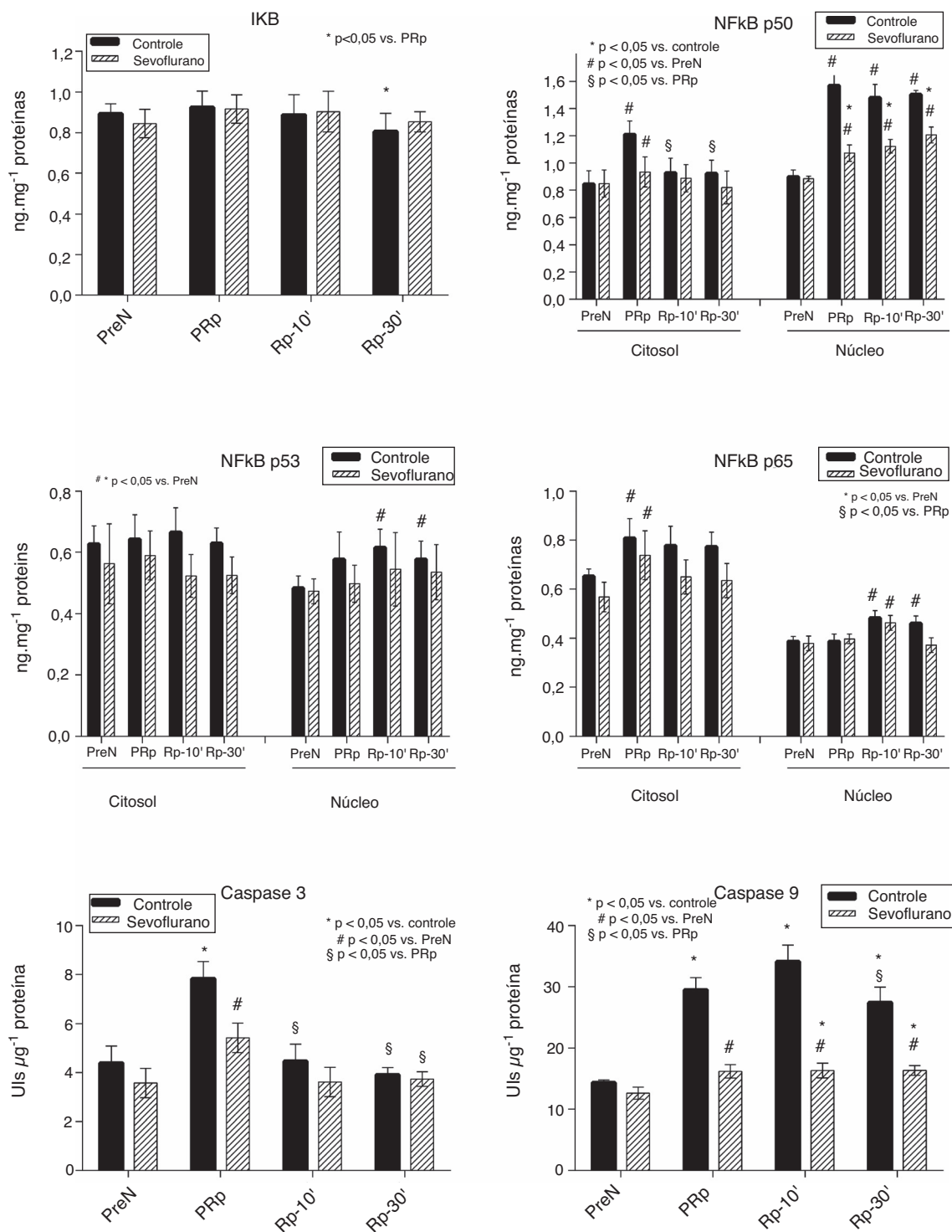


Figura 2 Valores de NF-κB (citossol e núcleo) e caspases. Os dados são expressos em média ± erro-padrão da média. NF-κB, fator nuclear κB; PreN, pré-pneumectomia; PRp, pré-reperusão; Rp-10; 10 min pós-reperusão; Rp-30; 30 min pós-reperusão.

pulmonares.¹⁵⁻¹⁷ Além disso, várias investigações demonstraram que a inibição farmacológica da MAPK p-38 ou JNK pode ser uma ferramenta útil para diminuir a LPIR no período inicial de reperusão do enxerto pulmonar¹⁸⁻²⁰ e resultados semelhantes são observados quando o pós-condicionamento isquêmico inativa a MAPK p-38.²¹ Vários autores demonstraram que o PCA inalatório atenua a ativação da MAPK

p-38 durante a isquemia-reperusão, considerada um mecanismo crítico para explicar os efeitos protetores do PCA.^{22,23} Porém, o papel do PCA com sevoflurano sobre a MAPK não foi investigado em transplante de pulmão. Em estudo recente que usou modelo *in vitro* de tecido pulmonar de rato, o sevoflurano diminuiu as alterações de permeabilidade induzidas por TNFα nas células endoteliais da microvasculatura

Tabela 3 Via do fator nuclear κ B

	Grupo	Média \pm EP			
		PreN	PRp	Rp-10'	Rp-30'
NF- κ B P50_Cit	CON	0,843 \pm 0,10	1,209 \pm 0,10 ^b	0,926 \pm 0,11 [‡]	0,921 \pm 0,10 [‡]
	SEVO	0,849 \pm 0,10	0,934 \pm 0,11 ^b	0,887 \pm 0,10	0,820 \pm 0,12
NF- κ B P50_NUC	CON	0,898 \pm 0,05	1,569 \pm 0,11 ^b	1,479 \pm 0,10 ^b	1,503 \pm 0,03 ^b
	SEVO	0,884 \pm 0,02	1,073 \pm 0,06 ^{a,b}	1,123 \pm 0,05 ^{a,b}	1,206 \pm 0,06 ^{a,b}
NF- κ B P52_CIT	CON	0,627 \pm 0,06	0,643 \pm 0,08	0,666 \pm 0,08	0,630 \pm 0,05
	SEVO	0,563 \pm 0,13	0,590 \pm 0,08	0,523 \pm 0,07	0,525 \pm 0,06
NF- κ B P52_NUC	CON	0,483 \pm 0,04	0,577 \pm 0,09	0,616 \pm 0,06 ^b	0,577 \pm 0,06 ^b
	SEVO	0,473 \pm 0,04	0,498 \pm 0,06	0,545 \pm 0,12	0,535 \pm 0,09
NF- κ B P65_CIT	CON	0,652 \pm 0,03	0,808 \pm 0,08 ^b	0,777 \pm 0,08	0,773 \pm 0,06
	SEVO	0,568 \pm 0,06	0,738 \pm 0,10 ^b	0,650 \pm 0,07	0,635 \pm 0,07
NF- κ B P65_NUC	CON	0,387 \pm 0,02	0,387 \pm 0,03	0,483 \pm 0,03 ^{b,c}	0,460 \pm 0,03 ^{b,c}
	SEVO	0,379 \pm 0,03	0,397 \pm 0,02	0,463 \pm 0,03 ^b	0,372 \pm 0,03
I κ B	CON	0,893 \pm 0,05	0,925 \pm 0,08	0,888 \pm 0,10	0,806 \pm 0,09 ^c
	SEVO	0,845 \pm 0,07	0,917 \pm 0,07	0,904 \pm 0,10	0,854 \pm 0,05

Dados expressos em média \pm erro-padrão da média.

NF- κ B, fator nuclear κ B; I κ B, inibidor de proteínas NF- κ B; CIT, citosol; NUC, nuclear; CON, grupo de controle; SEVO, grupo sevoflurano; PreN, pré-pneumectomia; PRp, pré-reperfusão; Rp-10', 10 min pós-reperfusão; Rp-30', 30 min pós-reperfusão.

^a $p < 0,05$ SEVO vs. CON.

^b $p < 0,05$ vs. PreN.

^c $p < 0,05$ vs. PRp.

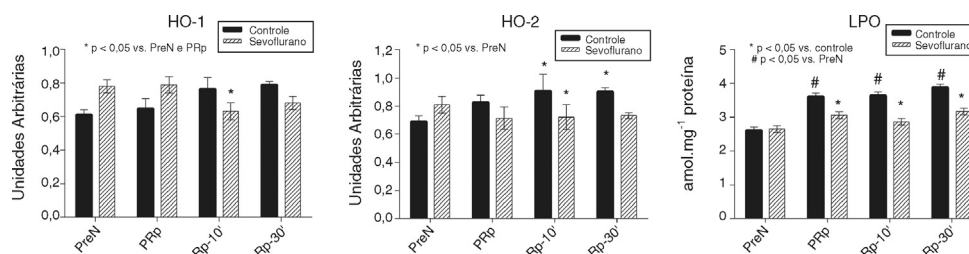


Figura 3 Biomarcadores do estresse oxidativo durante o estudo. Os dados são expressos em média \pm erro-padrão da média. LPO, hidroperóxidos lipídicos; HO, hemoxigenase; PreN, pré-pneumectomia; PRp, pré-reperfusão; Rp-10', 10 min pós-reperfusão; Rp-30', 30 min pós-reperfusão.

pulmonar e essa diminuição na permeabilidade foi correlacionada com uma diminuição dos níveis de MAPK-P p-38.²⁴ Em nosso estudo, observamos uma ativação reduzida da forma ativa de MAPK p-38 e JNK-P durante a reperfusão no Grupo SEVO, o que apoia a ideia de que o PCA com sevoflurano poderia inibir essa via pró-inflamatória no pulmão. Recentemente, em um modelo de transplante de pulmão de ratos, Ohsumi et al. mostraram achados semelhantes em um grupo pré-condicionado com sevoflurano, com menos resposta inflamatória e inibição significativa das células apoptóticas.²⁵

Atualmente, o mecanismo preciso pelo qual o sevoflurano fornece esses efeitos protetores tanto no coração quanto no cérebro é bem conhecido,²⁶ mas no pulmão esse mecanismo é menos conhecido. Além disso, há evidências científicas de que os efeitos protetores do PCA com sevoflurano estão relacionados à abertura (ativação) do canal K_{ATP} mitocondrial.^{27,28} MAPK p-38 e ERK desempenham um papel crucial na sinalização intracelular envolvida na abertura do canal K_{ATP} .^{29,30} Portanto, como os resultados de nosso estudo revelaram menor ativação de MAPK p-38 e ERK

no grupo sevoflurano, a nossa hipótese é que pelo menos uma grande parte dos efeitos protetores pulmonares do PCA com sevoflurano se deve à inibição da família MAPK durante a isquemia-reperfusão e à subsequente ativação desses canais K_{ATP} , semelhante aos mecanismos envolvidos no cérebro e coração.²⁶

Outro mecanismo para explicar a proteção pulmonar que a administração de sevoflurano forneceu antes da isquemia estaria relacionado com a atividade do NF- κ B. Quando o NF- κ B é ativado (inflamação ou isquemia), ele entra no núcleo e regula a expressão de citocinas inflamatórias, induz uma cascata de mediadores inflamatórios. Por essa razão, uma regulação decrescente dessa molécula é desejável. Relatou-se que a ativação da família MAPK, de MAPK p-38 em particular, apresenta numerosas interações diretas e indiretas, aumenta a expressão do NF- κ B.^{31,32} Observamos um aumento geral pós-perfusão das subunidades nucleares do NF- κ B, mesmo que esse aumento não seja sempre significativo. O PCA com sevoflurano foi capaz de moderar a ativação apenas nas subunidades nucleares do NF- κ B, o que sugere que seu efeito protetor também poderia atuar por

esse meio. Nossos resultados são consistentes com os publicados por Mikrou et al., observados nos pulmões de ratos em um modelo de lesão de isquemia-reperfusão hepática,³³ e mostraram a importância das vias de sinalização que envolvem subunidades do NF- κ B e MAPKs na regulação da resposta inflamatória secundária à LPIR e confirmam os efeitos anti-inflamatórios do PCA com sevoflurano.

Outra das consequências da LPIR é o aumento do estresse oxidativo, que perpetua e aumenta a resposta inflamatória.³⁴ Em nosso estudo, observamos uma atenuação do dano celular induzido pelo estresse oxidativo no grupo que recebeu sevoflurano, evidenciado por níveis mais baixos de LPO no Grupo SEVO. Isto é, houve menos danos das membranas celulares por espécies reativas ao oxigênio durante a reperfusão devido ao PCA com sevoflurano. Por outro lado, não observamos alterações significativas na expressão da HO-1, que está relacionada a efeitos antioxidativos, antiapoptóticos e anti-inflamatórios.³⁵ Portanto, de acordo com nossos resultados, parece que os efeitos protetores do PCA com sevoflurano não estão relacionados à expressão da HO-1. Contudo, outros autores constataram que o mecanismo protetor da LIR em um modelo de isquemia-reperfusão pulmonar em ratos deveu-se em parte à ação da HO-1.³⁶ Essas diferenças podem ser atribuídas em parte à metodologia dos estudos, uma vez que esses autores estabelecem um ambiente de acidose hipercápnica que não ocorre em nosso modelo. A acidose hipercápnica pode ser o gatilho para liberar a atividade da HO-1.

Apoptose

O papel da apoptose na patogênese da LIR é bem reconhecido. Acredita-se que a apoptose possa ser decisiva no desenvolvimento de lesões pulmonares que surgem como resultado da LPIR.^{37,38} Vários autores observaram que há uma porcentagem significativa de células pulmonares humanas transplantadas que sofrem apoptose nos estágios iniciais do pico de reperfusão do enxerto em 2 h.^{39,40} Isso significa que as medidas destinadas a reduzir a apoptose durante a LPIR devem ser iniciadas o mais rapidamente possível para que o PCA possa ter um resultado particularmente útil. Segundo nossas pesquisas, não há estudos que investigaram o efeito do PCA com sevoflurano na apoptose em LPIR. Encontramos um ligeiro aumento da apoptose durante a isquemia, que ficou bem mais evidente durante a reperfusão. O grupo que recebeu sevoflurano apresentou menor ativação da apoptose antes da reperfusão do enxerto, conforme avaliado pelos níveis reduzidos de caspase 3 e 9 no Grupo SEVO. Nossos achados são semelhantes aos observados por Wang et al. em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda em ratos induzida por endotoxina.⁴¹ Estudos com animais e humanos mostraram que a anestesia inalatória sem a presença de isquemia-reperfusão está relacionada a um aumento da atividade celular apoptótica.⁴² Além disso, há relato de um efeito pró-apoptótico de sevoflurano no pulmão de pacientes sob ventilação mecânica.⁴³ Por outro lado, sevoflurano apresentou efeitos antiapoptóticos no cérebro e no coração quando foi administrado no pré-condicionamento ou no pós-condicionamento.^{44,45} Esses resultados contrastantes

em relação ao efeito de sevoflurano podem ser explicados pela presença de diferentes concentrações dos fatores inflamatórios e anti-inflamatórios. Assim, quando a isquemia predomina (e a inflamação com ela), como no transplante de pulmão, os efeitos antiapoptóticos de sevoflurano podem ser mais evidentes. O mecanismo pelo qual sevoflurano exerce efeitos antiapoptóticos no pulmão durante a LPIR não é bem conhecido. Sugeriu-se que uma diminuição da resposta anti-inflamatória poderia estar ligada à sua capacidade de atenuar a resposta apoptótica na presença de isquemia-reperfusão. Vários estudos demonstraram que a ativação da MAPK p-38 ou de NF- κ B e caspase-3 poderia ser responsável por essas respostas pró-apoptóticas.^{41,46-48} Uma atenuação da expressão desses elementos relacionada ao PCA com sevoflurano pode explicar os efeitos antiapoptóticos observados em nossa investigação. Em conclusão, a proteção pulmonar do PCA com sevoflurano durante o autotransplante pulmonar experimental está associada, pelo menos parcialmente, à atenuação das vias das MAPKs e do NF- κ B e aos efeitos antiapoptóticos.

Financiamento

Esta pesquisa foi apoiada por subsídios PI070840 e PI070481 do governo espanhol (PI070840 e PI070481) e da 06/121 Sociedade Espanhola de Anestesiologia (Sedar).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. De Perrot M, Liu M, Waddell TK, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:490-511.
2. Imai M, Kon S, Inaba H. Effects of halothane, isoflurane and sevoflurane on ischemia-reperfusion injury in the perfused liver of fasted rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996;40:1242-8.
3. Kong HY, Zhu SM, Wang LQ, et al. Sevoflurane protects against acute kidney injury in a small-size liver transplantation model. *Am J Nephrol.* 2010;32:347-55.
4. Yao YT, Fang NX, Shi CX, et al. Sevoflurane postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *Chin Med J (Engl).* 2010;123:1320-8.
5. Ding Q, Wang Q, Deng J, et al. Sevoflurane preconditioning induces rapid ischemic tolerance against spinal cord ischemia/reperfusion through activation of extracellular signal-regulated kinase in rabbits. *Anesth Analg.* 2009;109:1263-72.
6. Codaccioni JL, Velly LJ, Moubarik C, et al. Sevoflurane preconditioning against focal cerebral ischemia: inhibition of apoptosis in the face of transient improvement of neurological outcome. *Anesthesiology.* 2009;110:1271-8.
7. Casanova J, Garutti I, Simón C, et al. Effects of anesthetic preconditioning with sevoflurane in an experimental lung autotransplant model in pigs. *Anesth Analg.* 2011;113:742-8.
8. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res.* 2000;86:117-8.
9. Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res.* 2002;91:776-81.

10. Lips DJ, Purcell NH, Kaiser RA, et al. MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*. 2004;109:1938–41.
11. Zhong C, Zhou Y, Liu H. Nuclear factor kappa B and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion. *Anesthesiology*. 2004;100:540–6.
12. den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, et al. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1283–99.
13. O'Neill LA. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:549–63.
14. Song L, Li D, Wang J, et al. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase on lung ischemia-reperfusion injury in diabetic rats. *J Surg Res*. 2017;216:9–17.
15. Sakiyama S, Hamilton J, Han B, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases during human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:2079–85.
16. Yamamoto S, Yamane M, Yoshida O, et al. Activations of mitogen-activated protein kinases and regulation of their downstream molecules after rat lung transplantation from donors after cardiac death. *Transplant Proc*. 2011;43:3628–33.
17. Ishii M, Suzuki Y, Takeshita K, et al. Inhibition of c-Jun NH₂-terminal kinase activity improves ischemia/reperfusion injury in rat lungs. *J Immunol*. 2004;172:2569–77.
18. Wolf PS, Merry HE, Farivar AS, et al. Stress-activated protein kinase inhibition to ameliorate lung ischemia reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135:656–65.
19. Hashimoto N, Takeyoshi I, Yoshinari D, et al. Effects of a p-38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to Euro Collins solution on reperfusion injury in canine lung transplantation. *Transplantation*. 2002;74:320–6.
20. Kawashima Y, Takeyoshi I, Otani Y, et al. FR167653 attenuates ischemia and reperfusion injury of the rat lung with suppressing p38 mitogenactivated protein kinase. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:568–74.
21. Chen HE, Ma YC, He JB, et al. Ischemic postconditioning attenuates pneumocyte apoptosis after lung ischemia/reperfusion injury via inactivation of p38 MAPK. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2014;30:251–6.
22. Yu J, Mizumoto K, Tokinaga Y, et al. The inhibitory effects of sevoflurane on angiotensin II-induced, p44/42 mitogen-activated protein kinase-mediated contraction of rat aortic smooth muscle. *Anesth Analg*. 2005;101:315–21.
23. Wang H, Lu S, Yu Q, et al. Sevoflurane preconditioning confers neuroprotection via anti-inflammatory effects. *Front Biosci*. 2011;3:604–15.
24. Sun SX, Ge BX, Miao CH. Effects of preconditioning with sevoflurane on TNF- α -induced permeability and activation of p38 MAPK in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Cell Biochem Biophys*. 2011;61:123–9.
25. Oshumi A, Marseu K, Slinger P, et al. Sevoflurane attenuates ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplantation model. *Ann Thorac Surg*. 2017;103:1578–86.
26. Chen S, Lotz C, Roewer N, et al. Comparison of volatile anesthetic-induced preconditioning in cardiac and cerebral system: molecular mechanisms and clinical aspects. *Eur J Med Res*. 2018;23:10.
27. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, et al. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K (ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology*. 2002;97:4–14.
28. Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR, et al. Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology*. 2004;100:707–21.
29. Xu Z, Ji X, Boysen PG. Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1433–40.
30. Grossini E, Molinari C, Caimmi PP, et al. Levosimendan induces NO production through p38 MAPK, ERK and Akt in porcine coronary endothelial cells: role of mitochondrial K_{ATP} channel. *Br J Pharmacol*. 2009;156:250–61.
31. Carter AB, Knudtson KL, Monick MM, et al. The p-38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression: the role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem*. 1999;274:30858–63.
32. Saccani S, Pantano S, Natoli G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol*. 2002;3:69–75.
33. Mikrou A, Kalimeris KA, Lilis I, et al. Molecular studies of the immunological effect of the sevoflurane preconditioning in the liver and lung in a rat model of liver ischemia/reperfusion injury. *Mol Immunol*. 2016;72:1–8.
34. Susnow N, Zeng L, Margineantu D, et al. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol*. 2009;19:42–9.
35. Öllinger R, Pratschke J. Role of heme oxygenase-1 in transplantation. *Transpl Int*. 2010;23:1071–81.
36. Wu SY, Li MH, Ko FC, et al. Protective effect of hypercapnic acidosis in ischemia-reperfusion lung injury is attributable to upregulation of heme oxygenase-1. *PLoS ONE*. 2013;10:1–13.
37. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69:1532–6.
38. Ng CS, Wan S, Yim AP. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. *Eur Respir J*. 2005;25:356–63.
39. Fischer S, Maclean AA, Liu M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1932–9.
40. Quadri SM, Segall L, De Perrot M, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transp*. 2005;5:292–9.
41. Wang L, Ye Y, Su HB, et al. The anesthetic agent sevoflurane attenuates pulmonary acute lung injury by modulating apoptotic pathways. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50:1–8.
42. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, et al. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience*. 2005;135:815–27.
43. Kalimeris K, Christodoulaki K, Karakitsos P, et al. Influence of propofol and volatile anaesthetics on the inflammatory response in the ventilated lung. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011;55:740–8.
44. Inamura Y, Miyamae M, Sugioka S, et al. Sevoflurane post-conditioning prevents activation of caspase 3 and 9 through antiapoptotic signaling after myocardial ischemia-reperfusion. *J Anesth*. 2010;24:215–24.
45. Istaphanous GK, Howard J, Nan X, et al. Comparison of the neuroapoptotic properties of equipotent anesthetic concentrations of desflurane, isoflurane, or sevoflurane in neonatal mice. *Anesthesiology*. 2011;114:578–87.
46. Lu X, Moore PG, Liu H, et al. Phosphorylation of ARC is a critical element in the antiapoptotic effect of anesthetic preconditioning. *Anesth Analg*. 2011;112:525–31.
47. Zhong C, Zhou Y, Liu H, et al. and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion. *Anesthesiology*. 2004;100:540–6.
48. Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of p-38 mitogen activated protein kinases. *Mol Pharmacol*. 2004;65:1172–80.