

Efeito Protetor do RNA Não Codificante Longo OXCT1-AS1 na Apoptose de Células Miocárdicas Humanas Induzida pela Doxorubicina pelo Padrão Competitivo de RNA Endógeno

Protective Effect of Long Noncoding RNA OXCT1-AS1 on Doxorubicin-Induced Apoptosis of Human Myocardial Cells by the Competitive Endogenous RNA Pattern

Zhen Chen,^{1*} Yijue Liu,^{1*} Rui Ma,^{2*} Mengli Zhang,¹ Xian Wu,¹ Huan Pen,¹ Feng Gui,¹ Yafeng Liu,³ Hao Xia⁴ 
Niandan Hu,³ Bo Ai,³ Jun Xiong,³ Hongxia Xia,³ Wenqiang Li,³ Fen Ai¹

Department of Emergency – The Central Hospital of Wuhan – Tongji Medical College – Huazhong University of Science and Technology,¹ Wuhan – China

Department of Geriatric Medicine – Sinopharm Dongfeng General Hospital – Hubei University of Medicine,² Shiyan – China

Department of Emergency – Renmin Hospital of Wuhan University,³ Wuhan – China

Department of Cardiology – Renmin Hospital of Wuhan University,⁴ Wuhan – China

* Os autores contribuíram igualmente para este trabalho

Resumo

Fundamento: O antibiótico quimioterápico antraciclina doxorubicina (DOX) pode induzir cardiotoxicidade cumulativa e levar à disfunção cardíaca. RNAs não codificantes longos (lncRNAs) podem funcionar como importantes reguladores na lesão miocárdica induzida por DOX.

Objetivo: Este estudo tem como objetivo investigar o papel funcional e o mecanismo molecular do RNA antisense lncRNA OXCT1 1 (OXCT1-AS1) na lesão celular miocárdica induzida por DOX in vitro.

Métodos: Cardiomiócitos humanos (AC16) foram estimulados com DOX para induzir um modelo de lesão celular miocárdica. A expressão de OXCT1-AS1, miR-874-3p e BDH1 em células AC16 foi determinada por RT-qPCR. A viabilidade das células AC16 foi medida pelo ensaio XTT. A citometria de fluxo foi empregada para avaliar a apoptose de células AC16. Western blotting foi utilizado para avaliar os níveis proteicos de marcadores relacionados à apoptose. O ensaio repórter de luciferase dupla foi conduzido para verificar a capacidade de ligação entre miR-874-3p e OXCT1-AS1 e entre miR-874-3p e BDH1. O valor de $p < 0,05$ indicou significância estatística.

Resultados: A expressão de OXCT1-AS1 foi diminuída em células AC16 tratadas com DOX. A superexpressão de OXCT1-AS1 reverteu a redução da viabilidade celular e a promoção da apoptose celular causada pela DOX. OXCT1-AS1 está ligado competitivamente ao miR-874-3p para regular positivamente o BDH1. A superexpressão de BDH1 restaurou a viabilidade das células AC16 e suprimiu a apoptose celular sob estimulação com DOX. A derrubada do BDH1 reverteu a atenuação da apoptose de células AC16 mediada por OXCT1-AS1 sob tratamento com DOX.

Conclusão: lncRNA OXCT1-AS1 protege células miocárdicas humanas AC16 da apoptose induzida por DOX através do eixo miR-874-3p/BDH1.

Palavras-chave: RNA; Doxorubicina; Miócitos Cardíacos; Apoptose.

Abstract

Background: The anthracycline chemotherapeutic antibiotic doxorubicin (DOX) can induce cumulative cardiotoxicity and lead to cardiac dysfunction. Long non-coding RNAs (lncRNAs) can function as important regulators in DOX-induced myocardial injury.

Objective: This study aims to investigate the functional role and molecular mechanism of lncRNA OXCT1 antisense RNA 1 (OXCT1-AS1) in DOX-induced myocardial cell injury in vitro.

Correspondência: Fen Ai e Yafeng Liu •

The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, No. 26 Shengli Street, Jiang'an District, Wuhan, Hubei – China (Fen Ai); Renmin Hospital of Wuhan University, No.238, Jiefang Road, No.99, Zhangzhidong Road (formerly Ziyang Road), Huanghelou Street, Wuchang District, Wuhan, Hubei – China (Yafeng Liu).

E-mail: doctoraifen@outlook.com, tflyf1@hotmail.com

Artigo recebido em 07/10/2023, revisado em 26/01/2024, aceito em 11/03/2024

Editor responsável pela revisão: Marina Okoshi

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20230675>

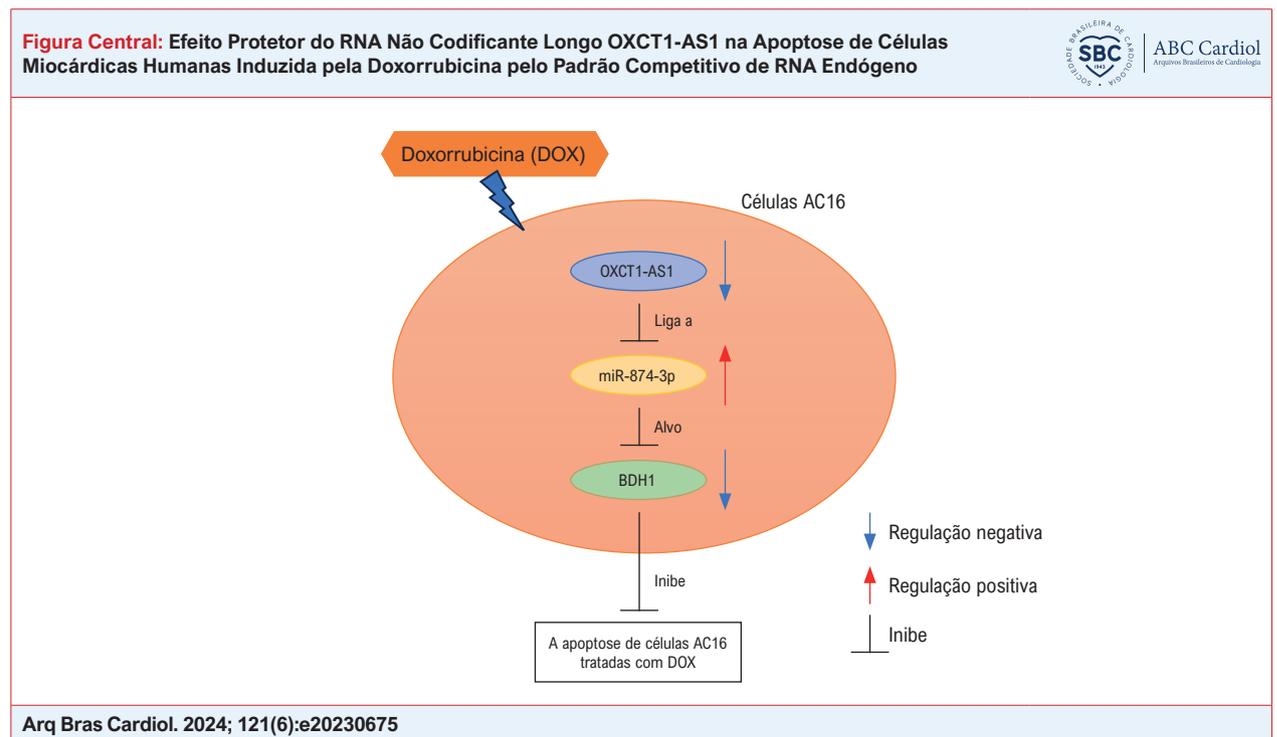
Methods: Human cardiomyocytes (AC16) were stimulated with DOX to induce a myocardial cell injury model. OXCT1-AS1, miR-874-3p, and BDH1 expression in AC16 cells were determined by RT-qPCR. AC16 cell viability was measured by XTT assay. Flow cytometry was employed to assess the apoptosis of AC16 cells. Western blotting was used to evaluate protein levels of apoptosis-related markers. Dual-luciferase reporter assay was conducted to verify the binding ability between miR-874-3p and OXCT1-AS1 and between miR-874-3p and BDH1.

Results: OXCT1-AS1 expression was decreased in DOX-treated AC16 cells. Overexpression of OXCT1-AS1 reversed the reduction of cell viability and promotion of cell apoptosis caused by DOX. OXCT1-AS1 is competitively bound to miR-874-3p to upregulate BDH1. BDH1 overexpression restored AC16 cell viability and suppressed cell apoptosis under DOX stimulation. Knocking down BDH1 reversed OXCT1-AS1-mediated attenuation of AC16 cell apoptosis under DOX treatment.

Conclusion: LncRNA OXCT1-AS1 protects human myocardial cells AC16 from DOX-induced apoptosis via the miR-874-3p/BDH1 axis.

Keywords: RNA; Doxorubicin; Cardiac Myocytes; Apoptosis.

Full texts in English - <https://abccardiol.org/en/>



Uma visão esquemática que ilustra o mecanismo de OXCT1-AS1 na lesão miocárdica induzida por DOX in vitro. OXCT1-AS1 é regulado negativamente em células AC16 estimuladas por DOX. OXCT1-AS1 liga-se competitivamente ao miR-874-3p para regular positivamente a expressão de BDH1, o que pode inibir a apoptose de células AC16 tratadas com DOX.

Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa caracterizada por disfunção sistólica e diastólica.¹ É o resultado final da transformação de diversas doenças cardiovasculares e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade.² A apoptose de cardiomiócitos causa a perda de cardiomiócitos e leva à baixa contratilidade miocárdica.³ Evidências crescentes indicam que a apoptose de cardiomiócitos atua como um fator chave no agravamento da IC, e a supressão do remodelamento ventricular causado pela apoptose de cardiomiócitos pode melhorar o prognóstico de pacientes com IC.⁴ Assim, uma melhor compreensão do mecanismo subjacente à apoptose de cardiomiócitos na IC pode ajudar a identificar novos alvos e desenvolver estratégias mais eficazes para o tratamento da IC.

A doxorubicina (DOX) é um antibiótico quimioterápico antitranscritiva que tem sido utilizado como agente antitumoral em tumores sólidos e neoplasias hematológicas.⁵ Contudo, a aplicação clínica da DOX é limitada devido à sua cardiotoxicidade cumulativa, que pode levar a um espectro de efeitos cardiotóxicos de curto e longo prazo, incluindo disfunção ventricular esquerda, cardiomiopatia e até IC.⁶ A taxa de mortalidade aumenta significativamente para 50% dentro de dois anos após a terapia com DOX.⁷ Vários mecanismos foram propostos para a cardiotoxicidade induzida pela DOX, incluindo a apoptose de cardiomiócitos.⁸ Portanto, a DOX foi utilizada para induzir um modelo de cultura celular de lesão miocárdica em nosso estudo.

RNAs não codificantes longos (lncRNAs) são um grupo de transcritos com mais de duzentos nucleotídeos que não

possuem capacidade de codificação de proteínas.⁹ Estudos demonstraram que os lncRNAs participam na regulação da cardiotoxicidade induzida pela DOX na IC. Por exemplo, lncRNA NONMMUT015745 suprime a apoptose de cardiomiócitos induzida por DOX via eixo Rab2A-p53.¹⁰ A regulação negativa do lncRNA SOX2-OT melhora a disfunção miocárdica na IC isquêmica.¹¹ lncRNA KCNQ1OT1 contribui para a apoptose de cardiomiócitos ao direcionar o FUS na IC.¹² É importante ressaltar que um estudo anterior mencionou que a perda de RNA antisense lncRNA OXCT1 1 (OXCT1-AS1) em tecido cardíaco de engenharia humana resulta na diminuição do desenvolvimento da força contrátil. No entanto, não está claro se o OXCT1-AS1 pode afetar a toxicidade miocárdica desencadeada pela DOX.^{13,14}

Evidências acumuladas demonstraram que os lncRNAs podem funcionar como RNAs endógenos concorrentes (ceRNAs) para afetar a estabilidade e tradução do mensageiro (mRNA), interagindo competitivamente com os microRNAs compartilhados (miRNAs). Vários relatórios indicaram que OXCT1-AS1 pode funcionar como um ceRNA para regular positivamente a expressão de mRNA a jusante, afetando assim os comportamentos malignos das células tumorais.^{15,16} No entanto, as moléculas a jusante envolvidas nas redes de ceRNA mediadas por OXCT1-AS1 na IC permanecem obscuras. Aqui, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para explorar as moléculas a jusante de OXCT1-AS1, com o objetivo de compreender seu mecanismo molecular em afetar a lesão celular miocárdica induzida por DOX.

Neste estudo, nosso objetivo foi investigar o papel funcional e o mecanismo molecular do lncRNA OXCT1-AS1 em um modelo de lesão celular miocárdica induzido por DOX. Nossa hipótese é que OXCT1-AS1 poderia afetar a apoptose de cardiomiócitos induzida por DOX, modulando moléculas a jusante através da rede ceRNA.

Materiais e métodos

Cultura celular e tratamento

Cardiomiócitos humanos AC16 foram obtidos da ATCC (Rockville, MD, EUA) e mantidos em meio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco) em atmosfera umidificada a 37°C com 95% de ar e 5% de CO₂. Para induzir um modelo de lesão celular miocárdica, as células AC16 foram tratadas com 5 μ M de DOX (Sangon Biotech Co., Ltd., Xangai, China) por 24 horas.¹⁷ Em alguns experimentos, as células AC16 foram tratadas com 5 μ M de DOX por diferentes períodos (0, 0,5, 2, 6, 12, 24 e 48 h) para detecção da expressão de RNA.

Transfecção celular

Para ensaios de superexpressão, o cDNA completo de OXCT1-AS1 e BDH1 (3-hidroxibutirato desidrogenase 1) foi amplificado e clonado no vetor pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para construir OE-OXCT1-AS1 e OE-BDH1, com um vetor vazio (EV) como controle negativo. RNA em gancho curto direcionado a BDH1 (sh-BDH1), inibidor de

miR-874-3p e o controle negativo (inibidor de NC) (Invitrogen) foram usados para ensaios de knockdown. Ao atingir 80% de confluência em placas de 6 poços, as células AC16 foram transfectadas com os vetores ou oligonucleótidos acima utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Após 48 h de transfecção, as células AC16 foram submetidas a tratamento com DOX durante 24 h para subseqüentes análises funcionais.

Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR)

O RNA total foi isolado de células AC16 tratadas utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen). O RNA foi então transcrito reversamente em cDNA usando o kit de reagentes PrimeScript RT (TaKaRa, Dalian, China). Para a detecção da expressão OXCT1-AS1, miR-874-3p e BDH1, o qPCR em tempo real foi conduzido usando o kit SYBR Green Quantitative RT-qPCR (Sigma-Aldrich, Shanghai, China) em um CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Sistema (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A expressão gênica relativa foi calculada usando o método 2^{- $\Delta\Delta$ CT}, com normalização para GAPDH ou U6.¹⁸

Ensaio XTT

Células AC16 foram semeadas em placas de 96 poços (1x10⁵/poço), seguidas pelos tratamentos indicados. Em seguida, as células em cada poço foram incubadas com 10 μ l de solução XTT (X2000, Solarbio, Pequim, China) por mais 4 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada medindo o valor da densidade óptica a 450 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad).

Análise de citometria de fluxo

A apoptose celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o Kit de Detecção de Apoptose Anexina V-FITC (C1062M, Beyotime) de acordo com os protocolos do fabricante. Após o tratamento com DOX, as células AC16 foram colhidas, lavadas com tampão fosfato salino e depois ressuspensas em 195 μ l de tampão de ligação. Posteriormente, as células foram incubadas com Anexina V-FITC (5 μ l) e PI (10 μ l) no escuro à temperatura ambiente durante 15 min. A apoptose celular foi medida utilizando um citômetro de fluxo (FC500MCL, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA).

Western blotting

A proteína total foi extraída de células AC16 utilizando tampão de lise RIPA (Solarbio). Um kit de ensaio de proteína de ácido bicinonínico (Beyotime, Xangai, China) foi utilizado para quantificar a concentração de proteína. Em seguida, quantidades iguais de amostras de proteína (20 μ g) foram separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecil sulfato de sódio a 10% e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (Beyotime). Após serem bloqueadas com leite desengordurado a 5%, as células foram incubadas a 4°C durante a noite com os seguintes anticorpos primários: anti-Bcl-2 (ab32124, 1:1000), anti-Bax (ab32503, 1:1000), anti-Cleaved caspase-3 (ab2302, 1:500), caspase-9 anti-clivada (ab2324, 1:500), anti-GAPDH (ab8245, 1:2500) (todos da Abcam, Xangai, China). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com o tampão de

lavagem (Beyotime), seguido de incubação com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase de rábano (ab97080, 1: 5000, Abcam) à temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, as bandas proteicas foram visualizadas utilizando um reagente de quimiluminescência melhorado (BeyoECL Plus, Beyotime) e a intensidade relativa da banda foi analisada utilizando o software ImageJ.

Ensaio de repórter de luciferase dupla

Locais de ligação putativos entre miR-874-3p e OXCT1-AS1, e entre miR-874-3p e BDH1 3'UTR foram previstos pelos bancos de dados ENCORI e TargetScan, respectivamente. As sequências de ligação previstas em OXCT1-AS1 e BDH1 3'UTR foram mutadas pelo QuickMutation™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Beyotime). Posteriormente, as sequências de tipo selvagem (WT) e mutante (MUT) de OXCT1-AS1 e BDH1 3'UTR foram clonadas no vetor pmirGLO (Promega, Madison, WI, EUA) para construir OXCTA-AS1-WT/MUT e BDH1 3' UTR-WT/MUT. Em seguida, as células AC16 foram co-transfectadas com os plasmídeos repórteres acima juntamente com o inibidor miR-874-3p ou inibidor de NC usando Lipofectamine 2000. Após 48 h, um sistema de ensaio repórter de luciferase dupla (Promega) foi usado para avaliar a atividade da luciferase, com normalização para Renilla luciferase.¹⁹

Análise estatística

O software SPSS 22.0 (IBM, Armonk, NY, EUA) foi utilizado para análise dos resultados experimentais. Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. O tamanho da amostra foi definido por conveniência. A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todos os dados quantitativos deste estudo são apresentados como médias \pm desvio padrão. As comparações entre os dois grupos foram realizadas por meio de t de Student. Quanto às comparações entre múltiplos grupos, foi aplicada análise de variância unidirecional seguida do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

A superexpressão de OXCT1-AS1 inibe a apoptose de células miocárdicas humanas desencadeada por DOX

Células miocárdicas AC16 humanas foram estimuladas com DOX por 0,5, 2, 6, 12, 24 e 48 h. Comparado com o grupo controle, o nível de expressão de OXCT1-AS1 diminuiu de forma dependente do tempo após o tratamento com DOX (Figura 1A). Como mostrado pelo ensaio XTT, o tratamento com DOX prejudicou significativamente a viabilidade das células AC16, enquanto este efeito foi neutralizado pela superexpressão de OXCT1-AS1 (Figura 1B). Em seguida, avaliamos a apoptose celular via citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a DOX promoveu a apoptose de células AC16, enquanto a superexpressão de OXCT1-AS1 reduziu a apoptose de células AC16 sob estimulação com DOX (Figura 1C). Consistentemente, western blotting revelou que o tratamento com DOX levou a um aumento nos níveis de expressão de proteínas pró-apoptóticas, incluindo Bax, caspase-3 clivada e caspase-9 clivada e uma diminuição no nível de expressão da proteína anti-apoptótica

Bcl-2 em células AC16 (Figura 1D). No entanto, os efeitos acima causados pelo tratamento com DOX foram atenuados de forma proeminente pela superexpressão de OXCT1-AS1 (Figura 1D). Coletivamente, esses achados revelaram que a superexpressão de OXCT1-AS1 poderia atenuar a apoptose de células AC16 induzida por DOX in vitro.

OXCT1-AS1 se liga ao miR-874-3p

Para determinar o mecanismo potencial pelo qual OXCT1-AS1 afetou a apoptose de células AC16 sob estimulação DOX, identificamos então três miRNAs candidatos a jusante de OXCT1-AS1 através do site ENCORI. Notavelmente, o tratamento com DOX aumentou de forma dependente do tempo a expressão de miR-874-3p em células AC16 (Figura 2A), mas não teve efeito significativo na expressão de miR-3186-3p e miR-132-5p (Figura 2B-C). Assim, o miR-874-3p foi selecionado para investigação adicional. De acordo com o RT-qPCR, a expressão do miR-874-3p foi significativamente suprimida pela superexpressão de OXCT1-AS1 (Figura 2D). O sítio de ligação do miR-874-3p no OXCT1-AS1 foi previsto pelo banco de dados ENCORI (Figura 2E). Em seguida, mutamos o sítio de ligação previsto em OXCT1-AS1 e realizamos o ensaio repórter da luciferase. Como demonstrado pelos resultados, a regulação negativa do miR-874-3p diminuiu acentuadamente a atividade da luciferase de OXCT1-AS1-WT, mas não teve efeito significativo sobre a de OXCT1-AS1-MUT em células AC16 (Figura 2F), confirmando que OXCT1-AS1 poderia se ligar ao miR-874-3p em células AC16.

miR-874-3p tem como alvo BDH1

Para descobrir melhor o mecanismo de OXCT1-AS1 na lesão celular miocárdica induzida por DOX, pesquisamos os potenciais alvos a jusante do miR-874-3p usando o banco de dados TargetScan e selecionamos os dez principais genes. Detectamos então os níveis de expressão desses genes em células AC16 estimuladas com ou sem DOX. Como mostrado na Figura 3A, três dos dez genes (RGS4, BDH1, HEG1) foram significativamente expressos diferencialmente entre o grupo DOX e o grupo controle. Para confirmar ainda mais o gene alvo, foi realizado RT-qPCR para examinar os níveis de expressão de RGS4, BDH1 e HEG1 após a inibição do miR-874-3p. Em comparação com o grupo controle, apenas o BDH1 foi proeminentemente regulado positivamente no grupo depletado de miR-874-3p (Figura 3B). Além disso, a superexpressão de OXCT1-AS1 aumentou o nível de expressão de BDH1 (Figura 3C). O banco de dados TargetScan previu um potencial sítio de ligação do miR-874-3p na 3'UTR do BDH1 (Figura 3D). O ensaio repórter da luciferase foi conduzido para verificar a relação de ligação entre as duas moléculas. Em comparação com a do grupo inibidor de NC, a atividade da luciferase do BDH1 3'UTR-WT foi significativamente aumentada no grupo do inibidor miR-874-3p, mas permaneceu quase inalterada após a mutação (Figura 3E). Consequentemente, o miR-874-3p poderia ter como alvo o 3'UTR do BDH1.

BDH1 suprime a apoptose de células miocárdicas humanas estimuladas por DOX

Para revelar o papel funcional do BDH1, superexpressamos o BDH1 em células AC16 tratadas com DOX. RT-qPCR demonstrou que a expressão de BDH1 foi significativamente regulada positivamente em células AC16 após transfecção de OE-BDH1 (Figura 4A).

Como mostrado pelo ensaio XTT e citometria de fluxo, a superexpressão de BDH1 reverteu marcadamente o comprometimento da viabilidade celular AC16 induzido por DOX e a promoção da apoptose celular (Figura 4B-C). Além disso, em comparação com o grupo DOX + EV, o DOX + OE-BDH1 apresentou níveis significativamente diminuídos de Bax, caspase-3 clivada e caspase-9 clivada

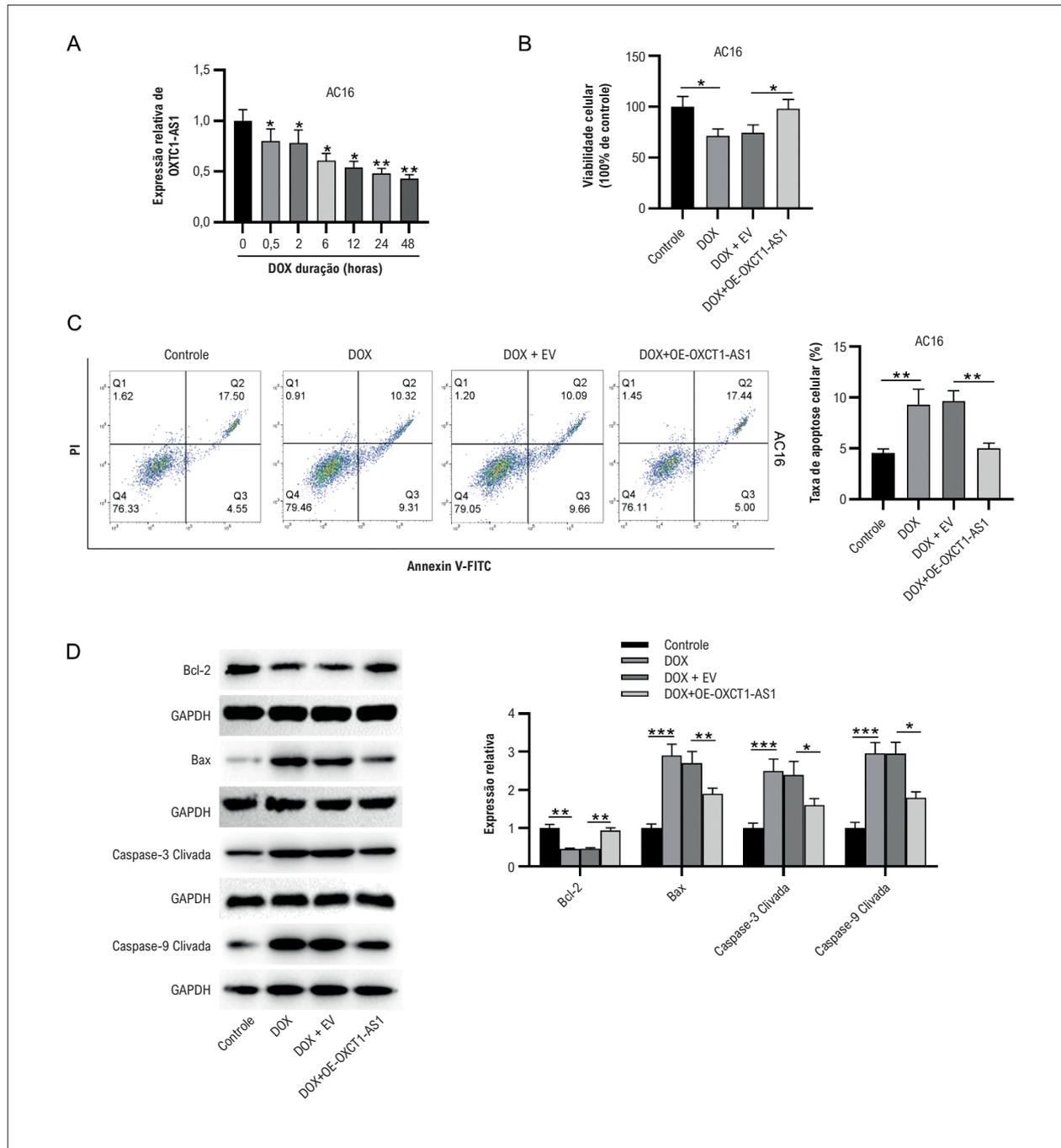


Figura 1 – A superexpressão de OXCT1-AS1 inibe a apoptose de células miocárdicas humanas desencadeada por DOX. A) Células AC16 foram tratadas com DOX por 0,5, 2, 6, 12, 24 e 48 h, e a expressão relativa de OXCT1-AS1 em células miocárdicas humanas AC16 foi medida por RT-qPCR. B) A viabilidade das células AC16 foi determinada pelo ensaio XTT. C) A citometria de fluxo foi realizada para detectar apoptose celular. D) Os níveis de proteína dos genes relacionados à apoptose foram analisados por western blotting. n=3. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. DOX: doxorubicina; EV: vetor vazio; OE: superexpressão.

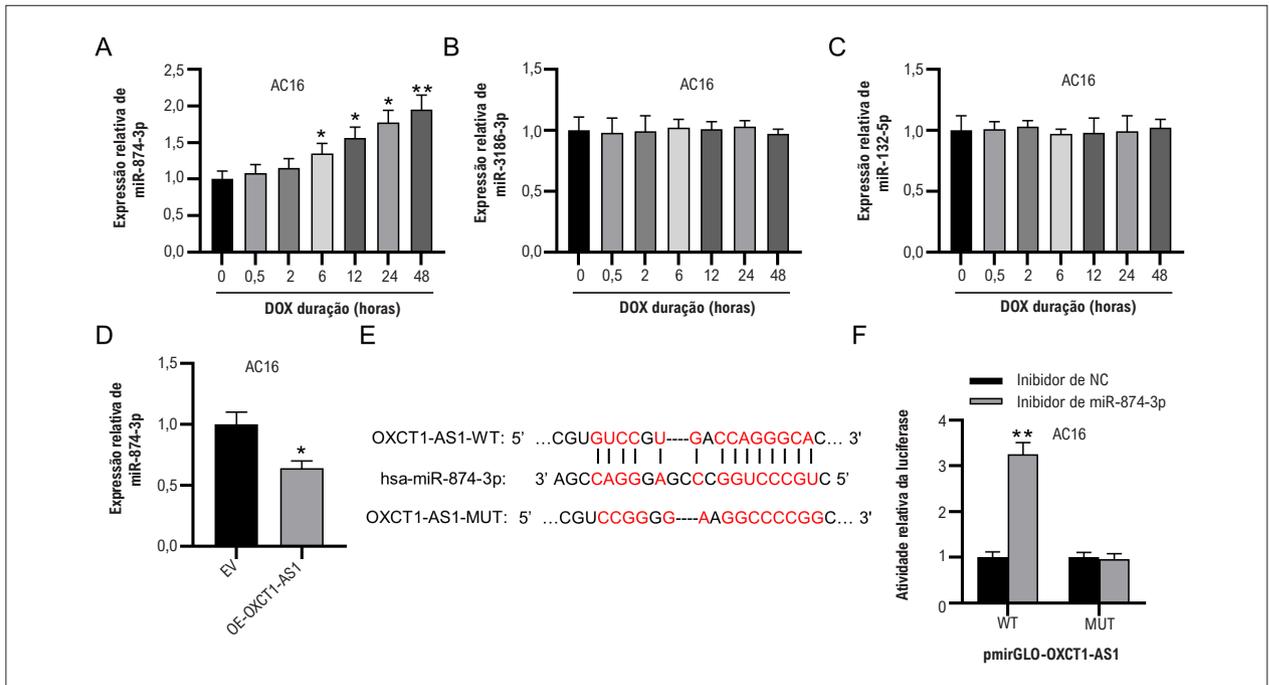


Figura 2 – OXCT1-AS1 liga-se ao miR-874-3p. A-C) Os níveis de expressão de possíveis miRNAs a jusante de OXCT1-AS1 em AC16 tratado com DOX foram examinados por RT-qPCR. D) A expressão de miR-874-3p foi mostrada por RT-qPCR após superexpressão de OXCT1-AS1. E) O site de ligação entre OXCT1-AS1 e miR-874-3p foi previsto pelo banco de dados ENCORI. F) O ensaio repórter da luciferase foi conduzido para verificar a capacidade de ligação entre miR-874-3p e OXCT1-AS1 em células AC16, n=3. *p< 0,05, **p< 0,01 vs. 0 h ou EV.DOX, doxorubicina; EV: vetor vazio; OE: superexpressão; NC: controle negativo; WT: tipo largo; MUT: mutante.

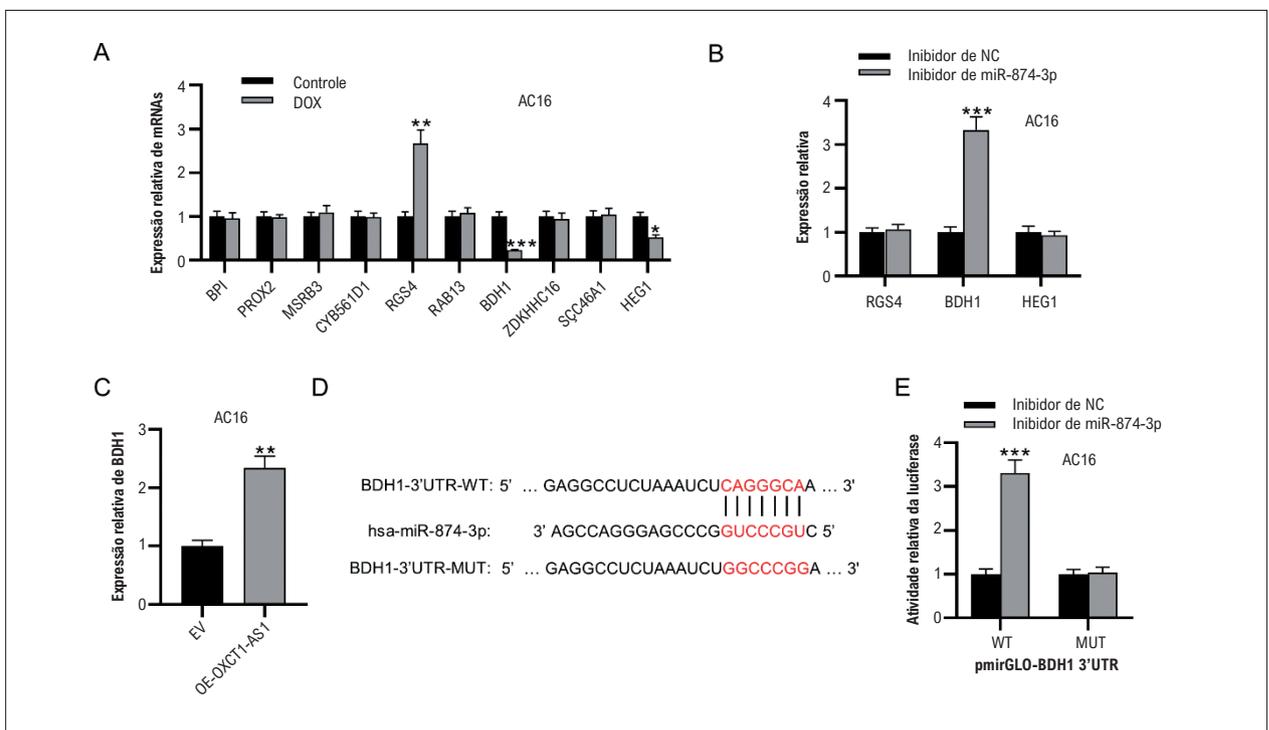


Figura 3 – miR-874-3p tem como alvo BDH1. A) Os níveis de expressão de dez mRNAs que possuem potenciais sítios de ligação ao miR-874-3p foram avaliados por RT-qPCR. (B) RT-qPCR foi realizado para avaliar a expressão de RGS4, BDH1 e HEG1 em células AC16 com ou sem inibição de miR-874-3p. (C) RT-qPCR mostrou o nível de expressão de BDH1 após superexpressão de OXCT1-AS1. (D) O site de ligação entre miR-874-3p e OXCT1-AS1 foi previsto pelo TargetScan. (E). O ensaio repórter da luciferase foi realizado para validar a relação de ligação entre miR-874-3p e BDH1 em células AC16. n=3. **p< 0,01, ***p< 0,001. DOX: doxorubicina; EV: vetor vazio; OE: superexpressão; NC: controle negativo; WT: tipo largo; MUT: mutante.

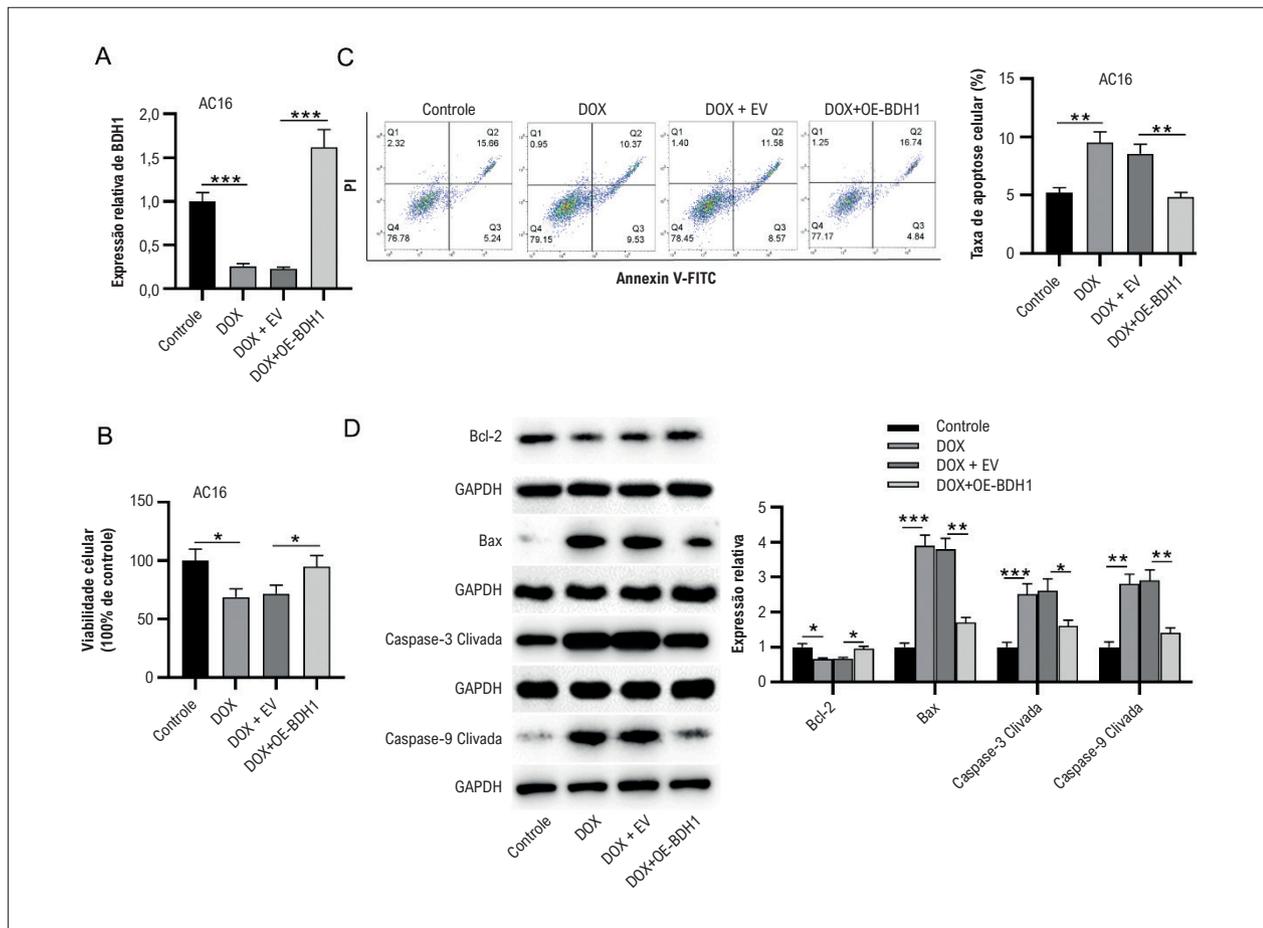


Figura 4 – BDH1 suprime a apoptose de células miocárdicas humanas estimuladas por DOX. A) A expressão de BDH1 em células AC16 de diferentes grupos (controle, DOX, DOX-EV e DOX+OE-OXCT1-AS1) foi examinada por RT-qPCR. (B) A viabilidade das células AC16 após os tratamentos indicados foi detectada pelo ensaio XTT. (C) A apoptose das células AC16 em cada grupo foi examinada por citometria de fluxo. (D) Os efeitos da superexpressão de BDH1 nos níveis de proteína de genes relacionados à apoptose (Bax, caspase-3 clivada, caspase-9 clivada e Bcl-2) em células AC16 tratadas com DOX foram analisados por western blotting. $n=3$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. DOX: doxorubicina; EV: vetor vazio; OE: superexpressão.

e níveis elevados de Bcl-2 (Figura 4D). Em conjunto, a superexpressão de BDH1 poderia aliviar a apoptose de células AC16 sob estimulação com DOX.

Silenciamento de BDH1 resgata o efeito supressor de OXCT1-AS1 na apoptose de células AC16 sob estimulação DOX

Posteriormente, experimentos de resgate foram conduzidos para verificar o papel do eixo OXCT1-AS1/miR-874-3p/BDH1 na lesão celular miocárdica induzida por DOX. Células AC16 foram co-transfectadas com OE-OXCT1-AS1 mais sh-BDH1. Notavelmente, o knockdown de BDH1 reverteu significativamente o aumento da viabilidade celular AC16 mediado pela superexpressão de OXCT1-AS1 e a atenuação da apoptose celular, como demonstrado pelo ensaio XTT e análise de citometria de fluxo, respectivamente (Figura 5A-B). De acordo com western blotting, o knockdown de BDH1 resgatou os níveis de proteína regulados negativamente de Bax, caspase-3 clivada e caspase-9 clivada e os níveis regulados

positivamente de Bcl-2 causados pela superexpressão de OXCT1-AS1 (Figura 5C). Portanto, esses dados revelaram que o OXCT1 poderia aliviar a apoptose de cardiomiócitos AC16 induzida por DOX, regulando positivamente o BDH1.

Discussão

O presente estudo revelou que a superexpressão de OXCT1-AS1 poderia aumentar a viabilidade dos cardiomiócitos AC16 e suprimir a apoptose dos cardiomiócitos sob estimulação com DOX. Mecanicamente, descobrimos que o OXCT1-AS1 interagiu competitivamente com o miR-874-3p para regular positivamente a expressão de BDH1 em células AC16. Além disso, o silenciamento do BDH1 poderia reverter os efeitos acima mediados pela superexpressão de OXCT1-AS1 em células AC16 estimuladas por DOX. O mecanismo investigado neste estudo foi mostrado na Figura Central.

A cardiotoxicidade induzida pela DOX é um problema clínico crítico no manejo de diferentes tipos de malignidades.²⁰ As evidências sugerem que a DOX pode provocar apoptose maciça de cardiomiócitos e resultar em disfunção cardíaca

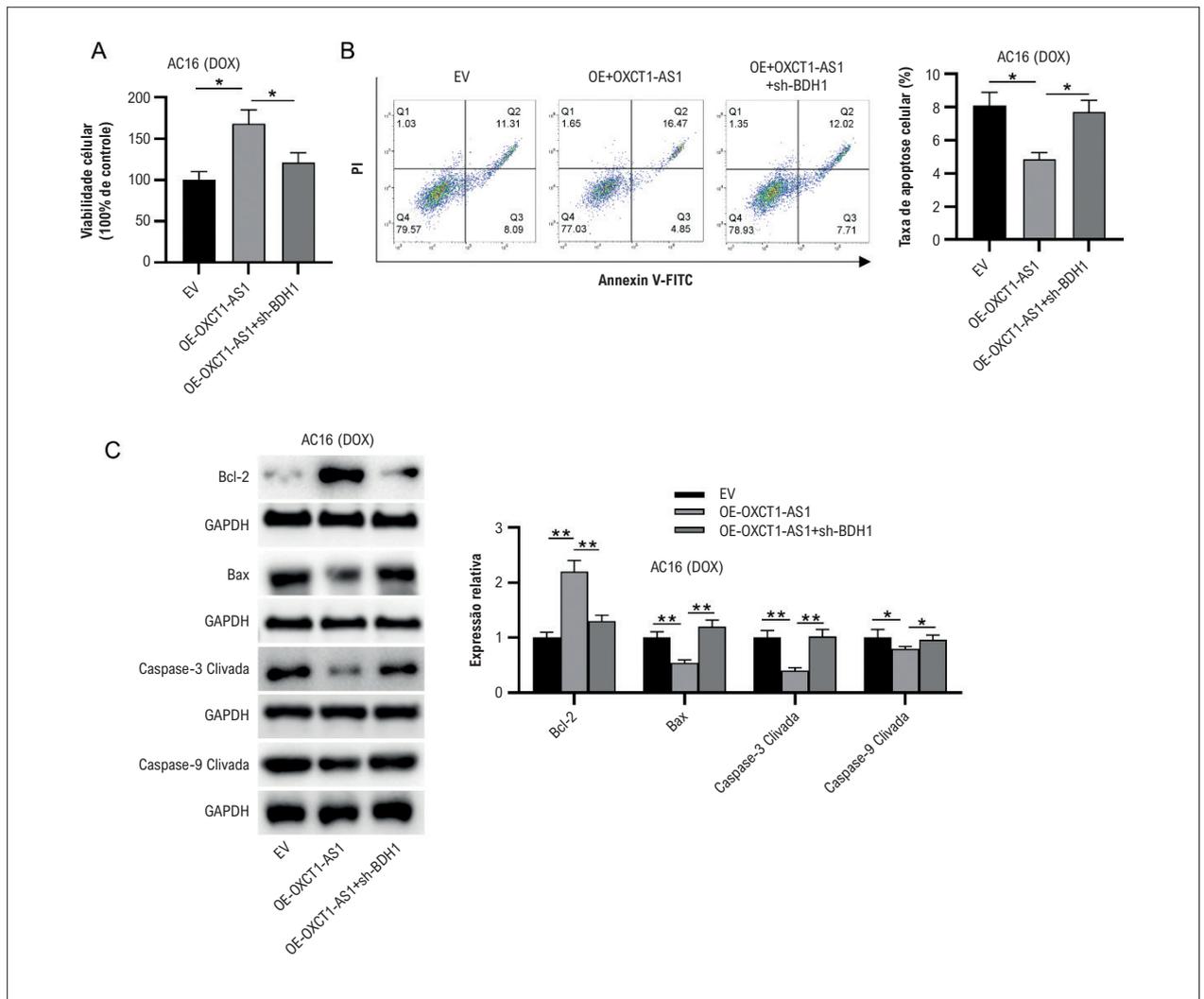


Figura 5 – O silenciamento de BDH1 resgata o efeito supressor de OXCT1-AS1 na apoptose de células AC16 tratadas com DOX. Células AC16 foram transfectadas com EV, OE-OXCT1-AS1 ou OE-OXCT1-AS1 + sh-BDH1, seguido de estimulação com DOX. (A) A viabilidade das células AC16 foi avaliada pelo ensaio XTT. (B) A apoptose de células AC16 foi demonstrada por citometria de fluxo. (C) Western blotting foi utilizado para avaliar os níveis de proteína relacionados à apoptose em células AC16. n=3. *p< 0,05, **p< 0,01. DOX: doxorubicina; EV: vetor vazio; OE: superexpressão; sh: RNA em gancho curto.

grave, levando finalmente à IC.²¹ A inibição da apoptose de cardiomiócitos pode melhorar a disfunção cardíaca induzida por DOX.²² Recentemente, o papel dos lncRNAs nas doenças cardiovasculares tem sido relatado em numerosos estudos.^{23,24} Além disso, a desregulação dos lncRNAs contribui para a apoptose de cardiomiócitos induzida por DOX.^{10,25} Como mencionado acima, as evidências sugerem que o lncRNA OXCT1-AS1 está associado ao desenvolvimento da força contrátil no tecido cardíaco humano e pode servir como um regulador da sobrevivência dos cardiomiócitos.¹³ No entanto, o papel preciso e o mecanismo do OXCT1-AS1 na toxicidade miocárdica induzida pela DOX ainda não foram estudados. Consistente com evidências anteriores, nosso estudo revelou que o tratamento com DOX prejudicou a viabilidade das células AC16 e induziu a apoptose celular in vitro. Além disso, o tratamento com DOX regulou negativamente a expressão de OXCT1-AS1 em cardiomiócitos AC16.

Evidências sugerem que o silenciamento de OXCT1-AS1 aumenta a apoptose de cardiomiócitos humanos e de camundongos.¹³ Da mesma forma, nosso estudo mostrou que a superexpressão de OXCT1-AS1 atenuou significativamente os efeitos acima causados pelo tratamento com DOX, indicando o papel cardioprotetor de OXCT1-AS1 na lesão miocárdica induzida por DOX.

Está bem estabelecido que os lncRNAs podem se ligar competitivamente aos miRNAs e subsequentemente liberar a degradação de mRNAs mediada por miRNAs, nomeadamente a teoria do ceRNA.²⁶ Para determinar o mecanismo molecular de OXCT1-AS1 na regulação da lesão celular miocárdica induzida por DOX, investigamos os miRNAs e mRNAs a jusante através de análise de bioinformática e validação experimental. Como resultado, o OXCT1-AS1 poderia se ligar ao miR-874-3p para regular positivamente o BDH1. Relatórios anteriores demonstraram

o envolvimento do miR-874-3p em múltiplas doenças. Por exemplo, o miR-874-3p pode suprimir a osteoporose visando a leptina.²⁷ Wei et al. propuseram que o miR-874-3p facilita a apoptose de células da granulosa induzida por testosterona através da supressão da desacetilação de p53 mediada por HDAC1.²⁸ No entanto, até onde sabemos, não há estudo sobre o papel do miR-874-3p na lesão miocárdica induzida por DOX. Aqui, nosso estudo revelou a regulação positiva do miR-874-3p em células AC16 estimuladas por DOX, indicando seu papel potencial na cardiotoxicidade desencadeada por DOX. Mais investigações são necessárias para elucidar os achados.

O BDH1 está localizado no cromossomo 3q29 e pertence à família de genes da desidrogenase/reductase de cadeia curta. Relatórios anteriores indicaram que o BDH1 atua como um regulador crítico em múltiplas doenças, como doença renal diabética, doença hepática gordurosa e câncer.²⁹⁻³¹ É importante ressaltar que foi revelado que a superexpressão de BDH1 atenua a apoptose de cardiomiócitos³² de camundongos induzida por peróxido de hidrogênio. Consistentemente, nosso estudo mostrou que o BDH1 foi significativamente regulado negativamente em células AC16 tratadas com DOX, e a superexpressão de BDH1 suprimiu a apoptose de células AC16 induzida por DOX. Além disso, o knockdown de BDH1 reverteu a atenuação mediada por OXCT1-AS1 da apoptose de cardiomiócitos humanos sob estimulação com DOX, confirmando o efeito cardioprotetor do eixo OXCT1-AS1/miR-874-3p/BDH1.

Vale ressaltar que este estudo ainda apresenta algumas limitações. Primeiro, faltavam dados *in vivo* neste estudo. Em segundo lugar, considerando a complexidade dos mecanismos, os reguladores a montante ou as vias de sinalização a jusante do OXCT1-AS1 precisam ser explorados em estudos futuros. Além disso, investigações adicionais podem se beneficiar da exploração dos papéis de RGS4 e HEG1 que são desregulados após a estimulação com DOX.

Referências

1. Tan L, Xiong D, Zhang H, Xiao S, Yi R, Wu J. ETS2 Promotes Cardiomyocyte Apoptosis and Autophagy in Heart Failure by Regulating lncRNA TUG1/miR-129-5p/ATG7 Axis. *FASEB J*. 2023;37(6):e22937. doi: 10.1096/fj.202202148RR.
2. Sun M, Mao S, Wu C, Zhao X, Guo C, Hu J, et al. Piezo1-Mediated Neurogenic Inflammatory Cascade Exacerbates Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2024;0:1-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.065390.
3. Mi S, Huang F, Jiao M, Qian Z, Han M, Miao Z, et al. Inhibition of MEG3 Ameliorates Cardiomyocyte Apoptosis and Autophagy by Regulating the Expression of miRNA-129-5p in a Mouse Model of Heart Failure. *Redox Rep*. 2023;28(1):2224607. doi: 10.1080/13510002.2023.2224607.
4. Hu L, Xu Y, Wang Q, Liu M, Meng L, Yan D, et al. Yiqi Huoxue Recipe Inhibits Cardiomyocyte Apoptosis Caused by Heart Failure Through Keap1/Nrf2/HIF-1 α Signaling Pathway. *Bioengineered*. 2021;12(1):969-78. doi: 10.1080/21655979.2021.1900634.
5. Zhao H, Yu J, Zhang R, Chen P, Jiang H, Yu W. Doxorubicin Prodrug-based Nanomedicines for the Treatment of Cancer. *Eur J Med Chem*. 2023;258:115612. doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115612.
6. Xia W, Hou M. Mesenchymal Stem Cells Confer Resistance to Doxorubicin-induced Cardiac Senescence by Inhibiting microRNA-34a. *Oncol Lett*. 2018;15(6):10037-46. doi: 10.3892/ol.2018.8438.
7. Sheibani M, Azizi Y, Shayan M, Nezamoleslami S, Eslami F, Farjoo MH, et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches. *Cardiovasc Toxicol*. 2022;22(4):292-310. doi: 10.1007/s12012-022-09721-1.
8. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: An Update on the Molecular Mechanism and Novel Therapeutic Strategies for Effective Management. *Biomed Pharmacother*. 2021;139:111708. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111708.
9. Uchida S, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases. *Circ Res*. 2015;116(4):737-50. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.302521.

Conclusões

Em conclusão, o presente estudo demonstra pela primeira vez que OXCT1-AS1 pode proteger células miocárdicas AC16 humanas da apoptose induzida por DOX, regulando o eixo miR-874-3p/BDH1. Nossos achados podem fornecer novas ideias para a atenuação da lesão miocárdica desencadeada pela DOX e a prevenção da IC.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Chen Z, Yijue Liu, Rui Ma; Obtenção de dados: Yijue Liu, Rui Ma, Mengli Zhang, Xian Wu, Huan Peng, Feng Gui, Yafeng Liu, Hao Xia, Niandan Hu, Bo Ai, Jun Xiong, Hongxia Xia, Wenqiang Li, Fen Ai; Análise e interpretação dos dados: Zhen Chen, Yijue Liu, Rui Ma, Mengli Zhang, Xian Wu, Huan Peng, Feng Gui, Yafeng Liu, Fen Ai; Análise estatística: Zhen Chen, Yijue Liu, Rui Ma, Yafeng Liu, Fen Ai; Obtenção de financiamento: Zhen Chen, Yijue Liu, Rui Ma, Yafeng Liu, Fen Ai; Redação do manuscrito: Zhen Chen, Yijue Liu, Rui Ma, Yafeng Liu, Fen Ai; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo: Zhen Chen, Yijue Liu, Rui Ma, Yafeng Liu, Fen Ai.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por Natural Science Foundation of Hubei Province (2020CFB270).

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Aprovação ética e consentimento informado

Este artigo não contém estudos com humanos ou animais realizados por nenhum dos autores.

10. Cai H, Tian P, Ju J, Wang T, Chen X, Wang K, et al. Long Noncoding RNA NONMMUT015745 Inhibits Doxorubicin-mediated Cardiomyocyte Apoptosis by Regulating Rab2A-p53 Axis. *Cell Death Discov.* 2022;8(1):364. doi: 10.1038/s41420-022-01144-9.
11. Gu Q, Wang B, Zhao H, Wang W, Wang P, Deng Y. LncRNA Promoted Inflammatory Response in Ischemic Heart Failure Through Regulation of miR-455-3p/TRAF6 Axis. *Inflamm Res.* 2020;69(7):667-81. doi: 10.1007/s00011-020-01348-8.
12. Lai L, Xu Y, Kang L, Yang J, Zhu G. LncRNA KCNQ1OT1 Contributes to Cardiomyocyte Apoptosis by Targeting FUS in Heart Failure. *Exp Mol Pathol.* 2020;115:104480. doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104480.
13. Trembinski DJ, Bink DI, Theodorou K, Sommer J, Fischer A, van Bergen A, et al. Aging-regulated Anti-apoptotic Long Non-coding RNA Sarrah Augments Recovery from Acute Myocardial Infarction. *Nat Commun.* 2020;11(1):2039. doi: 10.1038/s41467-020-15995-2.
14. Su L, Zhang Y, Wang Y, Wei H. Identification of a lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA ceRNA Network in Alzheimer's Disease. *J Integr Neurosci.* 2023;22(6):136. doi: 10.31083/j.jin2206136.
15. Wang D, Chen Y, Song X, Wu S, Zhang N, Zheng F, et al. LncRNA OXCT1-AS1 Promotes the Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer Cells by Targeting the miR-195/CCNE1 Axis. *Transl Cancer Res.* 2022;11(5):1255-68. doi: 10.21037/tcr-22-855.
16. Zhong C, Yu Q, Peng Y, Zhou S, Liu Z, Deng Y, et al. Novel LncRNA OXCT1-AS1 Indicates Poor Prognosis and Contributes to Tumorigenesis by Regulating miR-195/CDC25A Axis in Glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):123. doi: 10.1186/s13046-021-01928-4.
17. Hu X, Liao W, Teng L, Ma R, Li H. Circ_0001312 Silencing Suppresses Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via MiR-409-3p/HMGB1 Axis. *Int Heart J.* 2023;64(1):71-80. doi: 10.1536/ihj.22-379.
18. Zhuang S, Ma Y, Zeng Y, Lu C, Yang F, Jiang N, et al. METTL14 Promotes Doxorubicin-induced Cardiomyocyte Ferroptosis by Regulating the KCNQ1OT1-miR-7-5p-TFRC Axis. *Cell Biol Toxicol.* 2023;39(3):1015-35. doi: 10.1007/s10565-021-09660-7.
19. Zhang J, Liu W, Ji P, Zhang Y. Silencing of Long Chain Noncoding RNA Paternally Expressed Gene (PEG10) Inhibits the Progression of Neuroblastoma by Regulating microRNA-449a (miR-449a)/ribosomal Protein S2 (RPS2) Axis. *Bioengineered.* 2022;13(3):6309-22. doi: 10.1080/21655979.2022.2042999.
20. Jiang Q, Chen X, Tian X, Zhang J, Xue S, Jiang Y, et al. Tanshinone I Inhibits Doxorubicin-induced Cardiotoxicity by Regulating Nrf2 Signaling Pathway. *Phytomedicine.* 2022;106:154439. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154439.
21. Zhang X, Hu C, Kong CY, Song P, Wu HM, Xu SC, et al. FNDC5 Alleviates Oxidative Stress and Cardiomyocyte Apoptosis in Doxorubicin-induced Cardiotoxicity via Activating AKT. *Cell Death Differ.* 2020;27(2):540-55. doi: 10.1038/s41418-019-0372-z.
22. Christidi E, Brunham LR. Regulated Cell Death Pathways in Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Cell Death Dis.* 2021;12(4):339. doi: 10.1038/s41419-021-03614-x.
23. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, et al. The Tissue-specific lncRNA Fendrr is an Essential Regulator of Heart and Body Wall Development in the Mouse. *Dev Cell.* 2013;24(2):206-14. doi: 10.1016/j.devcel.2012.12.012.
24. Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Saito S, Takahashi A, et al. Identification of a Novel Non-coding RNA, MIAT, that Confers Risk of Myocardial Infarction. *J Hum Genet.* 2006;51(12):1087-99. doi: 10.1007/s10038-006-0070-9.
25. Aung LHH, Chen X, Jumbo JCC, Li Z, Wang SY, Zhao C, et al. Cardiomyocyte Mitochondrial Dynamic-related lncRNA 1 (CMDL-1) May Serve as a Potential Therapeutic Target in Doxorubicin Cardiotoxicity. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021;25:638-51. doi: 10.1016/j.omtn.2021.08.006.
26. Mota GAF, Gatto M, Gregolin CS, Souza SLB, Okoshi MP. mRNA, miRNA, lncRNA, ceRNA: The Future of Cardiovascular Research? *Arq Bras Cardiol.* 2023;120(4):e20230209. doi: 10.36660/abc.20230209.
27. Mei L, Li M, Zhang T. MicroRNA miR-874-3p Inhibits Osteoporosis by Targeting Leptin (LEP). *Bioengineered.* 2021;12(2):11756-67. doi: 10.1080/21655979.2021.2009618.
28. Wei Y, Wang Z, Wei L, Li S, Qiu X, Liu C. MicroRNA-874-3p Promotes Testosterone-induced Granulosa Cell Apoptosis by Suppressing HDAC1-mediated p53 Deacetylation. *Exp Ther Med.* 2021;21(4):359. doi: 10.3892/etm.2021.9790.
29. Wan SR, Teng FY, Fan W, Xu BT, Li XY, Tan XZ, et al. BDH1-mediated α -OHB Metabolism Ameliorates Diabetic Kidney Disease by Activation of NRF2-mediated Antioxidative Pathway. *Aging (Albany NY).* 2023;15(22):13384-410. doi: 10.18632/aging.205248.
30. Xu BT, Teng FY, Wu Q, Wan SR, Li XY, Tan XZ, et al. Bdh1 Overexpression Ameliorates Hepatic Injury by Activation of Nrf2 in a MAFLD Mouse Model. *Cell Death Discov.* 2022;8(1):49. doi: 10.1038/s41420-022-00840-w.
31. Zhang Z, Bi X, Lian X, Niu Z. BDH1 Promotes Lung Cancer Cell Proliferation and Metastases by PARP1-mediated Autophagy. *J Cell Mol Med.* 2023;27(7):939-49. doi: 10.1111/jcmm.17700.
32. Uchihashi M, Hoshino A, Okawa Y, Ariyoshi M, Kaimoto S, Tateishi S, et al. Cardiac-Specific Bdh1 Overexpression Ameliorates Oxidative Stress and Cardiac Remodeling in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2017;10(12):e004417. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004417.

