

Efeitos Protetores Induzidos pela Melatonina nos Cardiomiócitos Contra Lesões de Reperfusão Parcialmente Através da Modulação de IP3R e SERCA por Meio da Ativação de ERK1

Melatonin-Induced Protective Effects on Cardiomyocytes Against Reperfusion Injury Partly Through Modulation of IP3R and SERCA2a Via Activation of ERK1

Shunying Hu, Pingjun Zhu, Hao Zhou, Ying Zhang, Yundai Chen
Chinese PLA General Hospital, Beijing – China

Resumo

Fundamento: A melatonina é um hormônio neuroendócrino sintetizado principalmente pela glândula pineal que é indicado para prevenir efetivamente a lesão de reperfusão miocárdica. Não está claro se a melatonina protege a função cardíaca da lesão de reperfusão através da modulação da homeostase do cálcio intracelular.

Objetivo: Demonstrar que a melatonina protege contra a lesão de reperfusão miocárdica através da modulação de IP3R e SERCA para manter a homeostase de cálcio por meio da ativação de ERK1 em cardiomiócitos.

Métodos: Foram realizados experimentos *in vitro* usando células H9C2 submetidas a indução de hipoxia / reoxigenação simulada (H/R). O nível de expressão de ERK1, IP3R e SERCA foi avaliado por Western Blots. A apoptose de cardiomiócitos foi detectada por TUNEL. A coloração de faloidina foi utilizada para avaliar a alteração da organização de filamentos de actina dos cardiomiócitos. Fura-2 / AM foi utilizado para medir a concentração intracelular de Ca²⁺. Realizando experiências *in vivo*, a expressão miocárdica de IP3R e SERCA foi detectada por coloração com imunofluorescência usando modelo de isquemia miocárdica / reperfusão (I/R) em ratos.

Resultados: resultados *in vitro* mostraram que a melatonina induz a ativação de ERK1 em cardiomiócitos contra H/R que foi inibida por PD98059 (inibidor de ERK1). Os resultados mostraram que a melatonina inibe a apoptose dos cardiomiócitos e melhora a organização do filamento de actina em cardiomiócitos contra H/R, pois ambas poderiam ser revertidas pela PD98059. A melatonina mostrou reduzir a sobrecarga de cálcio, além de inibir a expressão de IP3R e promover a expressão de SERCA através da via ERK1 em cardiomiócitos contra H/R. A melatonina induziu menor IP3R e maior expressão de SERCA no miocárdio que foram revertidas pela PD98059.

Conclusão: a cardioproteção induzida pela melatonina contra lesão de reperfusão é pelo menos parcialmente através da modulação de IP3R e SERCA para manter a homeostase de cálcio intracelular via ativação de ERK1. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(1):44-51)

Palavras-chave: Melatonina; Reperfusão Miocárdica; Miócitos Cardíacos; Infarto do Miocárdio; Insuficiência Cardíaca.

Abstract

Background: Melatonin is a neuroendocrine hormone synthesized primarily by the pineal gland that is indicated to effectively prevent myocardial reperfusion injury. It is unclear whether melatonin protects cardiac function from reperfusion injury by modulating intracellular calcium homeostasis.

Objective: Demonstrate that melatonin protect against myocardial reperfusion injury through modulating IP3R and SERCA2a to maintain calcium homeostasis via activation of ERK1 in cardiomyocytes.

Methods: *In vitro* experiments were performed using H9C2 cells undergoing simulative hypoxia/reoxygenation (H/R) induction. Expression level of ERK1, IP3R and SERCA2a were assessed by Western Blots. Cardiomyocytes apoptosis was detected by TUNEL. Phalloidin-staining was used to assess alteration of actin filament organization of cardiomyocytes. Fura-2 /AM was used to measure intracellular Ca²⁺ concentration. Performing *in vivo* experiments, myocardial expression of IP3R and SERCA2a were detected by immunofluorescence staining using myocardial ischemia/ reperfusion (I/R) model in rats.

Results: *In vitro* results showed that melatonin induces ERK1 activation in cardiomyocytes against H/R which was inhibited by PD98059 (ERK1 inhibitor). The results showed melatonin inhibit apoptosis of cardiomyocytes and improve actin filament organization in cardiomyocytes against H/R, because both could be reversed by PD98059. Melatonin was showed to reduce calcium overload, further to inhibit IP3R expression and promote SERCA2a expression via ERK1 pathway in cardiomyocytes against H/R. Melatonin induced lower IP3R and higher SERCA2a expression in myocardium that were reversed by PD98059.

Conclusion: melatonin-induced cardioprotection against reperfusion injury is at least partly through modulation of IP3R and SERCA2a to maintain intracellular calcium homeostasis via activation of ERK1. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(1):44-51)

Keywords: Melatonin; Myocardial Reperfusion; Cardiac Myocytes; Myocardial Infarction; Heart Failure.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Shunying Hu •
28 Fuxing Road, 100853, Beijing – China
E-mail: hsylyl@163.com

Artigo recebido em 24/01/2017, revisado em 31/07/2017, aceito em 22/09/2017

DOI: 10.5935/abc.20180008

Introdução

A lesão de isquemia-reperfusão miocárdica geralmente ocorre em pacientes com infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST (STEMI), em quem a intervenção terapêutica mais efetiva para reduzir a lesão isquêmica do miocárdio agudo e limitar o tamanho do infarto do miocárdio (MI) é a terapia de reperfusão miocárdica efetiva e feita em tempo oportuno.¹ No entanto, o processo de reperfusão miocárdica pode induzir mais lesão de reperfusão miocárdica.¹⁻⁴ A lesão de reperfusão miocárdica diminui o benefício da terapia de reperfusão e traz para os pacientes maior tamanho de IM, insuficiência cardíaca mais grave e pior prognóstico. A restauração da circulação cardíaca é acompanhada de danos e morte celulares (lesão de reperfusão letal), arritmias de reperfusão, atordoamento miocárdico e fenômeno de não refluxo. A lesão de reperfusão letal (morte de cardiomiócitos induzida por reperfusão) é um alvo terapêutico chave com significativo impacto antecipado no prognóstico do paciente.¹⁻⁶ A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio neuroendócrino, que é sintetizado principalmente pela glândula pineal.^{7,8} A melatonina apresenta efeitos protetores profundos contra a lesão por isquemia-reperfusão no miocárdio através de ações antioxidantes.⁹⁻¹⁸ A sobrecarga de Ca^{2+} é o estimulador primário da lesão por isquemia / reperfusão e induz a apoptose dos cardiomiócitos na condição de isquemia / reperfusão. Não está claro se a melatonina protege a função cardíaca da lesão de reperfusão através da modulação da homeostase de cálcio intracelular. Yeung et al.,¹⁹ sugeriram que a melatonina é cardioprotectora contra a lesão miocárdica induzida por hipóxia crônica porque melhora a regulação do cálcio no retículo sarcoplasmático (RS) dos cardiomiócitos através de um mecanismo antioxidante.

No entanto, a evidência sobre o efeito da melatonina e o mecanismo subjacente à sobrecarga de Ca^{2+} sob isquemia / reperfusão aguda é rara. Os receptores cardíacos do inositol 1,4,5-trifosfato cardíaco (IP3R) e a ATPase do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA) são mediadores importantes para a regulação intracelular do cálcio, a contratilidade e morte em células cardíacas.²⁰⁻²³ Portanto, no presente estudo, colocamos a hipótese de que a melatonina tem efeitos protetores nos cardiomiócitos contra lesões de reperfusão modulando os IP3R e SERCA para manter a homeostase do cálcio intracelular. A isquemia-reperfusão mostrou ativar as cascatas de sinalização anti-apoptóticas da quinase de sobrevivência, incluindo as quinases reguladas por sinal extracelular p42/p44 (ERK 1/2) que foram envolvidas na sobrevivência celular.^{24,25} Não está claro se o ERK1 tem um papel importante durante a modulação da melatonina na homeostase de cálcio nos cardiomiócitos. O presente estudo teve como objetivo elucidar se a melatonina protege os cardiomiócitos contra lesões de reperfusão através da modulação de IP3R e SERCA para reduzir a sobrecarga de cálcio através da via ERK1.

Métodos

Declaração de ética

O presente estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética do Hospital Geral do Exército de Libertação do Povo Chinês, Pequim, China.

Cultura das células H9C2

As células H9C2 (derivadas do cardiomioblasto embrionário de ratos) foram obtidas da Academia Chinesa de Ciências Médicas (Xangai, China) cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco: Mistura Nutritiva F-12 (DMEM/F12, Thermo Fisher Biochemical Products, Pequim, China), complementada com 10% de soro bovino fetal (FBS, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 100 mg/ml de penicilina / estreptomicina (Beyotime Institute of Biotechnology, China).

Indução de lesão H/R in vitro e melatonina ou mais com tratamento PD98059

As condições hipóxicas foram produzidas usando solução fresca de Hanks com 95% de N_2 e 5% de CO_2 . O pH foi ajustado para 6,8 com lactato para imitar condições isquêmicas. Os pratos foram colocados em uma incubadora hipóxica (Invivo2-400, Ruskinn) que foi equilibrada com 95% de N_2 e 5% de CO_2 e a concentração real de oxigênio foi zero. Os níveis ambientais de O_2 na incubadora de hipóxia foram monitorados por um analisador de O_2 (série-2000, Alpha Omega Instruments). Após o tratamento hipóxico, o meio de cultura foi rapidamente substituído por DMEM fresco com 1% de FBS para iniciar a reoxigenação. O procedimento de hipóxia / reoxigenação foi alcançado por 4 h de tratamento de hipóxia (anóxia) e 4 h de tratamento de reoxigenação. Para o tratamento com melatonina, as células cultivadas foram pré-incubadas com melatonina (5 μM) 12 h antes da hipóxia ou mais com PD98059 com concentração de 10 μM antes do tratamento com melatonina. A dose de melatonina foi escolhida de acordo com estudos prévios.^{18,26}

Ensaio TUNEL in vitro de apoptose de cardiomiócitos por microscopia confocal

A apoptose das células H9C2 foi examinada pelo ensaio TUNEL. Os cardiomiócitos cultivados foram fixados com 4% de paraformaldeído (PFA) (Millipore, EUA) e permeabilizados com 1% de Triton X-100 (Sigma Aldrich, EUA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Invitrogen, EUA) durante 30 minutos, seguido por 3 vezes (3 x 10 minutos) de lavagem com PBS fresco. Em seguida, aplicou-se um Kit de Ensaio de Fragmentação de ADN in situ Apo-BrdU (BioVision, EUA) durante 1 hora, seguido por incubação das placas tratadas com 5 μl de anticorpo anti-BrdUFITC. Foram realizados 15 minutos de imunocoloração DAPI para identificar os núcleos dos cardiomiócitos. Em seguida, as imagens foram tomadas em um microscópio confocal de leitura laser Leica TCS-SP2 AOBS invertido (Leica, Alemanha). A apoptose foi quantificada como a porcentagem de cardiomiócitos cultivados.

Estudo de F-actina com faloidina fluorescente e microscopia confocal

A detecção de F-actina com faloidina foi feita de acordo com as instruções do fabricante. As H9C2 foram fixadas em vidro tratado com polilisina com paraformaldeído a 3,7% e depois lavado com 0,1% de Triton X-100-PBS. Posteriormente, foram coradas com solução conjugada FITC-faloidina fluorescente 0,8 unidade/ml (KeyGen Bio TECH Corp, China)

durante 10 min à temperatura ambiente. Finalmente, foram lavadas três vezes com PBS. As amostras montadas foram analisadas utilizando microscopia confocal.

Detecção da concentração intracelular de Ca^{2+}

O Ca^{2+} intracelular foi medido usando o corante fluorescente dependente de cálcio Fura-2 de acordo com as instruções do fabricante. As culturas de H9C2 foram transferidas para 1 mL de DMEM fresco contendo 5 μ L de Fura-2-acetoxi-metiléster (AM; 10 μ M; Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em uma incubadora de CO_2 a 37° C durante 1 h. As células carregadas com Fura-2 foram então colocadas na platina de um microscópio confocal (Olympus) e visualizadas usando uma objetiva de imersão em óleo de 60 \times .

Western blots

Após os tratamentos apropriados, as células cultivadas foram lisadas com tampão de lise RIPA (Beyotime, China) durante 30 min e centrifugadas a 14 000 xg durante 30 min. Quantidades iguais de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio ao 10% e transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (Millipore). Após ter sido bloqueada com 5% de leite em solução salina tamponada com tris contendo 0,05% de Tween20 (TBST) à temperatura ambiente durante 1 h, a membrana foi incubada a 4°C durante a noite com os seguintes anticorpos primários: t-ERK1 (1: 2000, Abcam), p-ERK1 (1: 1000, Abcam), IP3R (1: 1000, Abcam) e SERCA (1: 1000, Abcam). Depois de ser lavada com TBST e incubada adicionalmente com o anticorpo secundário apropriado a 37°C durante 60 min, as blots foram visualizadas com um reagente de quimioluminescência melhorada (ECL).

Modelo de isquemia / reperfusão miocárdica (I/R) e tratamento com melatonina

Ratos machos Sprague-Dawley (SD) (250 \pm 10 g) foram adquiridos do Centro Animal Experimental, do Hospital Geral PLA da China. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal do Hospital Geral do PLA chinês. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos (n = 5 em cada grupo): (1) Grupo de controle, (2) Grupo I/R, (3) Grupo I/R + Melatonina, (4) I/R + Melatonina + PD98059. Os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com pentobarbital sódico (50 mg/kg). Os animais foram então incubados e ventilados por um respirador regulado por volume durante a cirurgia. Após uma toracotomia lateral esquerda e pericardectomia, a artéria coronária esquerda foi identificada e ligada suavemente com uma sutura de Prolene 6.0. O IAM bem-sucedido foi confirmado pela elevação típica do segmento ST na eletrocardiografia. A isquemia miocárdica durou 30 minutos e a reperfusão 2 horas. Melatonina recentemente preparada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi administrada por via intraperitoneal em uma dose de 20 mg/kg 12 horas antes do IM. PD98059 (inibidor ERK1, Sigma, EUA) foi administrado com injeção intraperitoneal em uma dose de 5 mg/kg 4 horas antes do tratamento com melatonina. No final do período de reperfusão, os corações foram excisados para a preparação de seções (4 μ m de

espessura) para detectar a expressão de SERCA e IP3R por coloração de imunofluorescência.

Detecção de expressão do miocárdio SERCA e IP3R por imunofluorescência

Depois de serem tratadas como foi mencionado acima, as seções do coração foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS durante 15 minutos à temperatura ambiente, permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 durante 10 min e depois bloqueadas com 5% de BSA durante 1 h. Em seguida, as amostras foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo monoclonal anti-rato SERCA (1: 100; Abcam, Cambridge, EUA). Depois de serem lavados com PBS por três vezes, as amostras foram incubadas com IgG policlonal de cabra anti-rato (1: 400; Abcam, Cambridge, EUA) à temperatura ambiente no escuro durante 2 h. Para contra-coloração nuclear, as amostras foram incubadas com 4', 6-diamidino-2-fenilidona (DAPI, Sigma, EUA) durante 5 min. Finalmente, as imagens de imunofluorescência foram obtidas por microscópio de fluorescência invertida (Olympus, Tóquio, Japão).

Análise estatística

Os dados foram descritos como a média \pm DP de pelo menos três experimentos independentes analisados. As diferenças entre mais de dois grupos foram avaliadas através de ANOVA de 1 via (todos os dados atendiam a homogeneidade de variâncias e distribuição normal), e o método LSD foi usado para comparar a diferença estatística na análise pós-hoc. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com SPSS para Windows versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados

A melatonina promoveu ativação de ERK1 em cardiomiócitos contra H/R

Às 4 horas após a reoxigenação, investigamos o efeito da melatonina na fosforilação de ERK1 (p-ERK1) usando Western blot. O nível de expressão de p-ERK1 não mostrou diferença significativa entre o controle e o grupo H/R. A melatonina promoveu significativamente a expressão de p-ERK1 em cardiomiócitos a qual foi revertida por PD98059 (inibidor ERK1) (Figura 1).

A melatonina impede a apoptose induzida por H/R de cardiomiócitos via ERK1 in vitro

A apoptose das células H9C2 foi detectada às 4 h após a reoxigenação por coloração TUNEL. Os resultados demonstraram que H/R induzem apoptose de células H9C2 in vitro. O pré-tratamento com melatonina diminuiu a apoptose induzida por H/R de H9C2. Os resultados mostraram que a porcentagem de células apoptóticas foi obviamente maior no grupo H/R em comparação com o grupo controle, porém, que foi significativamente menor no grupo da melatonina do que o grupo H/R. PD98059 (inibidor ERK1) reduziu o efeito da melatonina na prevenção da apoptose dos cardiomiócitos contra H/R (Figura 2).

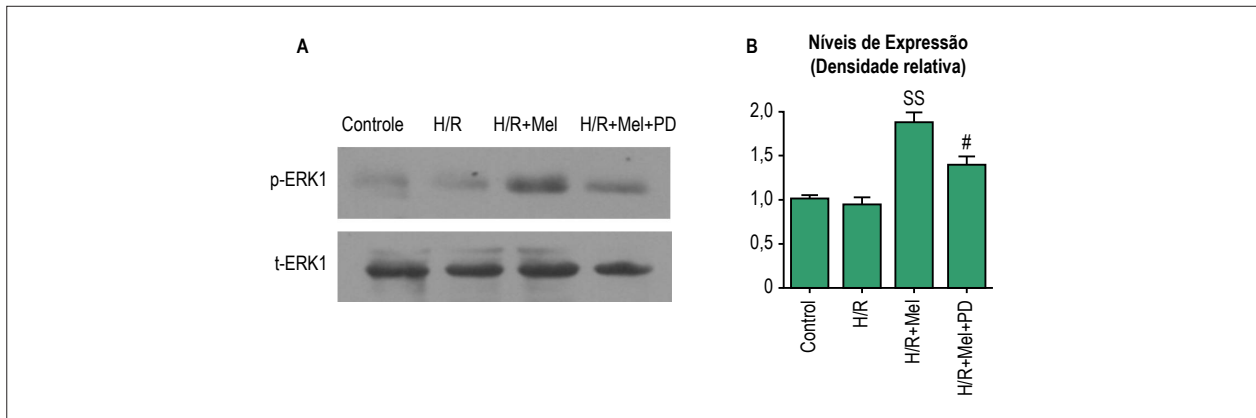


Figura 1 – A melatonina promoveu a ativação de ERK1 em células H9C2 contra H/R. As células H9C2 foram incubadas em condições normais ou em condições de H/R simuladas, em condições de H/R simuladas mais pré-tratamento com melatonina ou em condições de H/R simuladas mais pré-tratamento com melatonina e PD98059 (inibidor de ERK1). Os níveis de expressão de ERK1 fosforilado (p-ERK1) foram avaliados por Western Blot (A) e foram quantitativamente analisados (B). Todos os valores são apresentados como média \pm DP, n = 3. ^{SS}p < 0,01 vs. grupo H/R; [#]p < 0,05 vs. grupo H/R + Mel. (Control: grupo controle; H/R: grupo H/R, H/R + mel: grupo H/R + melatonina; H/R + mel + PD: H/R + melatonina + grupo PD98059)

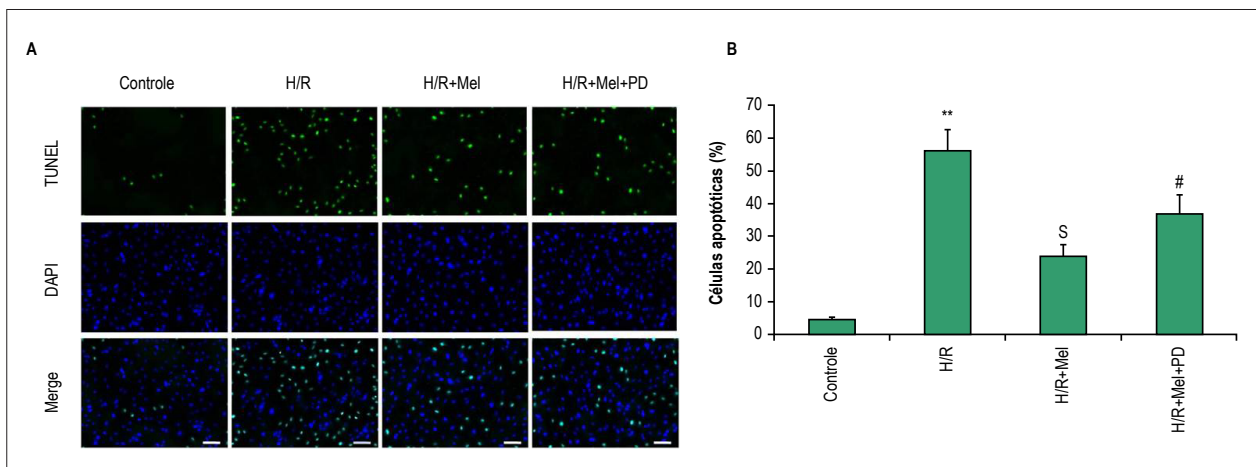


Figura 2 – A melatonina previne a apoptose das células H9C2 contra H/R via ERK1 in vitro. A apoptose foi avaliada por TUNEL de fluorescência. Imagens de coloração TUNEL representativas (A) e análise quantitativa em células H9C2 (B). bar = 50 μ m. Todos os valores são apresentados como a média \pm DP, n = 3. ^{**}p < 0,01 vs. grupo controle; ^Sp < 0,05 vs. grupo H/R; [#]p < 0,05 vs. grupo H/R + Mel. (Control: grupo de controle; H/R: grupo H/R; H/R + mel: grupo H/R + melatonina; H/R + mel + PD: grupo H/R + melatonina + PD98059)

A melatonina protege a organização de F-actina em células H9C2 contra H/R via ERK1

Investigamos a organização da F-actina em células H9C2 às 4h após a reoxigenação por coloração FITC de fluorescência de faloidina. Os cardiomiócitos de controle mostraram organização regular e bem definida da actina, enquanto os cardiomiócitos no grupo H/R apresentaram disposição de F-actina mais difusa e irregular. As diferenças podem ser visualizadas nos cardiomiócitos representativos. O pré-tratamento da melatonina melhorou a organização da actina F em cardiomiócitos em comparação com o grupo H/R, mas o PD98059 danificou a associação de F-actina pela inibição do efeito da melatonina (Figura 3).

A melatonina reduz a sobrecarga de Ca²⁺ em cardiomiócitos contra H/R via ERK1

Às 4 horas após a reoxigenação, investigamos o efeito da melatonina sobre a sobrecarga de Ca²⁺ induzida por H/R em cardiomiócitos usando o corante fluorescente dependente de cálcio Fura-2. Os resultados mostraram que a fluorescência foi mais forte no grupo H/R do que no grupo controle, enquanto a fluorescência diminuiu no grupo da melatonina em comparação com o grupo H/R, o que indicou que H/R causou um aumento acentuado da concentração de Ca²⁺ citosólica e que o pré-tratamento de melatonina inibiu significativamente o aumento induzido por H/R da concentração de Ca²⁺ citosólica que foi reduzida por PD98059 (Figura 4).

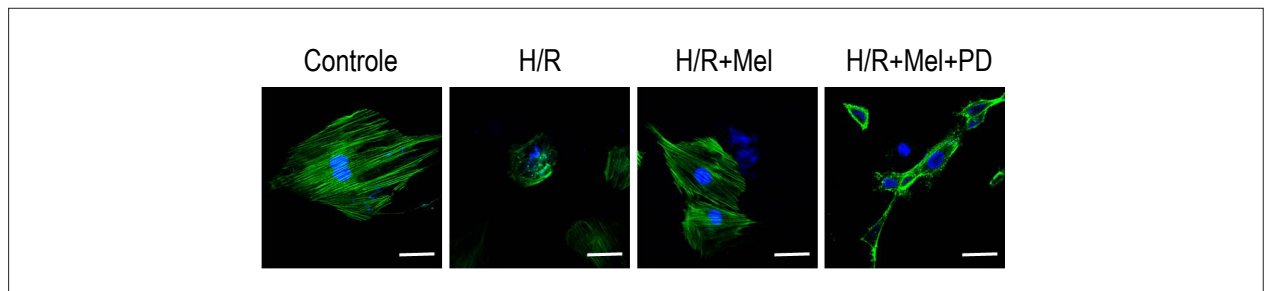


Figura 3 – A melatonina protege a organização da F-actina em células H9C2 contra H/R via ERK1 *in vitro*. Imagens representativas de microscopia confocal mostram células de H9C2 coradas com FITC-faloidina. Os resultados mostraram que a H/R simulada induziu disposição da actina mais difusa e irregular em comparação com o grupo controle. A melatonina preservou a organização de actina mais regular e bem definida e o PD98059 (inibidor ERK1) reduziu a proteção da melatonina. bar = 20 μ m. (Controle: grupo de controle; H/R: grupo H/R; H/R + mel: grupo H/R + melatonina; H/R + mel + PD: grupo H/R + melatonina + PD98059)

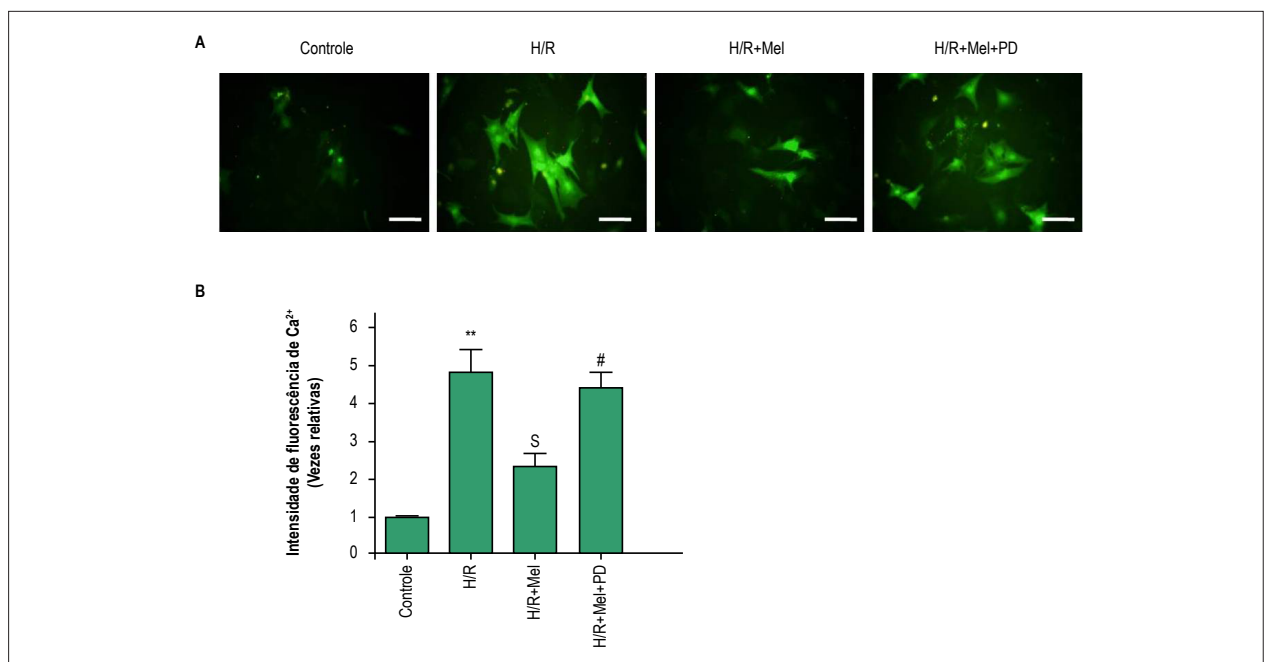


Figura 4 – A melatonina reduz a sobrecarga de Ca^{2+} em células H9C2 contra H/R via ERK1 *in vitro*. O conteúdo de Ca^{2+} foi avaliado utilizando Fura-2 / AM em células H9C2 incubadas em condições normais ou em condições de H / R simuladas, em condições de H / R simuladas, mais pré-tratamento com melatonina ou em condições simuladas de H/R mais pré-tratamento com melatonina e PD98059 (Inibidor de ERK1). A intensidade de fluorescência verde por Fura-2 foi obviamente mais forte no grupo H/R, e o pré-tratamento de melatonina reverteu a alteração que foi inibida pelo inibidor ERK1. bar = 30 μ m. Todos os valores são apresentados como média \pm DP. n = 3. ** p < 0,01 vs. grupo controle; ^sp < 0,05 vs. grupo H/R; #p < 0,05 vs. grupo H / R + Mel. (Controle: grupo de controle; H/R: grupo H/R; H/R + mel: grupo H/R + melatonina; H/R + mel + PD: grupo H/R + melatonina + PD98059)

Melatonina modulou a expressão de IP3R e SERCA em cardiomiócitos contra H/R via ERK1

Às 4 horas após a reoxigenação, investigamos o efeito da melatonina na expressão de IP3R e SERCA em H9C2 por Western blot. Os resultados indicaram que H/R aumentam a expressão de IP3R e reduzem a expressão de SERCA, respectivamente. O pré-tratamento da melatonina inibiu a expressão de IP3R e induziu expressão de SERCA que foi revertida por PD98059. (Figura 5).

Melatonina modulou a expressão de IP3R e SERCA através da via ERK1 em corações de ratos reperfundidos

In vivo, investigamos o efeito da melatonina na expressão de IP3R e SERCA em corações de ratos reperfundidos. A expressão

de IP3R foi maior no grupo I/R em comparação com o grupo controle, e a melatonina reverteu a mudança. Os resultados demonstraram que a expressão de SERCA foi menor no grupo I/R em comparação com o grupo controle, mas a expressão de SERCA foi maior no grupo da melatonina do que o grupo I/R. O pré-tratamento de PD98059 reduziu o efeito da melatonina na expressão de IP3R e SERCA em corações de rato contra I/R (Figura 6).

Discussão

A morte induzida por reperfusão de cardiomiócitos que eram viáveis no final do evento isquêmico é definida como lesão letal de reperfusão miocárdica (infarto de reperfusão).^{1,3,27}

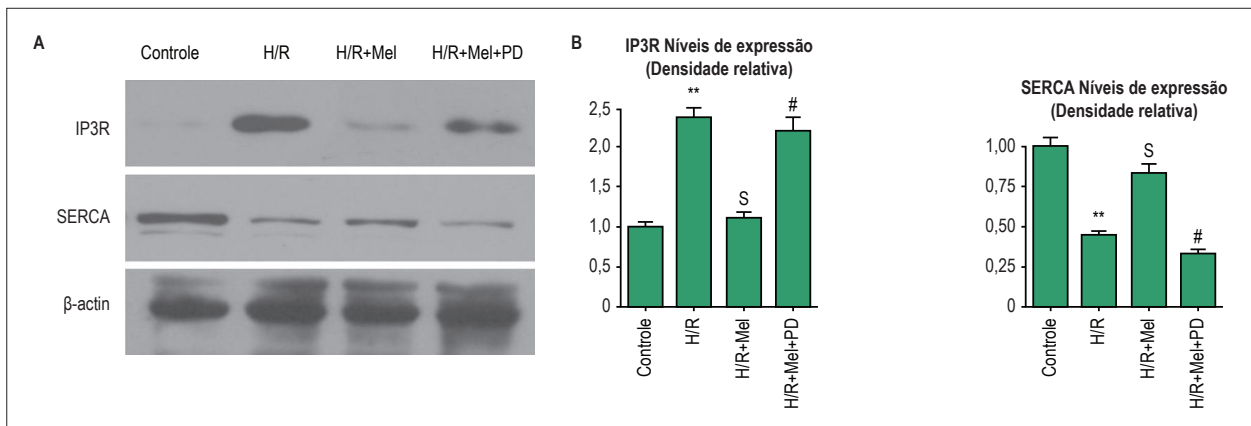


Figura 5 – Expressão de SERCA e IP3R modulada por melatonina em células H9C2 contra H/R via ERK1 *in vitro*. Os resultados indicaram que a melatonina inibiu a expressão de IP3R e promoveu a expressão de SERCA que foi reduzida por PD98059. As imagens de Western blot representativas (A) e a análise quantitativa (B-C) mostraram o efeito da melatonina na expressão de IP3R e SERCA através da via ERK1 em células H9C2 contra H/R. *bar* = 30 μ m. ***p* < 0,01 vs. grupo de controle; ^s*p* < 0,05 vs. grupo H/R; #*p* < 0,05 vs. grupo H/R + Mel. (Controle: grupo de controle; H/R: grupo H/R; H/R + mel: grupo H/R + melatonina; H/R + mel + PD: grupo H/R + melatonina + PD98059)

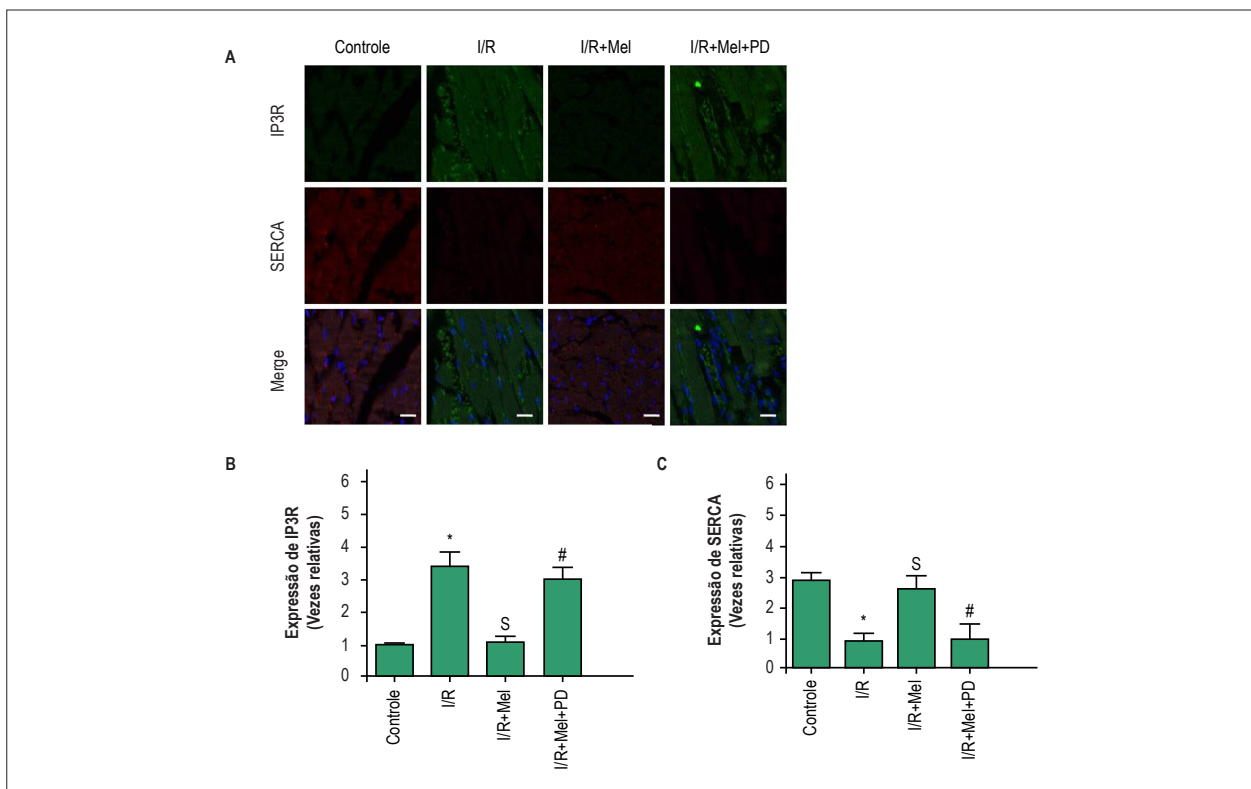


Figura 6 – Expressão modulada de melatonina de IP3R e SERCA através da via ERK1 em corações de ratos reperfundidos. No miocárdio reperfundido, a expressão de IP3R e SERCA foi avaliada por coloração com imunofluorescência (A) e análise quantitativa (B-C). Os resultados mostraram que a intensidade de fluorescência do IP3R aumentou no grupo I/R mais do que no grupo controle, mas foi menor no grupo da melatonina em comparação com o grupo I/R. Pelo contrário, a melatonina aumentou a expressão de SERCA no miocárdio reperfundido. Ambos os efeitos da melatonina na expressão de IP3R e SERCA foram inibidos pelo PD98059 (inibidor ERK1). *bar* = 30 μ m. Todos os valores são apresentados como média \pm DP. *n* = 5. **p* < 0,05 versus grupo controle; ^s*p* < 0,05 versus grupo I/R; #*p* < 0,05 vs. grupo I/R + Mel. (Controle: grupo de controle; I/R: grupo I/R; I/R + mel: grupo I/R + melatonina; I/R + mel + PD: grupo I/R + melatonina + PD98059).

A existência de lesão letal de reperfusão miocárdica foi inferida em modelos experimentais de IM e em pacientes com STEMI (1). Os principais fatores contributivos para a morte induzida por reperfusão de cardiomiócitos incluem estresse

oxidativo, sobrecarga de cálcio, abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) e hipercontractura.^{28,29} A sobrecarga de Ca^{2+} é um dos principais atores desta lesão de reperfusão letal,³⁰ o que resulta em parte do retículo sarco /

endoplasmático excessivo (RS/RE), liberação de Ca^{2+} e fluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática.³¹ Embora os receptores de rianodina (RyRs) sejam os principais canais cardíacos de liberação RS/RE Ca^{2+} envolvidos no acoplamento excitação-contracção e lesão isquemia-reperfusão,^{32,33} alguns estudos relataram um papel crescente dos receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R) e os canais de liberação de Ca^{2+} na modulação do acoplamento excitação-contracção e a morte celular.^{22,23} Gomez et al.³⁴ indicaram que a inibição do complexo de canais IP3R Ca^{2+} limitou a liberação RS/RE Ca^{2+} e reduziu a sobrecarga de Ca^{2+} citosólica e mitocondrial e inibiu a subsequente abertura de PTP. Enquanto isso, o SERCA cardíaco é uma bomba chave responsável pela regulação do cálcio intracelular e a contratilidade em células cardíacas. A recaptação de cálcio prejudicada resultante da diminuição da expressão e atividade do SERCA é uma marca registrada de IC.²⁰ IP3R e SERCA têm confirmado desempenhar papéis importantes na manutenção da homeostase do cálcio intracelular em cardiomiócitos.^{20,22,23,35}

A melatonina como um tipo de hormônio neuroendócrino é sintetizada principalmente pela glândula pineal.^{7,8} Estudos prévios mostraram que a melatonina tem importantes efeitos protetores contra a lesão por isquemia e reperfusão miocárdica.⁹⁻¹⁴ A administração de melatonina mostrou contribuir para a reabilitação da função contrátil no coração isolado durante a reperfusão e reduzir a sensibilidade da abertura de mPTP a Ca^{2+} .³⁶

A melatonina também demonstrou desempenhar um papel nas mudanças adaptativas mitocondriais.³⁷ A melatonina e seus metabólitos interagem eficientemente com várias espécies reativas de oxigênio e nitrogênio reativo e, além disso, suprarregulam as enzimas antioxidantes e infrarregulam as enzimas pró-oxidantes.^{9,15,16} Estudos prévios confirmaram que o pré-tratamento da melatonina atenuou a lesão por IR reduzindo o dano oxidativo e inibindo a abertura do mPTP. No entanto, a evidência sobre o efeito da melatonina e o mecanismo subjacente à sobrecarga de Ca^{2+} sob isquemia / reperfusão aguda é rara.

O presente estudo demonstrou que a melatonina realiza cardioproteção através da modulação de IP3R e SERCA para manter a homeostase de cálcio via ERK1 em cardiomiócitos. A via ERK1 demonstrou ter efeito anti-apoptótico durante o processo de lesão de reperfusão.^{24,25} Não está claro se a melatonina mantém a homeostase de cálcio através da modulação de IP3R e SERCA via ERK1.

No presente estudo, os resultados mostraram que a melatonina promove a fosforilação de ERK1 em cardiomiócitos contra H/R, e que o pré-tratamento de PD98059 (inibidor de ERK1) reduziu a fosforilação de ERK1. Os resultados *in vitro* indicaram que a melatonina previne a apoptose dos cardiomiócitos contra H/R. No entanto, a melatonina pode preservar a estrutura dos cardiomiócitos contra lesões de reperfusão. Além disso, a sobrecarga de cálcio induzida por H/R é significativamente revertida pela melatonina. No entanto, o pré-tratamento de PD98059 inibiu o efeito da melatonina na apoptose, organização de actina F e na sobrecarga de cálcio em cardiomiócitos contra H/R. Para elucidar ainda mais o mecanismo subjacente do efeito protetor dos cardiomiócitos

de melatonina contra H/R, observamos os efeitos da melatonina na expressão de IP3R e SERCA. Os resultados mostraram que a expressão de SERCA diminuiu no grupo H/R em comparação com o grupo controle, mas a melatonina promoveu a expressão de SERCA em cardiomiócitos. Ao contrário, H/R induz a expressão de IP3R, e a melatonina inibe a expressão de IP3R. O pré-tratamento de PD98059 reverteu o efeito da melatonina na expressão de IP3R e SERCA. *In vivo*, o nível de IP3R do miocárdio é reduzido e a expressão de SERCA é aumentada pelo pré-tratamento da melatonina, no entanto, o PD98059 reverteu o efeito da melatonina na expressão de IP3R e SERCA. A melatonina na dose utilizada no estudo não mostrou efeitos colaterais evidentes em comparação com outros grupos. Os resultados *in vivo* confirmaram ainda a melatonina para regular a expressão de IP3R e SERCA através da via ERK1. A partir dos resultados acima, é razoável inferir que a melatonina poderia proteger os cardiomiócitos contra a lesão por reperfusão, afetando a expressão de IP3R e SERCA para inibir a sobrecarga de cálcio através da via ERK1.

Conclusão

A melatonina pode proteger os cardiomiócitos contra lesões de reperfusão através da modulação de IP3R e SERCA atenuando a sobrecarga de cálcio através da via ERK1. A homeostase de cálcio melhorada, seguida de função preservada e estrutura de cardiomiócitos, pode diminuir a apoptose dos cardiomiócitos e melhorar a função cardíaca. O presente estudo fornece mais evidências para o uso da melatonina para proteger a função cardíaca em pacientes com STEMI submetidos a terapia de reperfusão miocárdica.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Hu S, Zhu P, Zhou H, Zhang Y, Chen Y; Obtenção de dados: Hu S, Zhu P, Zhou H, Zhang Y; Análise e interpretação dos dados, Análise estatística e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Hu S, Zhou H; Obtenção de financiamento e Redação do manuscrito: Hu S.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo National Natural Science Foundation of China (Nº.81770237) e parcialmente financiado pelo China Postdoctoral Science Foundation.

Vinculação acadêmica

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

Aprovação Ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Chinese PLA General Hospital.

Referências

1. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92-100. doi: 10.1172/JCI62874.
2. Morel O, Perret T, Delarche N, Labeque JN, Jouve B, Elbaz M, et al. Pharmacological approaches to reperfusion therapy. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):246-52. doi: 10.1093/cvr/cvs114.
3. Ibanez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-71. doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.032.
4. Chen M, Zheng YY, Song YT, Xue JY, Liang ZY, Yan XX, et al. Pretreatment with low-dose gadolinium chloride attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37(4):453-62. doi: 10.1038/aps.2015.156.
5. Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart*. 2016;102(5):341-8. doi: 10.1136/heartjnl-2015-307855.
6. Fauconnier J, Roberge S, Saint N, Lacampagne A. Type 2 ryanodine receptor: a novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2013;138(3):323-32. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.015.
7. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(3):313-6. doi: 10.1016/j.biocel.2005.08.020.
8. Sun H, Gusdon AM, Qu S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(4):408-13. doi: 10.1097/MOL.0000000000000314.
9. Yang Y, Sun Y, Yi W, Li Y, Fan C, Xin Z, et al. A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases. *J Pineal Res*. 2014;57(4):357-66. doi: 10.1111/jpi.12175.
10. Yu L, Liang H, Dong X, Zhao G, Jin Z, Zhai M, et al. Reduced silent information regulator 1 signaling exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic rats and the protective effect of melatonin. *J Pineal Res* 2015;59(3):376-90. doi: 10.1111/jpi.12269.
11. Yu L, Liang H, Lu Z, Zhao G, Zhai M, Yang Y, et al. Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vivo and in vitro studies. *J Pineal Res* 2015;59(4):420-33. doi: 10.1111/jpi.12272.
12. Sahna E, Parlakpinar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res*. 2005;54(5):491-5. PMID: 15641932.
13. Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, et al. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297(4):H1487-93. doi: 10.1152/ajpheart.00163.2009.
14. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J Pineal Res*. 1998;25(3):184-91. PMID: 9745988.
15. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res*. 2013;54(3):245-57. doi: 10.1111/jpi.12010.
16. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res*. 2011;51(1):1-16. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x.
17. Sahna E, Deniz E, Bay-Karabulut A, Burma O. Melatonin protects myocardium from ischemia-reperfusion injury in hypertensive rats: role of myeloperoxidase activity. *Clin Exp Hypertens*. 2008;30(7):673-81. doi: 10.1080/10641960802251966.
18. Yang Y, Duan W, Jin Z, Yi W, Yan J, Zhang S, et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pineal Res*. 2013;55(3):275-86. doi: 10.1111/jpi.12070.
19. Yeung HM, Hung MW, Fung ML. Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury in chronically hypoxic rats. *J Pineal Res*. 2008;45(4):373-82. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00601.x.
20. Kho C, Lee A, Jeong D, Oh JC, Gorski PA, Fish K, et al. Small-molecule activation of SERCA2a SUMOylation for the treatment of heart failure. *Nat Commun*. 2015 Jun 12;6:7229. doi: 10.1038/ncomms8229.
21. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, et al. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*. 2013;128(14):1555-65. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001225.
22. Signore S, Sorrentino A, Ferreira-Martins J, Kannappan R, Shafaie M, Del Ben F, et al. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors and human left ventricular myocytes. *Circulation*. 2013;128(12):1286-97. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002764.
23. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*. 2007;131(3):596-610. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.036.
24. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):448-60. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.024.
25. Skyschally A, Gent S, Amanakis G, Schulte C, Kleinbongard P, Heusch G. Across-species transfer of protection by remote ischemic preconditioning with species-specific myocardial signal transduction by reperfusion injury salvage kinase and survival activating factor enhancement pathways. *Circ Res* 2015;117(3):279-88. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306878.
26. Patino P, Parada E, Farre-Alins V, Molz S, Cacabelos R, Marco-Contelles J, et al. Melatonin protects against oxygen and glucose deprivation by decreasing extracellular glutamate and Nox-derived ROS in rat hippocampal slices. *Neurotoxicology*. 2016 Dec;57:61-8. doi: 10.1016/j.neuro.2016.09.002.
27. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998;38(2):291-300. PMID: 9709390.
28. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35. doi: 10.1056/NEJMr071667.
29. Ravassa S, Zudaire A, Diez J. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):316-23. doi: 10.1093/cvr/cvs123.
30. Borgers M, Thone F, Van Reempts J, Verheyen F. The role of calcium in cellular dysfunction. *Am J Emerg Med*. 1983;1(2):154-61. PMID: 6680615.
31. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, et al. Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(11):1342-51. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.03.015.
32. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205. doi: 10.1038/415198a.
33. Domenech RJ, Sanchez G, Donoso P, Parra V, Macho P. Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca2+ dynamics: a mechanism for preconditioning? *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(12):1429-37. PMID: 14654369.
34. Gomez L, Thiebaut PA, Paillard M, Ducreux S, Abrial M, Crola Da Silva C, et al. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3beta during reperfusion injury. *Cell Death Differ*. 2016;23(2):313-22. doi: 10.1038/cdd.2015.101. Erratum in: *Cell Death Differ*. 2015;22(11):1890.
35. Younce CW, Burmeister MA, Ayala JE. Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(6):C508-18. doi: 10.1152/ajpcell.00248.2012.
36. Sahach VF, Rudyk OV, Vavilova HL, Kotsiuruba AV, Tkachenko IuP. [Melatonin recovers ischemic tolerance and decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of aging rats]. *Fiziol Zh* 2006;52(3):3-14. PMID: 16909751.
37. Giacomo CG, Antonio M. Melatonin in cardiac ischemia/reperfusion-induced mitochondrial adaptive changes. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2007;7(3):163-9. PMID: 17896956.

