

EXPRESSÃO DO RNA-M, DA SERCA2 E DO NCX1 NO PROCESSO DE PROTEÇÃO CELULAR FARMACOLÓGICA NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TAUROCOLATO

The M-RNA, expression of SERCA2 and NCX1 in the process of pharmacological cell protection in experimental acute pancreatitis induced by taurocholate

Enio Rodrigues **VASQUES**¹, José Eduardo Monteiro **CUNHA**¹, Marcia Saldanha **KUBRUSLY**¹, Ana Maria **COELHO**¹, Sandra N. **SANPIETRI**¹, Helena B. **NADER**², Ivarne L.S. **TERSARIOL**², Marcelo A. **LIMA**², Eleazar **CHAIB**¹, Luiz Augusto Carneiro **D'ALBUQUERQUE**¹

Como citar este artigo: Casques ER, Cunha JEM, Kubrusly MS, Coelho AM, Sanpietri SN, Nader HB, Tersariol ILS, Lima MA, Chaib F, D'Albuquerque LAC. Expressão do RNA-M, da SERCA2 e do NCX1 no processo de proteção celular farmacológica na pancreatite aguda experimental induzida por taurocolato. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2018;31(1):e1352. DOI: /10.1590/0102-672020180001e1352

Trabalho realizado no ¹Departamento de Gastroenterologia LIM 37, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; e ²Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

DESCRIPTORIOS - Pancreatite. Citoproteção. Heparina de baixo peso molecular.

Correspondência:

Enio Rodrigues Vasques
E-mail: evasques@globo.com;
enio.vasques@usp.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há.

Recebido para publicação: 21/11/2017
Aceito para publicação: 30/01/2018

HEADINGS - Pancreatitis. Cytoprotection. Heparin, low-molecular-weight.

RESUMO - Racional: A lesão celular da pancreatite aguda (PA) envolve sobrecarga de cálcio, regulada pela atividade da Cálcio ATPase de membrana (PMCA), Cálcio ATPase do Retículo (SERCA2) e pelo Trocador Sódio Cálcio (NCX1). A melatonina (antioxidante) e o Dissacarídeo Trissulfatado (acelerador do NCX1) poderiam reduzir a lesão celular na PA. **Objetivo:** Avaliar a expressão do RNAm da SERCA2 e NCX1 em modelo animal de pancreatite aguda tratados com melatonina e/ou dissacarídeo trissulfatado (DT). **Método:** Ratos Wistar foram divididos em grupos: 1) sem pancreatite aguda; 2) com pancreatite aguda por taurocolato; 3) PA e Melatonina; 4) PA e DT; 5) PA e Melatonina com DT. Amostras de tecido foram colhidas para detecção dos níveis de RNAm da SERCA2 e NCX1 por PCR. **Resultados:** Houve aumento da expressão do RNAm da SERCA2 no grupo com PA tratados com Melatonina, porém sem aumento de expressão do NCX1. O DT não afetou os níveis de SERCA2 e NCX1. O tratamento conjunto com Melatonina e DT diminuiu a expressão da SERCA2. **Conclusões:** O efeito da Melatonina é restrito ao aumento da expressão da SERCA2. O DT não tem ação na expressão gênica, porém sua ação na aceleração do trocador na retirada do cálcio pode explicar a menor expressão da SERCA2 quando associado à Melatonina, pela ação conjunta de drogas com mecanismos diferentes e possivelmente complementares.

ABSTRACT - Background: Intracellular calcium overload is known to be a precipitating factor of pancreatic cell injury in acute pancreatitis (AP). Intracellular calcium homeostasis depends of Plasmatic Membrane Calcium ATPase (PMCA), Sarcoplasmic Endothelial Reticulum Calcium ATPase 2 (SERCA 2) and the Sodium Calcium Exchanger (NCX1). The antioxidant melatonin (Mel) and Trisulfate Disaccharide (TD) that accelerates NCX1 action could reduce the cell damage determined by the AP. **Aim:** To evaluate m-RNA expressions of SERCA2 and NCX1 in acute pancreatitis induced by sodium taurocholate in Wistar rats pre-treated with melatonin and/or TD. **Methods:** Wistar rats were divided in groups: 1) without AP; 2) AP without pre-treatment; 3) AP and Melatonin; 4) AP and TD; 5) AP and Melatonin associated to TD. Pancreatic tissue samples were collected for detection of SERCA2 and NCX1 m-RNA levels by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** Increased m-RNA expression of SERCA2 in the melatonin treated group, without increase of m-RNA expression of the NCX1. The TD did not affect levels of SERCA2 and NCX1 m-RNA expressions. The combined melatonin and TD treatment reduced the m-RNA expression of SERCA2. **Conclusions:** The effect of melatonin is restricted to increased m-RNA expression of SERCA2. Although TD does not affect gene expression, its action in accelerating calcium exchanger function can explain the slightest expression of SERCA2 m-RNA when associated with Melatonin, perhaps by a joint action of drugs with different and but possibly complementary mechanisms.

INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda (PA) constitui processo inflamatório do pâncreas resultante da ativação inapropriada de enzimas pancreáticas que determina repercussões locais e sistêmicas. As células acinares, que correspondem a cerca de 90% do tecido pancreático exócrino, constituem o primeiro sítio a ser comprometido²¹. O cálcio tem papel central na patogênese da PA induzida por fatores precipitantes tais como ceruleína¹⁸, sais biliares²⁰ e ácidos graxos⁴ levando à ativação precoce intracelular dos grânulos de zimogênio, com vacuolização e morte celular¹⁸. A estimulação das células acinares por acetilcolina e colecistoquinina (CCK-8) eleva a concentração de cálcio intracelular de forma fisiológica. Na PA causada pelo ácido taurocólico, há liberação do cálcio intracelular do retículo endoplasmático via inositol 1,4,5 trifosfato, (IP3) e receptores de rianodina (RyR), levando à fusão de grânulos de zimogênio com a membrana plasmática e determinando a excitose de precursores

de enzimas digestivas inativas para o tecido pancreático¹⁰. A exacerbação deste fenômeno com hiperestimulação de células acinares com CCK-8 aumenta os níveis de cálcio no citoplasma, com a ativação intracelular prematura das enzimas digestivas e necrose celular¹⁸. Tal fenômeno também ocorre com sais biliares e metabolitos não oxidativos do etanol^{5,6}. Existe, também, comprometimento mitocondrial, uma vez que a mitocôndria também atua como tampão de cálcio. O aumento dos níveis de cálcio mitocondrial leva à disfunção da organela, com menor produção de ATP e prejuízo da ação das bombas de cálcio dependentes de ATP, contribuindo para a sobrecarga intracelular do íon¹⁷ que, quando mantida, leva à apoptose celular. A suplementação de ATP intracelular diminui esta elevação do Ca intracelular com consequente redução da necrose, como observado em modelos de pancreatite por metabolitos não oxidativos do etanol⁶. A manutenção dos níveis citosólicos de cálcio pela ação da Cálcio ATPase de membrana (PMCA) é complementada com a participação conjunta da Cálcio ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA2) por recaptação do cálcio para o retículo, e do Trocador Sódio Cálcio (NCX1) pela retirada do cálcio do citoplasma para o meio extracelular. Na PA observou-se menor expressão da SERCA2 e do NCX1, associada à sobrecarga de cálcio¹³.

Como a homeostase do cálcio intracelular relaciona-se com apoptose celular na presença de sobrecarga de cálcio, fármacos com atuação sobre o cálcio poderiam ser uma estratégia para minimizar a lesão acinar pancreática, tendo como alvo o trocador sódio-cálcio. Em transplante de ilhotas de Langherans, em camundongos o bloqueio do modo reverso do trocador por um bloqueador específico do trocador sódio-cálcio, permite o fluxo de cálcio para o intracelular e determina proteção das ilhotas transplantadas¹⁵.

O trocador sódio-cálcio é uma proteína transportadora que contribui na homeostase do cálcio intracelular em vários tipos celulares, tendo já sido identificada no coração, rim, aorta, cérebro, fígado e pâncreas¹³. Ele pode atuar bidirecionalmente, com saída de um íon cálcio concomitantemente à entrada de três íons sódio ou, quando no modo reverso, com a saída de um íon sódio concomitantemente à entrada de um íon cálcio, através de um processo eletrogênico⁷. No decorrer do processo ocorre inativação do trocador com queda na atividade de troca até que seja atingido estado de equilíbrio por ocasião do aumento da concentração de sódio intracelular. Este processo é chamado regulação ou inativação intracelular dependente de sódio, sendo mediado por região endógena do trocador denominada XIP (peptídeo inibidor de troca), formada por aminoácidos localizados na porção N-terminal do trocador¹⁹. Estudos da ação de fragmentos de heparina de baixo peso molecular em aorta de coelho identificaram o sítio de ligação destes fragmentos com o trocador sódio-cálcio no XIP, que determina a saída do cálcio intracelular. Nesta situação, a inibição do XIP por fragmentos de heparina, como o dissacarídeo trissulfatado (DT), favorece a ação do trocador sódio-cálcio na retirada do cálcio citoplasmático em situação de sobrecarga do íon¹⁹.

Em estudos anteriores demonstrou-se, em modelo experimental de isquemia e reperfusão hepática, a ação hepatoprotetora do DT com diminuição de ALT e AST e redução da necrose celular⁹, bem como a sua ação *in vitro* sobre a mobilização do cálcio intracelular para o extracelular em situações de sobrecarga de cálcio em hepatócitos⁹. O DT utilizado nesta pesquisa foi o fragmento de heparina, ainda sem formulação comercial ou aprovação para uso humano, e aprovado para utilização experimental¹⁶, neste projeto. Por outro lado, alguns estudos demonstram que a melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal e pelo trato gastrointestinal e possuidora de ação antioxidante, tem efeito benéfico em modelos experimentais de PA^{11,12}.

Assim, a melatonina, por sua ação antioxidante e protetora celular³ e o DT, por sua ação na aceleração da remoção do cálcio

intracitoplasmático através do NCX1¹⁹, poderiam modificar a lesão celular da PA, quando usados isoladamente ou em associação, com um possível efeito potencializador.

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do RNA-m da SERCA2 e do NCX1 em modelo experimental de PA por taurocolato em ratos pré-tratados com melatonina e dissacarídeo trissulfatado, isoladamente e em associação.

MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica (LIM/37) da Disciplina de Transplante e Cirurgia de Fígado do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Animais de experimentação

A utilização dos animais foi autorizada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o protocolo de Pesquisa nº 134/14. Foram utilizados 25 *Rattus Albinus* machos da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada entre 20-22° C, alimentados com Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes LTDA) e hidratados com água filtrada *ad libitum*.

Indução de pancreatite aguda

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 50 mg/kg de cloridrato de Ketamina 5% (Ketalar R, Cristália) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (Rompum R, Bayer) e aquecidos com lâmpada halógena de 45 W e 127 V. A temperatura corpórea foi monitorada por termômetro retal digital (YSI Precision 4000A Thermometer, USA) e mantida entre 35-37° C. PA foi induzida nos ratos anestesiados por infusão intraductal retrógrada de 0,5 ml de taurocolato de sódio a 3% no ducto pancreático, durante 1 min com bomba de infusão (KD Scientific, Holliston, MA) com fluxo contínuo e com clameamento da porção proximal do ducto hepático durante o período de infusão. Os ratos foram mantidos em ambiente com controle de temperatura entre 22-24° C, aguardando-se um período de 2 h após a indução da PA para a coleta dos materiais biológicos.

Os animais foram divididos em cinco grupos: 1) Grupo Controle (n=5): animais submetidos à manipulação cirúrgica das vísceras abdominais sem indução de PA; 2) Grupo PA (n=5): animais submetidos à PA, sem pré-tratamento; 3) Grupo PA + Mel (n=5): animais tratados com 50 mg/kg de melatonina, por via intraperitoneal, 30 min antes da indução da PA; 4) Grupo PA + DT (n=5): animais tratados com 0,2 mg/kg de DT (0,4 ml injetados na veia peniana) 10 min antes da indução da PA; 5) Grupo PA + Mel + DT (n=5): animais submetidos à PA com prévia administração EV de 2 ml/kg de DT (0,4 ml injetados na veia peniana) e infusão IP de 50 mg/kg de melatonina, 10 e 30 min, respectivamente, antes da indução da PA.

Coleta de material para análises

Duas horas após a indução da PA os animais foram anestesiados (40 mg/kg de Ketamina 5%) para coleta de amostras do tecido pancreático que foram mantidas congeladas a -80° C até o momento da extração do RNA. Após o sacrifício, o descarte dos animais foi feito em sacos plásticos próprios para a função e incinerados conforme as normas da instituição.

Avaliação da expressão gênica de NCX1 e SERCA2

O RNA total das amostras de tecido pancreático congeladas foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen Life

Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA total extraído foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop -1000 e a avaliação da integridade do RNA total extraído em gel de agarose 1%. Após quantificação e eletroforese, somente as amostras de RNA total com razão 260/280 nm=1,8 e com a visualização das bandas características 28S e 18S foram consideradas viáveis. O desenho dos oligonucleotídeos para a realização das reações de qRT-PCR foi feito com o programa Primer3 <http://primer3.ut.ee>. As seqüências dos oligonucleotídeos foram assim determinadas:

NCX1 (forward): CACCTGTGGAGAGCTGGAAT
 NCX1 (reverse): AGACGGGGTTCTCCAATCTC
 SERCA2 (forward): TCGAAGAAGGTGAAGAAACGA
 SERCA2 (reverse): CTTGCCCATTTTCAGGTTTCAT
 beta ACTINA (forward): TGTACCAACTGGGACGATA
 beta ACTINA (reverse): GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

A análise da expressão dos níveis de RNAm dos genes NCX1 e SERCA2 foi realizada no termociclador Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Australia). Foi utilizado o kit comercial SuperScript III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Life Technologies), que corresponde à reação realizada em uma única etapa, onde a síntese do cDNA é feita a partir do RNA total da amostra. Para isso, utilizou-se em volume final de 15 µl: 0,3 µl de Enzima, 7,5 µl de tampão, 0,3 µl de oligonucleotídeo forward, 0,3 µl de oligonucleotídeo reverse, 1,6 µl de água ultrapura estéril livre de DNase/RNase e 5 µl de RNA total (20 ng). Todas as amostras foram feitas em duplicata. Como controle interno das reações de qRT-PCR utilizou-se o gene de referência (endógeno) beta-ACTINA, a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes-alvo.

Para o cálculo do nível de expressão de cada gene alvo, utilizou-se o método 2-delta delta Ct para a quantificação relativa¹⁴, onde Ct (threshold cycle) é o ciclo da PCR em tempo real, no qual a amplificação atinge a fase logarítmica, onde delta Ct é a diferença de expressão entre gene alvo e controle endógeno de uma determinada amostra e delta delta Ct corresponde à diferença entre o delta Ct da amostra e o delta Ct do controle.

Análise estatística:

Variáveis quantitativas com médias e desvio-padrão foram avaliadas pelo teste de análise de variância. O programa utilizado para a análise estatística foi o Graph Pad Prism versão 6.0 e o nível de significância adotado para p < 0,05.

RESULTADOS

As expressões da SERCA2 e do NCX1 diminuíram significativamente no grupo PA quando comparado ao grupo controle (Tabela 1).

TABELA 1 - Expressões da SERCA2 e do NCX1 no grupo PA em relação ao grupo controle

Controle	SERCA2	NCX1	PA	SERCA2	NCX1
1	1,77	1,55	1	0,12	0,33
2	1,57	1,32	2	0,34	1,2
3	1,5	1,44	3	0,23	0,18
4	1,46	1,04	4	0,14	0,34
5	1,23	1,84	5	0,12	0,15
MÉDIA	1,506	1,438	MÉDIA	0,19	0,44
DP	0,195	0,294	DP	0,095	0,433

PA=pancreatite aguda; SERCA2=p< 0,008; NCX1=p<0,01

Não houve alteração significativa nas expressões da SERCA2 e do NCX1 nos ratos do Grupo PA + DT quando comparado com o grupo PA (Tabela 2).

TABELA 2 - Expressões da SERCA2 e do NCX1 no Grupo PA + DT em relação ao grupo PA

PA	SERCA 2	NCX1	PA+DT	SERCA 2	NCX1
1	0,12	0,33	1	0,17	0,2
2	0,34	1,2	2	0,13	0,2
3	0,23	0,18	3	0,15	0,3
4	0,14	0,34	4	0,12	0,13
5	0,12	0,15	5	0,12	0,43
MÉDIA	0,19	0,44	MÉDIA	0,138	0,252
DP	0,095	0,433	DP	0,022	0,116

PA=pancreatite aguda; PA + DT=pancreatite aguda + dissacarídeo trissulfatado; SERCA2=p<0,59; NCX1=p<0,60

No Grupo PA + Mel houve aumento da expressão da SERCA2 e sem alteração da expressão do NCX1 quando comparado ao grupo PA (Tabela 3).

TABELA 3 - Expressões da SERCA2 e do NCX1 no Grupo PA + Mel em relação ao grupo PA

PA	SERCA 2	NCX1	PA+Mel	SERCA 2	NCX1
1	0,12	0,33	1	0,45	0,2
2	0,34	1,2	2	0,43	0,19
3	0,23	0,18	3	0,34	0,15
4	0,14	0,34	4	0,63	0,31
5	0,12	0,15	5	0,26	0,27
MÉDIA	0,19	0,44	MÉDIA	0,422	0,224
DP	0,095	0,433	DP	0,139	0,065

PA=pancreatite aguda; PA + Mel=pancreatite aguda + melatonina; SERCA2=p<0,02; NCX1=p<0,40

No Grupo PA + Mel + DT não houve alteração significativa da expressão da SERCA2, ocorrendo redução significativa da expressão do NCX1, quando comparado ao grupo PA (Tabela 4).

TABELA 4 - Expressões da SERCA2 e do NCX1 no grupo PA + Mel + DT em relação ao grupo PA

PA	SERCA 2	NCX1	PA+Mel+DT	SERCA 2	NCX1
1	0,12	0,33	1	0,17	0,07
2	0,34	1,2	2	0,15	0,1
3	0,23	0,18	3	0,32	0,13
4	0,14	0,34	4	0,21	0,29
5	0,12	0,15	5	0,31	0,2
MÉDIA	0,19	0,44	MÉDIA	0,232	0,158
DP	0,095	0,433	DP	0,079	0,088

PA=pancreatite aguda; PA + Mel + DT=pancreatite aguda + melatonina + dissacarídeo trissulfatado; SERCA2=p<0,34; NCX1=p<0,07

No grupo PA + Mel + DT houve diminuição significativa da expressão da SERCA2 em relação à expressão do NCX1 quando comparado ao grupo PA + Mel (Tabela 5)

TABELA 5 - Expressões da SERCA2 e do NCX1 no Grupo PA + Mel + DT em relação ao Grupo PA + Mel

PA+Mel	SERCA 2	NCX1	PA+Mel+DT	SERCA 2	NCX1
1	0,45	0,2	1	0,17	0,07
2	0,43	0,19	2	0,15	0,1
3	0,34	0,15	3	0,32	0,13
4	0,63	0,31	4	0,21	0,29
5	0,26	0,27	5	0,31	0,2
MÉDIA	0,422	0,224	MÉDIA	0,232	0,158
DP	0,139	0,065	DP	0,079	0,088

PA + Mel=pancreatite aguda + melatonina; PA + Mel + DT=pancreatite aguda + melatonina + dissacarídeo trissulfatado; SERCA2=p<0,03;NCX1=ns

Nos animais do Grupo PA + Mel houve aumento significativo da expressão da SERCA2 quando comparado ao grupo PA + DT. Não houve diferença da alteração na expressão do NCX1 entre os dois grupos (Tabela 6).

TABELA 6 - Expressões da SERCA2 e do NCX1 no Grupo PA + Mel em relação ao Grupo PA + DT. PA + DT

PA+DT	SERCA 2	NCX1	PA+Mel	SERCA 2	NCX1
1	0,17	0,2	1	0,45	0,2
2	0,13	0,2	2	0,43	0,19
3	0,15	0,3	3	0,34	0,15
4	0,12	0,13	4	0,63	0,31
5	0,12	0,43	5	0,26	0,27
MÉDIA	0,138	0,252	MÉDIA	0,422	0,224
DP	0,022	0,116	DP	0,139	0,065

PA+DT=pancreatite aguda + dissacarídeo trisulfatado; PA + Mel=pancreatite aguda + melatonina;SERCA2=p<0,01; NCX1=ns

DISCUSSÃO

Sendo a sobrecarga de cálcio um dos possíveis fatores envolvidos na lesão tecidual da PA, a estratégia de modular este elemento por meio de fármacos pode ser benéfica na redução do processo inflamatório da doença. Por outro lado, drogas com mecanismos diferentes de ação podem, eventualmente, agir de forma sinérgica neste sentido. Assim, o DT, droga atuante na remoção do cálcio intracelular⁹ e a Melatonina, um agente antioxidante¹³, poderiam agir sinérgicamente nesta situação. O presente estudo teve como objetivo estudar este possível sinergismo, visando uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na lesão celular em um modelo de pancreatite aguda experimental.

Considerando a participação conjunta da SERCA2 e do NCX1 na cinética do cálcio e a conhecida redução de suas expressões na PA associada à sobrecarga de cálcio¹³, neste estudo foram analisadas as expressões do RNA-m da SERCA2 e do NCX1 em animais submetidos à PA por taurocolato de Na sem e com pré-tratamento com melatonina e DT, isoladamente e em associação. Como em estudos anteriores, observou-se que a indução de PA determina acentuada redução das expressões da SERCA2 e do NCX1¹³. A reversão desta queda, inclusive com aumento da expressão do RNA-m da SERCA2 no grupo com PA tratado com melatonina, embora sem aumento de expressão do NCX1, sugere ação farmacogênica benéfica da melatonina. Entretanto, o aumento das expressões da SERCA2 e do NCX1 não foi observado nos animais tratados com DT isoladamente ou associado à melatonina. Pelo contrário, quando associado à melatonina o DT determinou diminuição da expressão da SERCA2 quando comparado ao tratamento isolado com melatonina.

Este resultado provavelmente decorre do aumento da saída do cálcio intracelular por ação do DT sobre o NCX1, acelerando a sua função em situações de sobrecarga do íon. Consequentemente, a ausência do aumento de expressão da SERCA2 seria devida ao balanço de ações entre o NCX1 e a SERCA2, com aumento de função do NCX1 existente com redução da necessidade de ação da SERCA2 na recaptção do cálcio para o retículo. Esta possibilidade sugere a existência de dois mecanismos envolvidos no processo: o aumento da expressão gênica da SERCA2, causada pela melatonina, sem atuação no NCX1, e a atuação do DT sobre a função das estruturas celulares remanescentes após a lesão celular da PA, aumentando a atividade do NCX1, mas sem uma ação farmacogênica sobre as estruturas envolvidas.

A manutenção da viabilidade das estruturas celulares e de suas respectivas funções pela ação anti-oxidante da Melatonina poderia facilitar a ação conjunta de outras substâncias, com diferentes mecanismos de ação, na preservação do tecido pancreático lesado na PA. Considerando as importantes observações da presente investigação, outros estudos se fazem necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas ações das diversas drogas nesta situação

CONCLUSÃO

O efeito da melatonina é restrito ao aumento da expressão da SERCA2. O DT não tem ação na expressão gênica; porém,

sua ação na aceleração do trocador na retirada do cálcio pode explicar a menor expressão da SERCA2 quando associado à melatonina, pela ação conjunta de drogas com mecanismos diferentes e possivelmente complementares.

REFERÊNCIAS

- Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002; 47:2336e48.
- Bubenik GA, Hacker RR, Brown GM, Bartos L. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 1999; 29:56e63.
- ColC, DinlerK, HasdemirO, BuyukasikO, BugdayciG. Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9:78 e 82
- Criddle DN, Murphy J, Fistetto G, Barrow S, Tepikin AV, Neoptolemos JP, Sutton R, and Petersen OH. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology* 2006; 130:781-93
- Criddle DN, Raraty MG, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, and Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:10738-43
- Criddle DN, Sutton R, Petersen OH. Role of Ca²⁺ in pancreatic cell death induced by alcohol metabolites. *J Gastroenterology*. 2006; 130:781-93
- D.M. Bers. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415:198-205.
- Ênio R. Vasques, José Eduardo M. Cunha, Ana Maria M. Coelho, Emilio E. Abdo, Sandra N. Sanpietre, Helena B. Nader, Ivarne S. Tersariol, Eleazar Chaib, Luiz Augusto C. D'Albuquerque. Heparin Frag-ments in Liver Injury secondary to Liver Ischemia/Reperfusion(I/R). *Gastroenterology* 2014; 146: S-1072.
- Vasques ER, Cunha JE, Coelho AM, Sanpietre SN, Patzina RA, Abdo EE, Nader HB, Tersariol IL, Lima MA, Godoy CM, Rodrigues T, Chaib E, D'Albuquerque LA. Trisulfate Disaccharide Decreases Calcium Overload and Protects Liver Injury Secondary to Liver Ischemia/Reperfusion PLoS One 2016 ;11:e0149630
- Fernandez NA, Liang T, Gaisano HY. Live pancreatic acinar imaging of exocytosis using syncollin-pHluorin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300:C1513-23.
- Jaworek J, Bonjo J, Leja-Szps A, Nawrot K, Tomaszewska MR, Stachura J, et al. Sensory nerves in central and peripheral control of pancreatic integrity by leptin and melatonin. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53:51 e74.
- Jaworek J, Leja-Szps A, Bonjo J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, et al. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein over stimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003; 34:40 e 52.
- Huai J, Shao Y, Sun X, Jin Y, Wu J, Huang Z. Melatonin ameliorates acute necrotizing pancreatitis by the regulation of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *Pancreatology* 2012; 12:257-63
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of donor islets with the Na (+) /Ca (2+) exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant*. 2013; 13:2154-60
- Nader HB, Porcionatto MA, Tersariol IL, Pinhal MA, Oliveira FW, Moraes CT, Dietrich CP. Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. Analyses of the heparin and heparan sulfate degradation products by ¹³C NMR spectroscopy. *J Biol Chem*. 1990;265:16807-13.
- Petersen OH, Sutton R, Criddle DN. Failure of calcium microdomain generation and pathological consequences. *Cell Calcium*. 2006; 40:593-600
- QiW, TanDX, ReiterRJ, KimSJ, ManchesterLC, CabreraJ, et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in cerulein induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1999; 44:2257e62.
- Shinjo SK, Tersariol IL, Oliveira V, Nakaie CR, Oshiro ME, Ferreira AT, Santos IA, Dietrich CP, Nader HB. Heparin and heparan sulfate disaccharides bind to the exchanger inhibitor peptide region of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and reduce the cytosolic calcium of smooth muscle cell lines. Requirement of C4-C5 unsaturation and 1--> 4 glycosidic linkage for activity. *J Biol Chem*. 2002;277:48227-33.
- Voronina S, Longbottom R, Sutton R, Petersen OH, Tepikin A. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. *J Physiol* 2002; 540:49-55
- Ward JB, Petersen OH, Jenkins SA, and Sutton R. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionized calcium the trigger for acute pancreatitis? *Lancet*. 1995; 346:1016-9