

O Pré-Condicionamento com Dexmedetomidina Reduz a Lesão de Isquemia-Reperfusão do Miocárdio em Ratos, Inibindo a Via PERK

Dexmedetomidine Preconditioning Reduces Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Inhibiting the PERK Pathway

Yujiao Chen,^{1,2} Song Cao,¹ Hui Chen,¹ CunZhi Yin,¹ XinPeng Xu,¹ ZaiQun Yang¹

Zunyi Medical University,¹ Zunyi, Guizhou – China

Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College,² NanChong, SiChuan - China

Resumo

Fundamento: A cardiopatia isquêmica atraiu muito atenção devido às altas taxas de mortalidade, custos do tratamento e a crescente morbidade na população jovem. Estratégias de reperfusão reduziram a mortalidade. Porém, a reperfusão pode levar à morte do cardiomiócito e subsequente dano irreversível ao miocárdio. No momento, não há um tratamento eficiente e direcionado para a lesão de isquemia-reperfusão (I/R).

Objetivos: Avaliar se a dexmedetomidina (DEX) tem efeito protetivo na I/R do miocárdio e explorar os possíveis mecanismos por trás dela.

Métodos: Corações de ratos foram perfundidos com o sistema de perfusão de Langendorff e aleatoriamente distribuídos em cinco grupos: grupo controle, perfundido com solução de Krebs-Henseleit (K-H) por 205 minutos sem isquemia; e quatro grupos de teste que foram submetidos a 40 minutos de isquemia global e 120 minutos de reperfusão. O Grupo DEX, o grupo ioimbina (IO) e o grupo DEX + IO foram perfundidos com DEX (10 nM), IO (1 μM) ou a combinação de DEX e IO antes da reperfusão, respectivamente. A hemodinâmica cardíaca, o tamanho do infarto do miocárdio e a histologia do miocárdio foram avaliados. A expressão da proteína-78 regulada pela glicose (GRP78), a proteína quinase do retículo endoplasmático (PERK), a PERK fosforilada, o fator de iniciação eucariótico 2α (eIF2α), eIF2α fosforilado, o fator de transcrição 4 (TCF-4) e a proteína homóloga à proteína ligadora do acentuador CCAAT (CHOP) foram avaliados. $P < 0,05$ foi considerado para indicar a diferença estatisticamente significativa.

Resultados: O pré-condicionamento com DEX melhorou a função cardíaca nos corações com I/R, reduziu o infarto do miocárdio, a apoptose do miocárdio e a expressão de GRP78, p-PERK, eIF2α, p-eIF2α, TCF-4 e CHOP.

Conclusões: O pré-tratamento com DEX reduziu a lesão de I/R no miocárdio ao suprimir a apoptose, o que foi induzido pela via PERK.

Palavras-chave: Dexmedetomidina, cardiopatia Isquêmica/mortalidade, Reperfusão Miocárdica, Pre-Condicionamento, Hipnóticos e Sedativos, Proteínas Quinases, Ratos

Abstract

Background: Ischemic heart disease has attracted much attention due to its high mortality rates, treatment costs and the increasing morbidity in the young population. Strategies for reperfusion have reduced mortality. However, reperfusion can lead to cardiomyocyte death and subsequent irreversible myocardial damage. At present, the timely and targeted treatment of ischemia-reperfusion (I/R) injury is often lacking.

Objectives: To evaluate if dexmedetomidine (DEX) has a protective effect in myocardial I/R and explore the possible mechanism behind it.

Methods: Rat hearts were perfused with a Langendorff perfusion system, and randomly assigned to five groups: control group, perfused with Krebs-Henseleit (K-H) solution for 205 minutes without ischemia; and four test groups that underwent 40 minutes of global ischemia and 120 min of reperfusion. The DEX group, the yohimbine (YOH) group and the DEX + YOH group were perfused with DEX (10 nM), YOH (1 μM) or the combination of DEX and YOH prior to reperfusion, respectively. Cardiac hemodynamics, myocardial infarct size, and myocardial histology were evaluated. The expression of glucose-related protein 78 (GRP78), protein kinase R-like ER kinase (PERK), phosphorylated PERK, eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α), phosphorylated eIF2α, activating transcription factor 4 (ATF4), and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) were assessed. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results: DEX preconditioning improved the cardiac function of I/R hearts, reduced myocardial infarction, myocardial apoptosis, and the expression of GRP78, p-PERK, eIF2α, p-eIF2α, ATF4 and CHOP.

Conclusions: DEX pretreatment reduced myocardial I/R injury by suppressing apoptosis, which was induced by the PERK pathway.

Keywords: Dexmedetomidine; Ischemic Cardiomyopathy/mortality; Myocardial Reperfusion; Hipnóticos and Sedatives; Protein Kinases; Rats.

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

Correspondência: Hui Chen •

Zunyi Medical College Affiliated Hospital - 149 Dalian road, Zunyi, Guizhou Zunyi 563003 – China

E-mail: 2267390140@qq.com

Artigo recebido em 12/07/2020, revisado em 27/10/2020, aceito em 27/01/2021

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20200672>

Introdução

A cardiopatia isquêmica tem atraído muita atenção devido às suas altas taxas de mortalidade, custos do tratamento e a crescente morbidade na população jovem. Nas últimas três décadas, estratégias de reperfusão para aliviar a lesão isquêmica têm sido incluídas na prática clínica. Porém, a reperfusão pode levar à morte do cardiomiócito e subsequente dano irreversível ao miocárdio.¹

A lesão de isquemia-reperfusão do miocárdio é um processo fisiopatológico de longo prazo e complexo. O processo de restabelecer o fluxo sanguíneo ao miocárdio isquêmico pode levar a uma grande variedade de mudanças biológicas básicas, incluindo deficiência na homeostase iônica, ruptura de radicais de oxigênio, autofagia, disfunções metabólicas do trifosfato do ATP, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose.² Estudos recentes demonstraram que o dano causado ao miocárdio envolve dois processos: lesão de isquemia-repercussão (I/R). A lesão de I/R é um grande determinante da mortalidade de longo prazo; por isso, a possibilidade de aliviar a extensão da lesão tem grande valor individual e socioeconômico.³⁻⁷

Foi demonstrado que a apoptose do cardiomiócito é um importante mecanismo da lesão de I/R do miocárdio.⁸ A apoptose é acionada pelo receptor mitocondrial e da morte nas condições da reperfusão miocárdica.⁹ Porém, esses mecanismos ainda precisam ser determinados.² Estudos recentes exploraram a associação entre o retículo endoplasmático (RE) e a lesão de I/R do miocárdio.⁹⁻¹¹ Condições de estresse, como I/R, hipóxia e estresse oxidativo foram identificados na desregulação das funções do RE, levando ao estresse do RE.¹² As consequências patológicas da ruptura do lúmen do RE e da falta de comunicação foram implicadas na lesão de I/R do miocárdio.^{13,14} Porém, não está claro se o estresse do RE induz a apoptose ao ativar a PERK durante a lesão de reperfusão do miocárdio.¹⁵

No momento, devido à falta de medicamentos específicos e terapias padronizadas, não há tratamento preciso e direcionado para a lesão de I/R. A dexmedetomidina (DEX) é agonista do receptor α_2 adrenérgico (RA), e tem impacto limitado na hemodinâmica e na respiração; por isso, promove a sedação e analgesia ideais para pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular.¹⁶ Estudos anteriores demonstraram que o pré-condicionamento com DEX trouxe efeitos cardioprotetores em corações isquêmicos.¹⁷⁻²⁰ Porém, o mecanismo molecular da proteção da DEX, até hoje, é desconhecido. Este estudo avaliou a hipótese de que o pré-tratamento com DEX protege o coração da lesão de I/R por meio da ativação da PERK, o que depende da ativação do receptor α_2 . Assim, este estudo usou um modelo de coração isolado com I/R para avaliar os efeitos da DEX na lesão de I/R e seu potencial mecanismo.

Métodos

Experimento com animais

Ratos machos e adultos da linhagem Sprague-Dawley (8 a 10 semanas de idade; 260-280g) foram obtidos no centro de experimento com animais de Changsha (Changsha, China).

Todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com o "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório", publicado na China (n. 1492, 2001), e foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Zunyi Medical University. Todos os ratos foram acomodados em condições padrão (temperatura ambiente, 22°C, ciclo claro/escuro de 12 horas), com acesso livre à comida e à água, no laboratório Guizhou Key Laboratory of Anesthesiology and Organ Protection, da Zunyi Medical University.

Isolamento dos corações dos ratos adultos

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/kg, via intraperitoneal). Depois do sucesso da anestesia, o coração foi imediatamente retirado do peito por meio da esternotomia e imerso em solução gelada de Krebs-Henseleit (K-H) (NaCl, 119 mM; KCl, 6,0 mM; CaCl₂, 1,24 mM; NaHCO₃, 20,1 mM; KH₂PO₄, 1,24 mM; MgSO₄, 1,24 mM; glicose, 11,2 mM). O coração foi perfundido de modo retrógrado usando o método de Langendorff pela aorta (PanLab). A solução de K-H foi perfundida sob constante pressão de perfusão de 75-80 mmHg, e balanceada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, com pH de 7,35-7,45 a 37°C. Um balão de látex conectado a um transdutor de pressão foi inserido no ventrículo esquerdo por meio da válvula mitral, e preenchido com soro fisiológico para produzir pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) de 2-10 mmHg. O volume do balão foi mantido constante durante o experimento. A frequência cardíaca (FR), a PDFVE, a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) (PDVE = pressão sistólica no ventrículo esquerdo (PSVE) – PDFVE), a pressão ventricular esquerda máxima de mudanças positivas e negativas ($\pm dp/dt_{max}$) e o produto de taxa de pressão (PTP = FC x PDVE) foram registrados pelo sistema Lab Chart.

I/R e pré-condicionamento com DEX em corações isolados de ratos

Para cada teste, após balancear a perfusão por 15 minutos, os corações cuja PDVE de base e FC eram >50mmHg e >200 batidas/min foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos, em envelopes lacrados. As amostras em todos os grupos foram perfundidas por 30 minutos antes dos 40 minutos de isquemia global normotérmica, seguido de 120 minutos de reperfusão, exceto no grupo controle (n=6): (i) grupo controle, sem protocolos de pré-condicionamento, perfundidos com solução de K-H normal; (ii) grupo de I/R, sem protocolos de pré-condicionamento, perfundidos com solução de K-H normal antes da isquemia; (iii) grupo DEX, pré-condicionado com 10 nM de DEX antes da isquemia; (iv) grupo ioimbina (IO), pré-condicionado com 1 μ M IO antes da isquemia; e (v) grupo DEX + IO, pré-condicionado com 10 nM DEX + 1 μ M IO antes da isquemia. As concentrações de DEX (Hengrui pharmaceutical) e do antagonista foram selecionadas com base em estudos anteriores. A ioimbina (IO) foi usada como antagonista do receptor α_2 adrenérgico. DEX e IO foram dissolvidas em solução modificada de Krebs-Ringer (Figura 1).

Determinação do tamanho do infarto

O tamanho do infarto foi avaliado com a coloração do cloreto de trifêniltetrazólio (TTC). Depois da reperfusão, os tecidos que aderiram à raiz arterial foram removidos, e todo

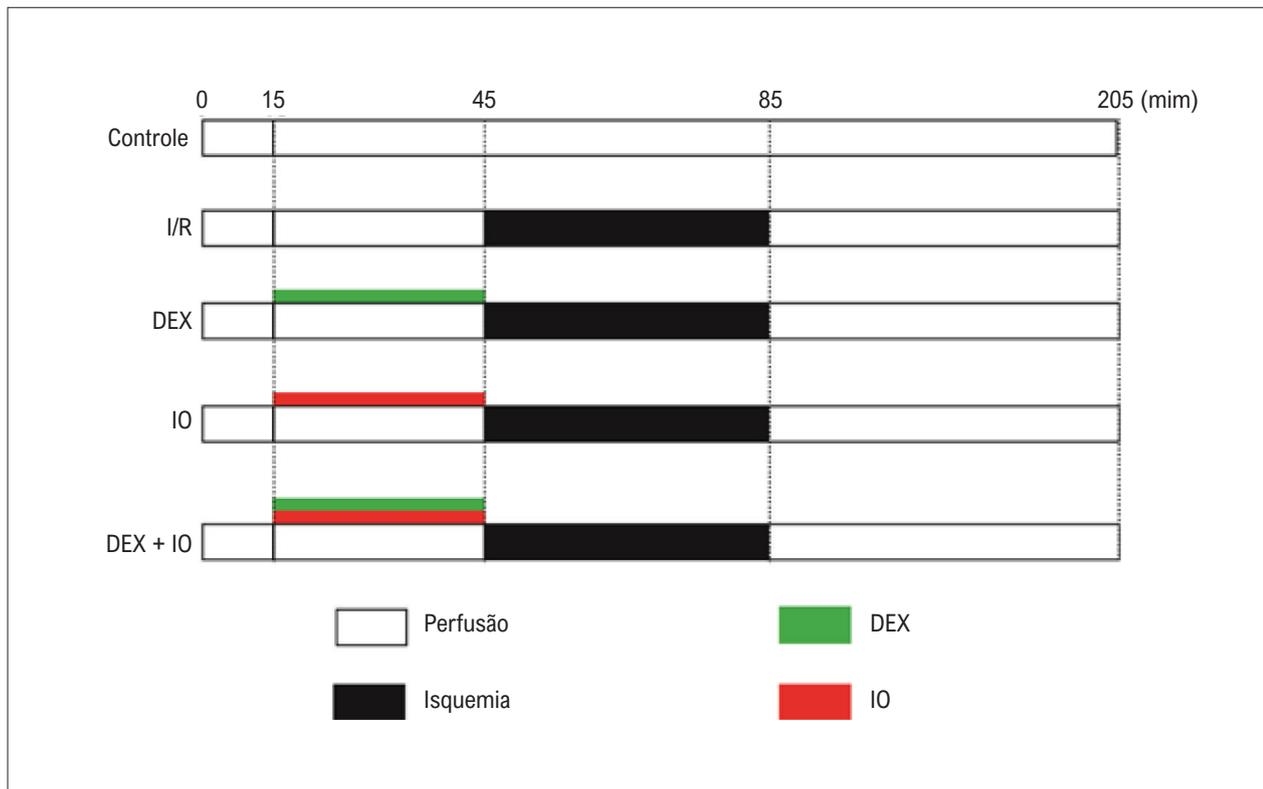


Figura 1 – Modelo de Langendorff da lesão de isquemia-reperfusão do miocárdio. Para cada teste, após 15 minutos de balanceamento da perfusão, os corações preparados foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos para igualar a PDVE e a FC, que estavam a menos de 50 mmHg e 200 batidas/min. As amostras no grupo controle eram continuamente perfundidas com solução de K-H por 205 minutos. As amostras nos outros quatro grupos foram perfundidas por 30 minutos antes dos 40 minutos da isquemia global normotérmica, seguidos de 120 minutos de reperfusão. As amostras no grupo I/R não tiveram protocolo de pré-condicionamento e foram perfundidas com solução normal de K-H antes da isquemia; as amostras no grupo DEX foram perfundidas com DEX (10 nM) antes da isquemia; as amostras no grupo IO foram perfundidas com IO (1 µM) antes da isquemia; as amostras do grupo DEX + IO foram perfundidas com DEX (10 nM)+IO (1 µM) antes da isquemia. PDVE: pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo, FC: frequência cardíaca, K-H: Krebs-Henseleit, I/R: isquemia-reperfusão, DEX: dexmedetomidina, IO: ioimbina

o coração foi congelado. O coração congelado foi cortado em fatias de 1-2 mm. As fatias foram imersas em um frasco com 1% de TTC e incubadas em banho-maria por 30 minutos, a 37°C. O frasco era continuamente agitado para obter a coloração equilibrada. Então, as fatias foram colocadas em formaldeído 10% por 24 horas, transferidas para uma placa de vidro e uma tampa de vidro foi colocada sobre as fatias. Calços de 2 mm foram colocados nas laterais, entre os vidros, para obter a grossura da fatia, e foram tiradas fotografias digitais. As áreas do infarto e as áreas normais foram determinadas de forma cega, por meio da planimetria, com o software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.), e o tamanho do infarto foi demonstrado como um percentual da área total.

Exame histopatológico

Os tecidos do miocárdio coletados dos ratos foram cortados em seções de 1 cm, fixados em paraformaldeído 4% e embebidos em parafina. Para quantificar a extensão do dano ao miocárdio, as biópsias foram recortadas em seções de 5 µm, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) por 90 minutos, em temperatura ambiente, e seis campos de visão (ampliação, x200) foram selecionados aleatoriamente para avaliação em cada grupo.

Método TUNEL

O método de marcação de terminações dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL) foi realizado para determinar a extensão da apoptose no miocárdio utilizando um kit comercializado (Baiao Cisco Biological Technology), de acordo com as instruções do fabricante. A marcação nuclear verde foi definida para células TUNEL positivas. Para determinar a extensão da apoptose do miocárdio, cinco campos (ampliação, x200) foram selecionados aleatoriamente de duas seções em cada grupo, e o índice apoptótico (IA) foi calculado por meio do software Image-Pro Plus 6.0 (AI): número de células apoptóticas / número total de células contadas.

Western blot

O coração foi homogeneizado e lisado com uma solução tampão RIPA (Thermo Fisher scientific, Inc). Os tecidos foram centrifugados a 125 x g por seis minutos, e o sobrenadante foi coletado. A concentração da proteína foi determinada pelo método BCA (Thermo Fisher scientific, Inc.). As amostras foram separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio 10% e transferidas para membranas

de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado por duas horas. As membranas foram analisadas com os anticorpos primários anti-GRP78 (1:1000; cat n. PA1-014A; Thermo Fisher scientific), anti-PERK (1:1000; cat n. PA5-79193; Thermo Fisher scientific), anti-p-PERK (1:1000; cat n. MA5-15033; Thermo Fisher scientific), anti-eIF2 α (1:1000; cat n. MA1-079; Thermo Fisher scientific), anti-p-eIF2 α (1:1000; cat n. 44-728G; Thermo Fisher scientific), anti-TCF-4 (1:1000; cat n. PA5-68802; Thermo Fisher scientific), anti-CHOP (1:1000; cat n. PA5-86145; Thermo Fisher scientific), anti-GAPDH (1:1000; cat n. MA5-32539; Thermo Fisher scientific) a 4°C durante a noite. Depois de lavar as membranas três vezes, as amostras foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (1:1000; cat n. G-21234; Thermo Fisher scientific) por duas horas. O conteúdo da proteína foi determinado pelo sistema de imagem em gel (Tanon Science & Technology).

Análise estatística

O tamanho da amostra do estudo foi baseado em um experimento preliminar. As médias de PDFVE no grupo controle, no grupo DEX e no grupo de I/R, seguido da reperfusão por 120 minutos foram 12,52; 16,23; 22,39, respectivamente, e o desvio padrão foi de 1,45; 2,44 e 145, respectivamente. O poder ($1 - \beta$) foi considerado como 0,8. Para os grupos controle e DEX, o tamanho da amostra era seis para cada grupo. Para os grupos I/R e DEX, a amostra era composta de quatro em cada grupo. Então, o tamanho de amostra de seis foi determinado por grupo. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). O SPSS 20.0 (IBM Corp) foi utilizado para a análise estatística. As diferenças entre os grupos foram analisadas com a análise de variância (ANOVA). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade. O teste de diferença mínima (LSD) foi usado para comparar a homogeneidade da variância, e o teste T3 de Dunnett foi aplicado para comparar a variância heterogênea. $P < 0,05$ foi considerado para indicar a diferença estatisticamente significante.

Resultados

DEX melhora a recuperação cardíaca da lesão de I/R

Para determinar os efeitos da DEX na lesão de I/R do miocárdio, a preparação isolada do coração perfundido foi realizada ao perfundir corações de ratos por 30 minutos, com solução modificada de K-H, antes de 40 minutos de isquemia global, seguidos de 120 minutos de reperfusão. A análise de variância demonstrou que não houve diferenças significativas na hemodinâmica entre os grupos ao final do ponto de equilíbrio. Depois de 45 minutos de reperfusão, não houve diferenças significativas na FC, $\pm dp/dt_{max}$, PDVE, PDFVE e PTP, exceto no grupo IO e no grupo DEX + IO. No grupo controle, FC, $\pm dp/dt_{max}$, PDVE e PTP foram maiores, e a PDFVE foi menor em comparação aos outros grupos após a reperfusão por 120 minutos. Isso sugere que a isquemia de 40 minutos em temperatura ambiente foi desafiadora para os corações dos ratos. Durante a segunda metade da reperfusão

de 120 minutos, muitos corações exibiram falência e arritmia ($\sim 10\%$). Porém, no grupo DEX, FC, $\pm dp/dt_{max}$, PDVE e PTP ficaram maiores, e a PDFVE ficou menor em comparação aos outros grupos após a reperfusão por 120 minutos, exceto o grupo controle. Assim, o pré-condicionamento com DEX melhorou significativamente a hemodinâmica após a lesão de I/R do miocárdio, e os efeitos foram revertidos pelo efeito da ioimbina (IO) como antagonista do receptor adrenérgico (Figura 2).

Pré-tratamento com DEX reduz o tamanho do infarto do miocárdio

O método TTC de coloração, que é padrão ouro para testes de infarto do miocárdio, foi usado para avaliar a função cardioprotetora da DEX. No grupo controle, a porcentagem de infarto foi baixa; porém, aumentou significativamente nos grupos I/R, IO e DEX + IO (Figura 3A). Em ratos pré-tratados com DEX, a área do infarto foi significativamente menor em comparação ao grupo I/R. Além disso, não houve diferenças entre os grupos IO e DEX + IO em comparação ao grupo I/R. Assim, a adição de IO reverteu os efeitos protetores da DEX na lesão do miocárdio (Figura 3).

Pré-tratamento com DEX atenua a lesão no tecido do miocárdio

A lesão miocárdica foi medida por meio da coloração com HE. A coloração com HE revelou que a estrutura do miocárdio estava completa e exibiu um arranjo regular, fibras musculares cardíacas normais e nenhuma necrose, com um leve edema no cardiomiócito no grupo controle, enquanto a estrutura do miocárdio foi severamente comprometida depois da lesão de I/R. O grupo I/R mostrou arranjo irregular de miofibrilas e músculos cardíacos rompidos. Como demonstrado na Figura 3C, o pré-condicionamento com DEX melhorou muito essas alterações patológicas; porém, a IO reverteu parcialmente o efeito protetor.

Pré-tratamento com DEX suprime a apoptose miocárdica

O método de TUNEL foi usado para determinar os efeitos da DEX na apoptose do cardiomiócito em corações isolados de ratos após I/R. Em comparação ao grupo controle (taxa de apoptose, $0,00 \pm 0,00\%$), o número de células TUNEL positivas aumentou significativamente nos grupos de I/R (taxa de apoptose, $58,17 \pm 0,60\%$), IO (taxa de apoptose, $57,11 \pm 1,39\%$) e DEX + IO (taxa de apoptose $57,62 \pm 1,50\%$); ao mesmo tempo, não houve diferenças significativas na taxa de apoptose entre os grupos I/R, IO e DEX + IO (Figura 4C). Em comparação aos grupos I/R, IO e DEX + IO, a taxa de apoptose diminuiu muito no grupo DEX. Assim, a DEX pode reduzir a apoptose do miocárdio. Porém, a IO reverteu completamente este efeito (Figura 4).

O pré-tratamento com DEX alivia a apoptose ao inibir o estresse do RE via PERK

Para esclarecer o estabelecimento de sucesso de um modelo de estresse do RE induzido pela lesão de I/R do miocárdio, a ativação da GRP78 e da PERK foi avaliada. Neste estudo, a GRP78, importante marcador da ocorrência

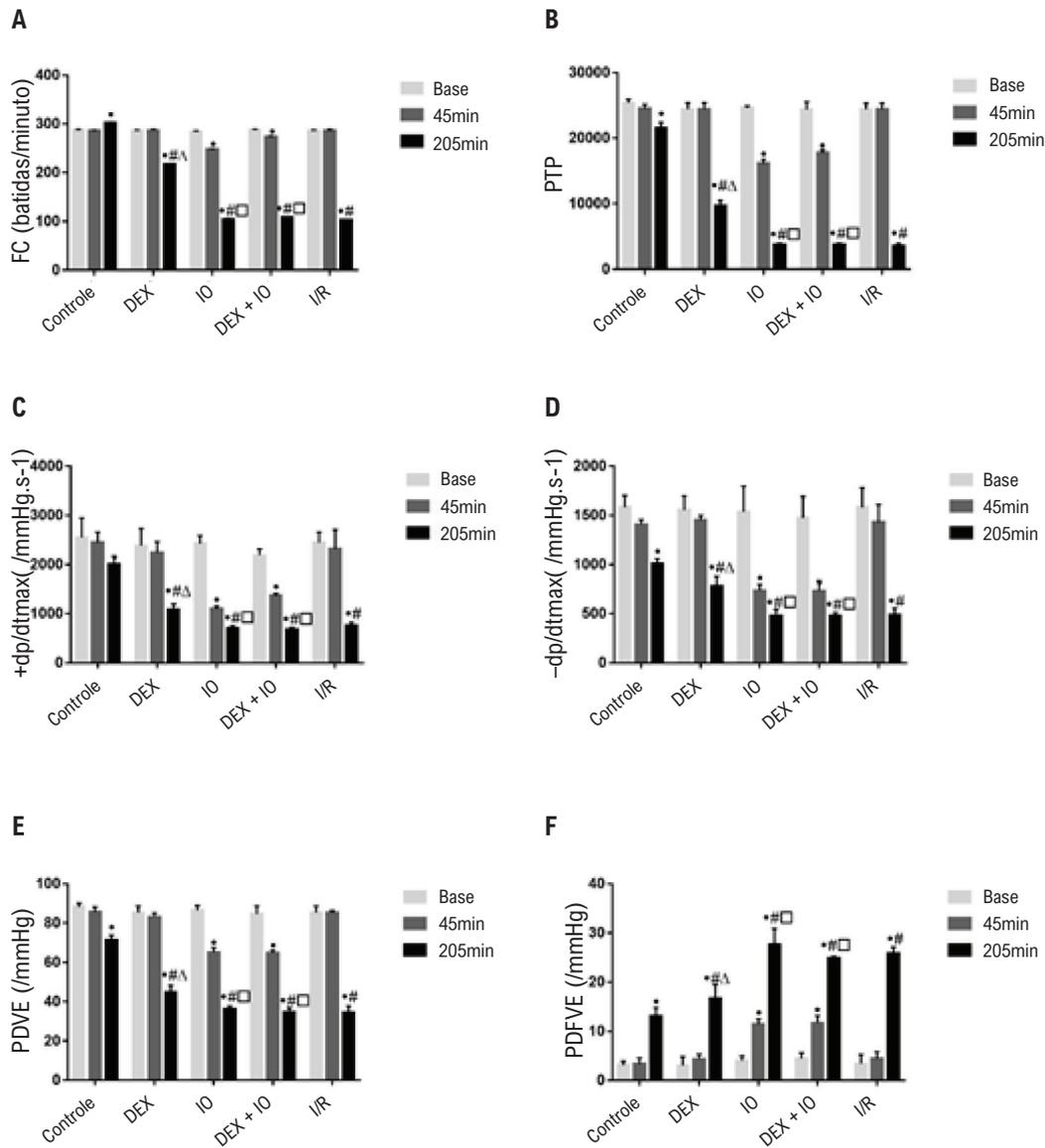


Figura 2 – A dexmedetomidina melhora a função cardíaca em corações de ratos com isquemia-reperusão. A-F: efeito da dexmedetomidina na FC, produto de taxa de pressão (PTP = FC + PDVE), pressão ventricular esquerda máxima de mudanças positivas e negativas ($\pm dp/dt_{max}$) da lesão de I/R em ratos, PDVE, PDFVE. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. $n=12$. ^{*} $P<0,05$, vs. ponto de início da isquemia, [#] $P<0,05$, vs. grupo controle na reperusão por 120 minutos. ^Δ $P<0,05$, vs. grupo I/R com reperusão por 120 minutos. $P<0,05$, vs. grupo DEX com reperusão por 120 minutos. Base: no final do ponto de equilíbrio, 45 minutos: ponto de início da isquemia, 205 minutos: 120 minutos de reperusão. FC: frequência cardíaca; I/R: isquemia-reperusão; PDVE: pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo; PTP: produto de taxa de pressão; $\pm dp/dt_{max}$: pressão ventricular esquerda máxima de mudanças positivas e negativas; PDFVE: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, DEX: dexmedetomidina.

do estresse do RE, foi altamente regulada no nível da proteína em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo controle (Figura 5). Como a GRP78 é alvo direto da PERK, que é um transdutor altamente conservado da apoptose no estresse do RE, os níveis de expressão das proteínas PERK e p-PERK foram examinados. Sob condições fisiológicas, a superexpressão da GRP78 não alterou a ativação da PERK como sendo indiretamente determinada pela forforilação da

PERK (Figura 6). A expressão da proteína p-PERK nos grupos I/R, IO e DEX + IO foi maior se comparada àquela no grupo controle e nos grupos DEX (Figure 6). Em contraste, ela foi bloqueada com sucesso pelo tratamento com DEX. Esses resultados sugerem que a DEX pode ter participação na proteção gerada pelo estresse do RE contra a lesão de reperusão, enquanto o efeito protetivo da DEX foi revertido pela IO, em comparação ao grupo DEX + IO. Para avaliar melhor os efeitos da DEX na via PERK e seu

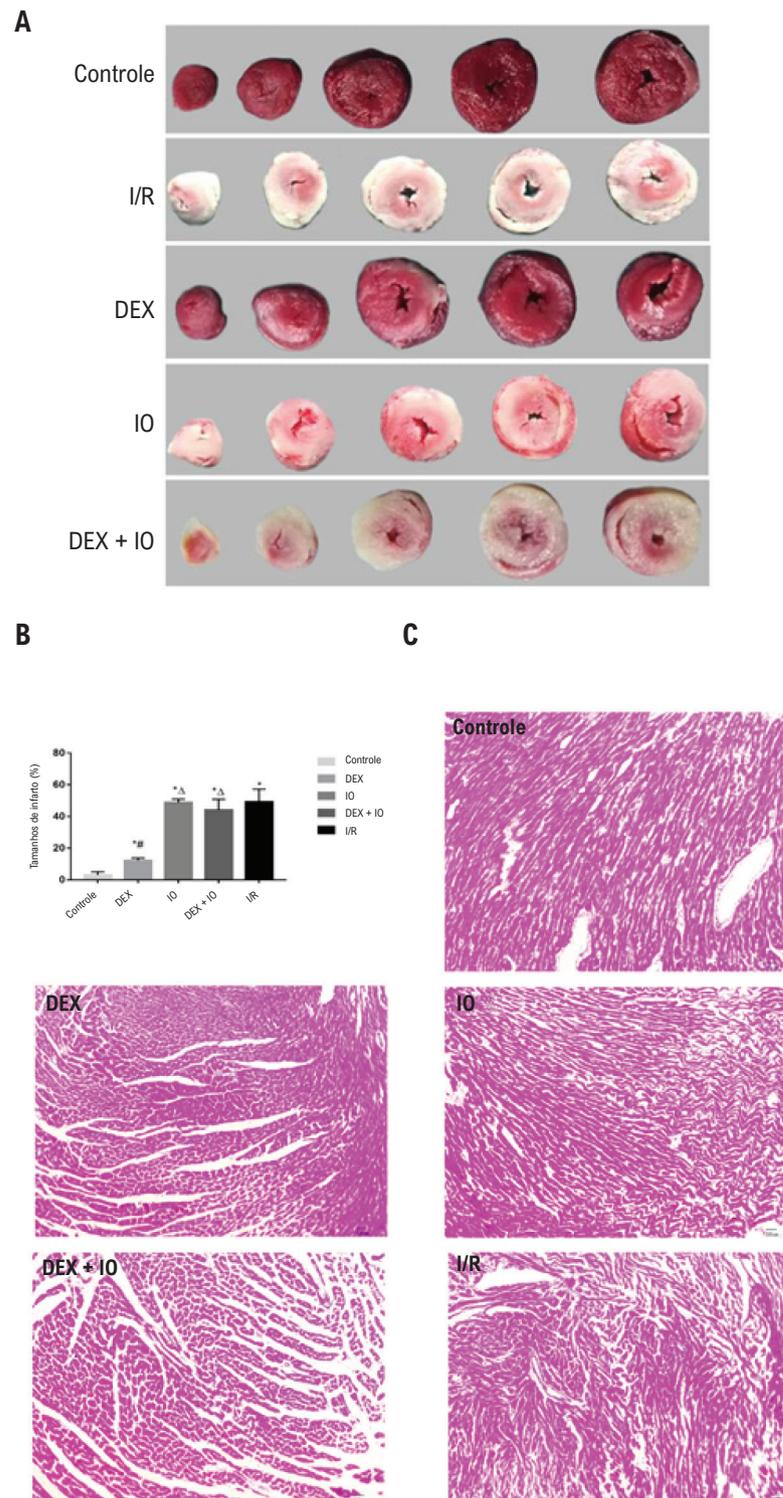


Figura 3 – Coloração com TTC e HE no método Langendorff após a lesão de isquemia-reperfusão. (A) Imagens representando as amostras coloradas com TTC mostrando a área do infarto (branco) e a área sem infarto (vermelho). (B) Análise do tamanho do infarto do miocárdio no controle e no coração isolado com I/R induzida. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. $N = 6$ ^{*} $P < 0,05$, vs. grupo controle; [#] $P < 0,05$, vs. grupo da I/R; ^Δ $P < 0,05$, vs. grupo DEX. (C) Imagens representando as amostras com coloração de HE (ampliação, $\times 200$) demonstrando mudanças histopatológicas no miocárdio. TTC: coloração do cloreto de trifeniltetrazólio. HE: hematoxilina e eosina, I/R: isquemia-reperfusão.

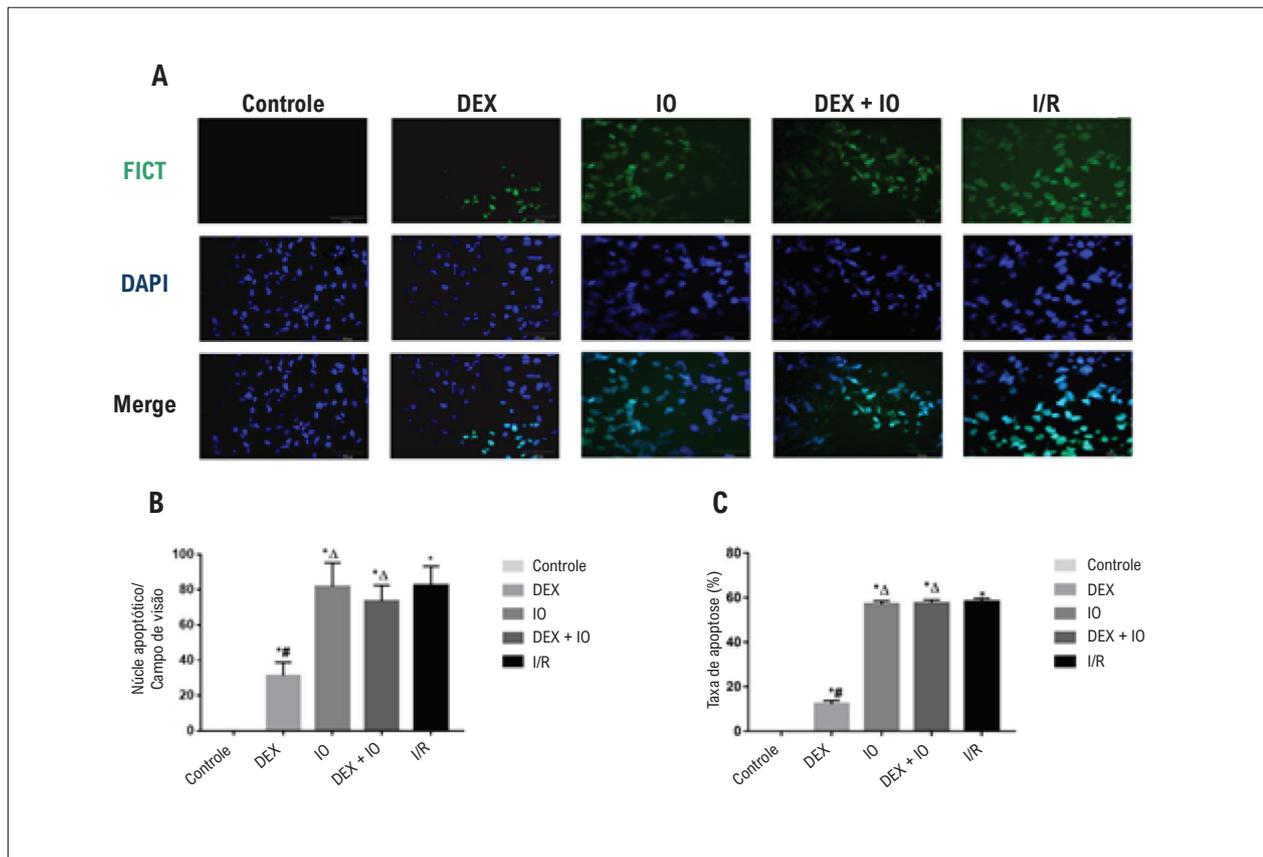


Figura 4 – Análise TUNEL para detectar apoptose em corações com isquemia-reperfusão. (A) Imagens representativas das análises TUNEL (ampliação, $\times 400$) mostrando o núcleo total (azul) e o núcleo apoptótico (verde). (B) Análise do núcleo apoptótico do cardiomiócito no grupo controle e no coração isolado com I/R induzida. (C) Análise das taxas de apoptose do cardiomiócito no grupo controle e no coração isolado com I/R induzida. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão. $N=6$. ^{*} $P<0,05$, vs. grupo controle; [#] $P<0,05$, vs. grupo I/R; ^Δ $P<0,05$, vs. grupo DEX. TUNEL: método de marcação de terminações dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase.

potencial mecanismo molecular, componentes derivados da PERK na resposta de estresse do RE foram investigados, incluindo o fator de iniciação eucariótico 2α (eIF2 α), ativando o fator de transcrição 4 (TCF-4) e proteína homóloga à proteína ligadora do acentuador CCAAT (CHOP). Os resultados demonstraram que os níveis de p-eIF2 α , TCF-4 e CHOP foram regulados nos grupos I/R, IO e DEX + IO, em comparação ao grupo controle, enquanto o pré-tratamento com a DEX inibiu a expressão das três proteínas (Figura 5, Figura 6). A análise do modelo TUNEL confirmou esses resultados. Assim, os resultados mostraram que a DEX pode aliviar a lesão de I/R do miocárdio mediada pela apoptose ao suprimir a ativação da via PERK.

Discussão

Este estudo indicou que a DEX pode proteger contra a lesão de I/R do miocárdio, o que está de acordo com um estudo anterior.²¹ Os efeitos protetivos da DEX na lesão de I/R do miocárdio por meio da inibição das vias apoptóticas foram confirmados previamente.²² Da mesma forma, os resultados deste estudo indicaram que a DEX melhorou a hemodinâmica cardíaca e reduziu a apoptose, o que foi revelado pelas mudanças na morfologia apoptótica e nas

taxas de apoptose do método TUNEL. O estresse excessivo do RE demonstrou ter um papel importante na lesão de I/R do miocárdio, levando à apoptose.²³ GRP78, que é uma proteína acompanhante do RE, pertence à família das proteínas do choque térmico (Hsp70), o que indica a ocorrência do estresse do RE e regula a homeostase do RE em certo ponto.²⁴ Estudos anteriores demonstraram que a I/R induz a expressão da proteína GRP78.^{25,26} Os resultados deste estudo demonstraram que a proteína GRP78 foi induzida pela I/R, enquanto o tratamento com DEX reduziu a expressão de GRP78, o que indicou que a DEX pode exercer seus efeitos protetores ao suprimir o estresse do RE.

A PERK é um receptor de estresse com atividade de serina-treonina quinase, que é ativada por trans-autofosforilação e oligomerização. Em condições prolongadas de estresse do RE, a via PERK/eIF2 α /TCF-4/CHOP contribui com a apoptose durante a lesão de I/R do miocárdio.^{27,28} Um estudo prévio reportou que a GRP78 localizada na membrana é essencial para a fosforilação da PERK,²⁶ o que também foi observado neste estudo. Observa-se que a maior expressão da proteína GRP78 foi detectada no miocárdio do coração de rato isolado e perfundido com isquemia por 40 minutos e reperfusão por 120 minutos.²⁹

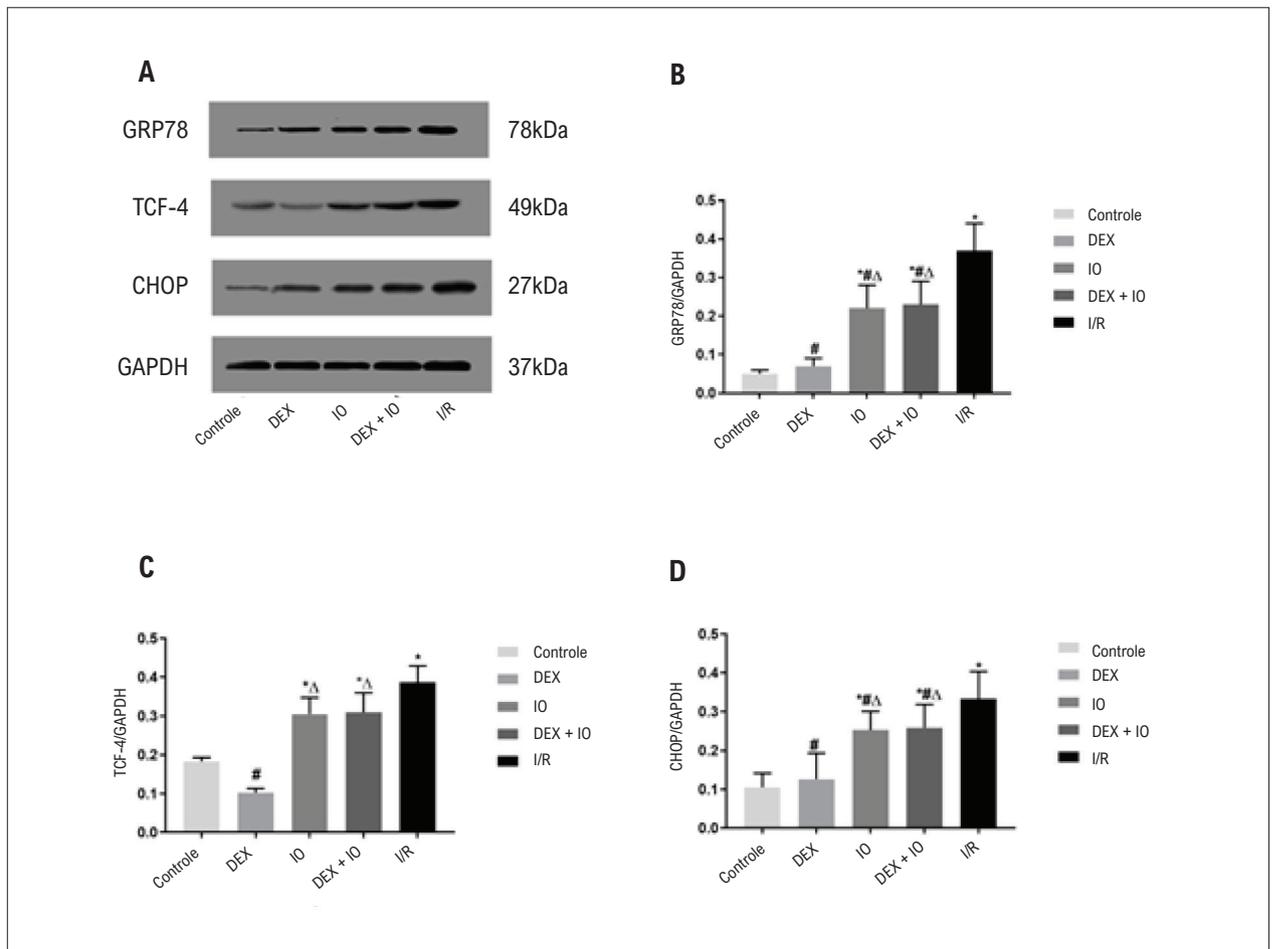


Figura 5 – A dexmedetomidina protegeu o miocárdio da lesão de I/R e reduziu a apoptose. (A) Teste Western blot detectou expressão das proteínas GRP78, TCF-4 e CHOP. (B-D) Análise da expressão de TCF-4, GRP78 e CHOP no controle e no coração isolado com I/R induzida. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. $n=6$. * $P<0,05$, vs. grupo controle. # $P<0,05$, vs. grupo I/R, $\Delta P<0,05$, vs. grupo DEX. I/R: isquemia-reperfusão. GRP78: proteína-78 regulada pela glicose, TCF-4: fator de transcrição 4, CHOP: proteína homóloga à proteína ligadora do acentuador CCAAT.

Além disso, descobrimos que a isquemia por 40 minutos foi ótima para os corações com isquemia-reperfusão no método Langendorff;³⁰ então, selecionamos isquemia por 40 minutos e perfusão de 120 minutos no modelo atual *ex vivo* da lesão do estresse do retículo endoplasmático (ERE). Também foi reportado que a ativação do domínio PERK quinase nos primeiros estágios do estresse do RE leva à fosforilação da eIF2 α , o que reduz a iniciação da transcrição e o enovelamento de proteínas, mantendo a homeostase no retículo endoplasmático. A fosforilação avançada da eIF2 α por meio da ativação da TCF-4 induz a superexpressão da proteína apoptótica CHOP, levando à apoptose.^{31,32} Estudos relacionados mostraram que os mecanismos da DEX contra a lesão de I/R do miocárdio são mediados pela ativação da α_2 -Ars e dos processos anti-inflamatórios,²² enquanto o efeito da DEX no estresse do RE na lesão de I/R do miocárdio foi raramente investigado. Os resultados deste estudo demonstraram que a DEX inibiu o estresse do RE mediado pelas vias PERK/eIF2 α /TCF-4/CHOP durante a lesão de I/R do miocárdio. Um estudo anterior descreveu que a I/R do miocárdio causa um acúmulo anormal de proteínas

não enoveladas no lúmen do retículo endoplasmático, e contribuiu para a autofosforilação da PERK.³³ Neste estudo, o nível de expressão da proteína p-PERK aumentou no grupo I/R, mas diminuiu com o pré-tratamento com a DEX. Com a ativação da PERK, a fosforilação da proteína derivada eIF2 α inibiu o agrupamento de ribossomos 80S e a síntese proteica em massa.^{34,35} Outro estudo indicou que a desfosforilação da eIF2 α suprimiu a sinalização dos derivados da TCF-4/CHOP.³⁶ Assim, a eIF2 α pode ser um componente chave na sinalização da PERK. Os resultados deste estudo demonstraram que depois do tratamento com DEX, o nível de p-eIF2 α diminuiu em relação ao grupo I/R. A TCF-4 tem papel essencial na promoção da apoptose, que é induzida pela fosforilação da eIF2 α .³⁷⁻³⁹ Os resultados deste estudo sugerem que a TCF-4 pode ser responsável pela apoptose do cardiomiócito durante o estresse do RE induzido pela I/R, enquanto o tratamento com a DEX pode diminuir a TCF-4. CHOP, que é membro da família de fatores de transcrição da proteína ligadora do acentuador CCAAT,⁴⁰ sendo um marcador clássico da iniciação da apoptose, ou seja, tem papel essencial na

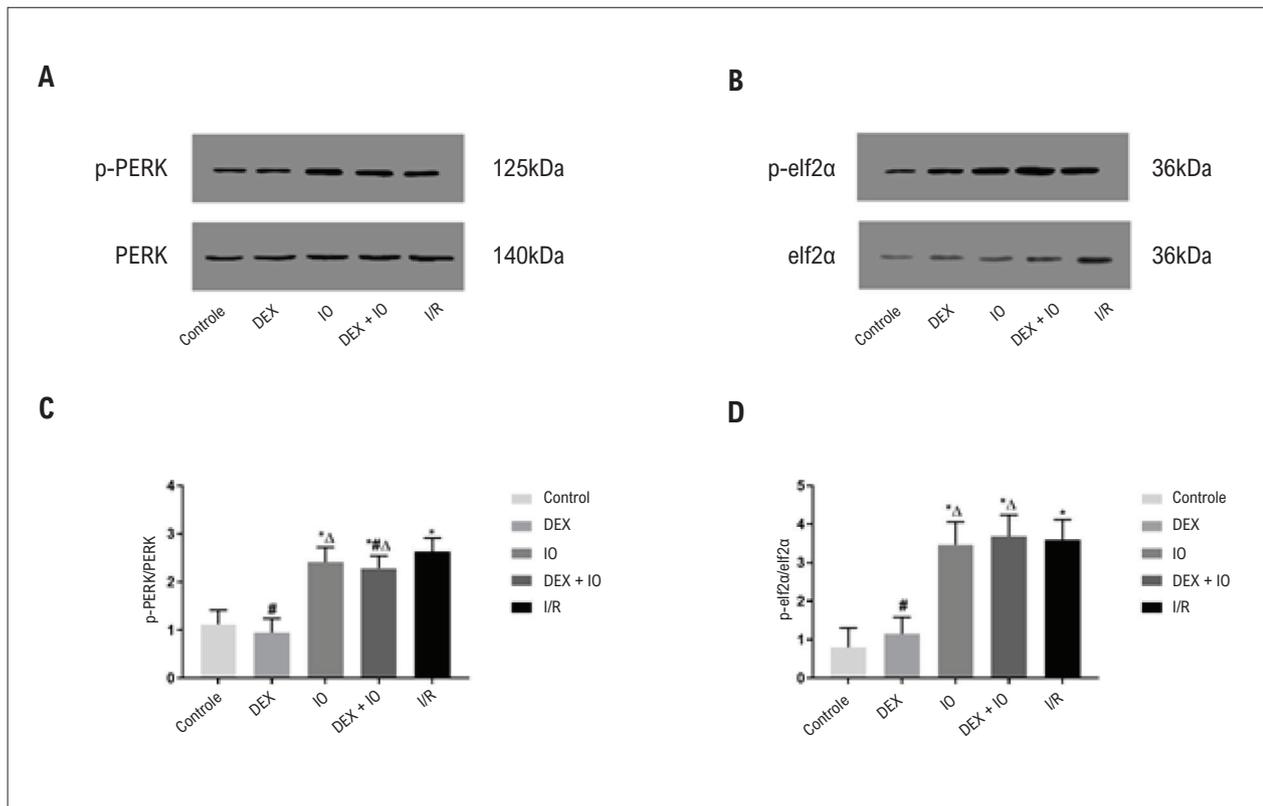


Figura 6 – Efeito da DEX na expressão de p-PERK e p-eIF2α. (A, B) Western-blot detectou a expressão das proteínas PERK, p-PERK, eIF2α, p-eIF2α no controle e no coração isolado com I/R induzida. Dados são apresentados como \pm desvio padrão. $n=6$. * $P<0,05$, vs. grupo controle. # $P<0,05$, vs. grupo I/R. $\Delta P<0,05$, vs. grupo DEX. I/R: isquemia-reperfusão. PERK: proteína quinase do retículo endoplasmático, p-PERK: proteína quinase do retículo endoplasmático fosforilada, eIF2α: fator de iniciação eucariótico 2α, p-eIF2α: fator de iniciação eucariótico 2α fosforilado.

apoptose do miocárdio mediada pelo estresse do RE.^{41,42} Nossos resultados sugerem que a expressão da proteína CHOP aumentou no grupo I/R, o que corresponde aos resultados da análise da apoptose. Este estudo demonstrou que a DEX tinha um efeito anti-apoptótico, e o mecanismo pode depender do estresse do RE ativado pela via PERK.

A IO é um bloqueador seletivo do α_2 -AR pré-sináptico, que dilata o músculo liso vascular, reduz o tom simpático e aumenta o tom parassimpático periférico. Neste estudo, a IO reverteu os efeitos protetores do pré-tratamento com a DEX no miocárdio de ratos, o que resultou em maior tamanho de infarto do miocárdio e apoptose do cardiomiócito; além disso, os níveis de expressão das proteínas PERK aumentaram. Juntos, esses resultados indicam que o efeito protetor do pré-condicionamento com a DEX em miocárdios de ratos pode ser antagonizado por um bloqueador RA, o que está de acordo com um estudo prévio.⁴³

Embora os resultados deste estudo identifiquem um papel importante da via PERK na sobrevivência de cardiomiócitos, houve algumas limitações. Mais trabalhos são necessários para avaliar outros potenciais mecanismos além da apoptose na via PERK. Além disso, a apoptose deve ocorrer no contexto de excessivo estresse do RE. Ao contrário, o RE promove a sobrevivência celular normal ao oferecer nutrientes de organelas e proteínas digestivas danificadas e

quando os níveis de estresse do RE estão baixos, chamado autofagia do RE induzida pelo estresse. Outras avaliações são necessárias para determinar o limite entre a autoadaptação protetora da PERK e a apoptose prejudicial na lesão de I/R do miocárdio.

Conclusão

Este estudo confirmou que o pré-condicionamento com a DEX reduziu a lesão de I/R do miocárdio e melhorou a função cardíaca ao inibir a via apoptótica ativada pela PERK.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Plano de Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia da Província de Guizhou (n. 2016[1175]), e o Fundo de pesquisa da Pós-Graduação da Província de Chizou (n. KYJJ2017034).

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Chen Y, Chen H; Obtenção de dados: Chen Y, Cao S, Chen H, Yin C, Xu X, Yang Z; Análise e interpretação dos dados: Chen Y, Yang Z; Análise estatística: Chen Y, Cao S, Yin C; Obtenção de financiamento e Redação do manuscrito: Chen Y; Revisão

crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Chen Y, Xu X.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por The Science and Technology Development Plan of Guizhou Province (grant no.2016[1175]), and The Postgraduate Research Fund of Guizhou Province (grant no. KYJJ2017034).

Referências

1. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007; 357 (11):1121-35.
2. Xu J, Hu H, Chen B, Yue R, Zhou Z, Liu Y, et al. Lycopene Protects against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Alleviating ER Stress Induced Apoptosis in Neonatal Mouse Cardiomyocytes. *PLoS one*. 2015; 10 (8):e0136443.
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.
4. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013; 123 (1):92-100.
5. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2004; 61(3):481-97.
6. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 1999 Nov;68(5):1905-12
7. Xiao Y, Ding L, Gu YH. [Progress of Acupuncture and Moxibustion Research on the Signal Transduction Pathways Involved in Cell Apoptosis in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury]. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2017 Oct 25;42(5):463-6.
8. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Nov 3;349(4):1406-11.
9. Qiu B, Hu S, Liu L, Chen M, Wang L, Zeng X, et al. CART attenuates endoplasmic reticulum stress response induced by cerebral ischemia and reperfusion through upregulating BDNF synthesis and secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jul 12;436(4):655-9.
10. Wu CX, Liu R, Gao M, Zhao G, Wu S, Wu CF, et al. Pinocembrin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress induced apoptosis. *Neurosci Lett*. 2013 Jun 24;546:57-62.
11. Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res*. 2007 Nov 9;101(10):975-84.
12. Wu H, Ye M, Yang J, Ding J. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: A possible role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol*. 2016 Apr 1;208:65-6.
13. Wu H, Ye M, Yang J, Ding J. Modulating endoplasmic reticulum stress to alleviate myocardial ischemia and reperfusion injury from basic research to clinical practice: A long way to go. *Int J Cardiol*. 2016 Nov 15;223:630-1.
14. Liu Z, Lv Y, Zhao N, Guan G, Wang J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis*. 2015 Jul 30;6(7):e1822.
15. Venn M, Newman J, Grounds M. A phase II study to evaluate the efficacy of dexmedetomidine for sedation in the medical intensive care unit. *Intensive Care Med*. 2003 Feb;29(2):201-7.
16. Mason KP, Robinson F, Fontaine P, Prescilla R. Dexmedetomidine offers an option for safe and effective sedation for nuclear medicine imaging in children. *Radiology*. 2013 Jun;267(3):911-7.
17. Biccard B, Goga S, De Beurs J. Dexmedetomidine and cardiac protection for non-cardiac surgery: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Anaesthesia*. 2008 Jan;63(1):4-14.
18. Wijesundera DN, Bender JS, Beattie WS. Alpha-2 adrenergic agonists for the prevention of cardiac complications among patients undergoing surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Oct 7;(4):CD004126.
19. Okada H, Kurita T, Mochizuki T, Morita K, Sato S. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts. *Resuscitation*. 2007 Sep;74(3):538-45.
20. Dong J, Guo X, Yang S, Li L. The effects of dexmedetomidine preconditioning on aged rat heart of ischaemia reperfusion injury. *Res Vet Sci*. 2017 Oct;114:489-92.
21. Cai Y, Xu H, Yan J, Zhang L, Lu Y. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2014 May;9(5):1542-50.
22. Liu XH, Zhang ZY, Sun S, Wu XD. Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress. *Shock*. 2008 Oct;30(4):422-7.
23. Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio C, Hermel E, Yokota T, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett*. 2002 Mar 13;514(2-3):122-8.
24. Wang ZV, Deng Y, Gao N, Pedrozo Z, Li DL, Morales CR, et al. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell*. 2014 Mar 13;156(6):1179-92.
25. Bi X, Zhang G, Wang X, Nguyen C, May HI, Li X, et al. Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Protects Heart From Ischemia/Reperfusion Injury Through Akt Activation. *Circ Res*. 2018 May 25;122(11):1545-1554.
26. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000 May;5(5):897-904.
27. Yu L, Li B, Zhang M, Jin Z, Duan W, Zhao G, et al. Melatonin reduces PERK-eIF2alpha-ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia-reperfusion injury: role of RISK and SAFE pathways interaction. *Apoptosis*. 2016 Jul;21(7):809-24.
28. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, Williams J, et al. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol*. 2004 Jul;89(4):497-505.
29. Cao S, Liu Y, Wang H, Mao X, Chen J, Liu J, et al. Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts. *PeerJ*. 2016 Feb 16;4:e1706.

30. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)*. 2007 Jun;22:193-201.
31. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011 Mar;13(3):184-90.
32. Vaughn LS, Snee B, Patel RC. Inhibition of PKR protects against tunicamycin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Gene*. 2014 Feb 15;536(1):90-6.
33. Locker N, Easton LE, Lukavsky PJ. HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J*. 2007 Feb 7;26(3):795-805.
34. Thompson SR, Gulyas KD, Sarnow P. Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 6;98(23):12972-7.
35. Chambers JE, Dalton LE, Clarke HJ, Malzer E, Dominicus CS, Patel V, et al. Actin dynamics tune the integrated stress response by regulating eukaryotic initiation factor 2alpha dephosphorylation. *Elife*. 2015 Mar 16;4:e04872.
36. Chen Y, Gao H, Yin Q, Chen L, Dong P, Zhang X, et al. ER stress activating ATF4/CHOP-TNF-alpha signaling pathway contributes to alcohol-induced disruption of osteogenic lineage of multipotential mesenchymal stem cell. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(3):743-54.
37. Su N, Kilberg MS. C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene. *J Biol Chem*. 2008 Dec 12;283(50):35106-17.
38. Cao J, Dai DL, Yao L, Yu HH, Ning B, Zhang Q, et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2012 May;364(1-2):115-29.
39. Xu Q, Chen C, Lin A, Xie Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated membrane expression of CRT/ERp57 induces immunogenic apoptosis in drug-resistant endometrial cancer cells. *Oncotarget*. 2017 May 8;8(35):58754-64.
40. Qing G, Li B, Vu A, Skuli N, Walton ZE, Liu X, et al. ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. *Cancer Cell*. 2012 Nov 13;22(5):631-44.
41. Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Jun;48(6):1105-10.
42. Yang YF, Peng K, Liu H, Meng XW, Zhang JJ, Ji FH. Dexmedetomidine preconditioning for myocardial protection in ischaemia-reperfusion injury in rats by downregulation of the high mobility group box 1-toll-like receptor 4-nuclear factor kappaB signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Mar;44(3):353-61.

