

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

Ramison dos Santos

**AÇÃO DA MELATONINA NO CORAÇÃO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPROTERENOL: EFEITOS DO HORMÔNIO
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E DA
APOPTOSE**

Porto Alegre

2024

Ramison dos Santos

**AÇÃO DA MELATONINA NO CORAÇÃO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPROTERENOL: EFEITOS DO HORMÔNIO
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E DA
APOPTOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luz de Castro
Co-orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Porto Alegre

2024

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo e apoio na persecução dos meus objetivos, em especial aos meus filhos (e aos que de certa forma me considero responsável), pela compreensão e paciência nos momentos em que não consegui dar atenção de forma adequada.

Ao meu orientador, um exemplo de professor, de pesquisador e de ser humano. Grato por todo apoio, incentivo, dedicação e orientação, e principalmente pela compreensão e por me encorajar a continuar frente ao frenesi da vida profissional, acadêmica e familiar.

Às pessoas que auxiliaram durante todo protocolo experimental, colegas, professores e demais servidores.

À banca avaliadora dessa tese, pelo interesse e tempo disponibilizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia e à UFRGS, pelas oportunidades e todo suporte oferecido para realização deste trabalho.

RESUMO

A insuficiência cardíaca se caracteriza pela incapacidade do coração em bombear sangue de forma a atender as necessidades metabólicas dos tecidos, ou necessitando de altas pressões de enchimento para fazê-lo. Isso resulta na redução do débito cardíaco, tanto em repouso como em esforço. Sugere-se que a melatonina, hormônio endógeno sintetizado pela conversão inicial do triptofano em serotonina, atue como antioxidante não enzimático, reduzindo o estresse oxidativo, modulando a expressão de outros antioxidantes e de proteínas inflamatórias pós IAM. Este estudo buscou avaliar o efeito protetor da melatonina sobre parâmetros de estresse oxidativo, expressão de proteínas inflamatórias e relacionadas a apoptose, no coração de ratos com IC induzida por isoproterenol. Para isso, ratos Wistar machos (n = 27) (200 ± 50g, 90 dias de idade), obtidos do Biotério Central da UFRGS foram divididos nos seguintes grupos: Controle, Isoproterenol (ISO) e Isoproterenol + melatonina (ISO+M). Isoproterenol (5 mg/kg, injeção subcutânea, por 7 dias) foi utilizado para induzir lesão miocárdica nos ratos. Grupo ISO + M recebeu 10mg/kg/dia de melatonina por 7 dias. Ao término do protocolo, foram realizados exames ecocardiográficos, e após, os animais foram eutanasiados e os órgãos removidos para posteriores análises morfométricas, histológicas e bioquímicas. Foram realizadas as análises de concentrações das espécies reativas totais de oxigênio (EROs), determinação de nitritos, sulfidrilas, peroxidação lipídica (TBARS). Por meio da técnica de Western blot foram determinados níveis de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) TNF- α , IL-1 β e Bax. Dados paramétricos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls, e os dados não paramétricos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Resultados: ratos ISO apresentaram diminuição dos diâmetros sistólico e diastólico ventricular quando comparados aos animais controles. Nos animais ISO+M esses parâmetros não foram diferentes do grupo controle. Os animais dos grupos ISO e ISO+M apresentaram infiltrado inflamatório com fibrose tanto no VE quanto no VD. A administração de melatonina em ratos ISO + M promoveu aumento nos níveis de nitritos. Comparando os animais ISO + M e controle, não houve diferença nos níveis de nitritos entre esses dois grupos. Enzima eNOS foi avaliada, sendo que os animais ISO + M apresentaram aumento na expressão da eNOS quando comparados com os ratos controle e ISO. Quanto aos parâmetros inflamatórios, animais que receberam melatonina apresentaram redução da expressão de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β . Diante disso, a melatonina apresentou efeitos cardioprotetores no modelo de lesão cardíaca induzida pelo isoproterenol, promovendo aumento da biodisponibilidade do NO e diminuição da expressão de NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias, resultando em atenuação do remodelamento do VE e do infiltrado inflamatório do VD.

Palavras-chave: Melatonina. Insuficiência Cardíaca. Isoproterenol. Antioxidantes. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Heart failure is characterized by the heart's inability to pump blood to meet the metabolic needs of the tissues, or requiring high filling pressures to do so. This results in reduced cardiac output, both at rest and during exertion. It is suggested that melatonin, an endogenous hormone synthesized by the initial conversion of tryptophan into serotonin, acts as a non-enzymatic antioxidant, reducing oxidative stress, modulating the expression of other antioxidants and inflammatory proteins after acute myocardial infarction. This study sought to evaluate the protective effect of melatonin on parameters of oxidative stress, expression of inflammatory and apoptosis-related proteins, in the hearts of rats with HF induced by isoproterenol. For this, male Wistar rats (n = 27) (200 ± 50g, 90 days old), obtained from the UFRGS Central Animal Bioterium were divided into the groups: Control, Isoproterenol (ISO) and Isoproterenol + Melatonin (ISO+M). Isoproterenol (5 mg/kg, subcutaneous injection, for 7 days) was used to induce myocardial injury in rats. Group ISO + M received 10mg/kg/day of melatonin for 7 days. At the end of the protocol, echocardiographic exams were performed, and afterward, the animals were euthanized and the organs removed for subsequent morphometric, histological and biochemical analyses. Analyzes of concentrations of total reactive oxygen species (ROS), determination of nitrites, sulfhydryls, lipid peroxidation (TBARS) were carried out. Using the Western blot technique, levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), TNF- α , IL-1 β and Bax were determined. Parametric data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student-Newman-Keuls post-test, and non-parametric data by the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn post-test. Results: ISO rats showed a decrease in ventricular systolic and diastolic diameters when compared to control animals. In ISO+M animals these parameters were not different from the control group. Animals in the ISO and ISO+M groups presented inflammatory infiltrate with fibrosis in both the LV and RV. Administration of melatonin to ISO + M rats promoted an increase in nitrite levels. Comparing ISO + M and control animals, there was no difference in nitrite levels between these two groups. eNOS enzyme was evaluated, and ISO + M animals showed an increase in eNOS expression when compared to control and ISO rats. Regarding inflammatory parameters, animals that received melatonin showed reduced expression of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β . Therefore, melatonin showed cardioprotective effects in the isoproterenol-induced cardiac injury model, promoting increased NO bioavailability and decreased expression of NF- κ B and pro-inflammatory cytokines, resulting in attenuation of LV remodeling and RV inflammatory infiltrate. .

Keywords: Melatonin. Heart Failure. Isoproterenol. Antioxidants. Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O coração como bomba.	13
Figura 2: Estrutura das catecolaminas.	17
Figura 3. Reações da superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase.	24
Figura 4. Esquema representativo do desenho experimental.....	32
Figura 5. Echocardiography.....	43
Figura 6. Morphometric parameters.	45
Figura 7. Histological section.....	46
Figura 8. Oxidative stress parameters.....	48
Figura 9. Western blot parameters.	49

LISTA DE TABELAS

Table 1. Echocardiographic parameters.....	44
Table 2. Histological Parameters.....	47

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

Ca²⁺ – Cálcio

CAT – Catalase

DCF – 2,7-diclorofluoresceína

DCFH-DA – 20,70-diclorofluoresceína diacetato

DD – Diâmetro diastólico

DOX – Doxorrubicina

DS – Diâmetro sistólico

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ESC – European Society of Cardiology

FEVE – Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo

GSH – Glutathiona reduzida

GPx – Glutathiona peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IAM – Infarto agudo do miocárdio

IM – Infarto do miocárdio

IC – Insuficiência cardíaca

I_{Ca,L} – Corrente de cálcio tipo-L

ICFEP – Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada

ICFER – Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida

If – do inglês, *funny current*

IL-1β – interleucina-1beta

IL-6 – interleucina-6

ISO – Isoproterenol

ISO+M – Isoproterenol mais melatonina

MT1 receptores melatonérgicos de membrana tipo 1

MT2 receptores melatonérgicos de membrana tipo 2

Na⁺ – Sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

NO²⁻ – Nitritos

O₂⁻ – Ânion superóxido

OH• – Radical hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato-salino

PNS – Pesquisa Nacional de Saúde

RyR2 – Receptor da rianodina do tipo 2

-S – Sulfidrilas

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF-β – Fator de crescimento transformador β

TGI – Trato gastrointestinal

TLR4 – Receptores Toll-like 4

TNF-α – Fator de necrose tumoral-alfa

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Coração	12
1.2 Estimulação β -adrenérgica	13
1.3 Canais de cálcio	14
1.4 Modelos experimentais de lesão cardíaca	15
1.5 Isoproterenol	16
1.6 IAM e remodelamento pós IAM	18
1.7 Insuficiência cardíaca	19
1.7.1 Epidemiologia	19
1.7.2 Classificações da IC	20
1.8 Estresse oxidativo	21
1.8.1 Espécies reativas de oxigênio	22
1.8.2 Antioxidantes	22
1.9 Inflamação	24
1.10 Apoptose	25
1.11 Melatonina	26
2. HIPÓTESE	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Aspectos éticos	31
4.2 Origem dos animais	31
4.3 Desenho experimental e grupos experimentais	31
4.4 Avaliação ecocardiográfica e morfométrica	32
4.5 Análise histológica	33
4.6 Preparação tecidual e medição da concentração de proteínas	33
4.7 Avaliação de nitritos	34
4.7.1 Determinação dos níveis de EROs	34
4.7.2 Determinação de grupos sulfidrila totais	34
4.7.3 Método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
4.7.4 Avaliação de Western Blot	35
4.8 Análise estatística	35

4.9	Descarte de materiais biológicos e químicos	36
5.	RESULTADOS	37
6.	CONCLUSÕES	54
7.	PERSPECTIVAS	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Coração

A estrutura do coração humano é formada por quatro câmaras - duas superiores (átrios) e duas inferiores (ventrículos) – sendo revestido pelo pericárdio, membrana fibrosa protetiva que também influencia na posição anatômica adequada do órgão. A contração e relaxamento são controladas pela despolarização dos miócitos, células que apresentam discos intercalares e a capacidade de se comunicarem eletricamente, formando o sistema de condução elétrica do coração, o qual é crucial para garantir a sincronia da contração cardíaca e a efetivação do bombeamento sanguíneo, levando à ejeção de sangue para a circulação sistêmica e pulmonar (GUYTON e HALL, 2021; SILVERTHORN, 2017).

Este processo excitatório é propriedade única do tecido cardíaco. Isso porque, o sinal para a contração miocárdica não é proveniente do sistema nervoso central, mas de células miocárdicas especializadas, denominadas células autoexcitáveis ou marca-passo. Estas são diferentes das células contráteis cardíacas em sua estrutura e função, e não contribuem diretamente na força contrátil do coração (BORON, 2015).

Dessa forma, o coração se caracteriza como uma bomba biológica, impulsionando o sangue através de uma vasta rede de veias e artérias, que garante às células do corpo os nutrientes essenciais para a vida e remove os resíduos metabólicos. Neste sentido, uma importante característica é fato do fluxo sanguíneo ser unidirecional, propriedade assegurada por dois conjuntos de valvas. As valvas atrioventriculares estão localizadas entre os átrios e os ventrículos, e as válvulas semilunares estão situadas entre os ventrículos e as artérias. Ainda que apresentem estrutura distinta, ambas têm a função de impedir o fluxo retrógrado do sangue (Figura 1) (SILVERTHORN, 2017).

A fisiologia do coração também envolve o suprimento de sangue ao próprio músculo cardíaco, que é fornecido pelas artérias coronárias, cuja função é vital para a manutenção da sua integridade tecidual, garantindo oxigenação e nutrição adequada às células cardíacas. A disfunção destas artérias pode levar à redução do fluxo sanguíneo para o tecido cardíaco e, em

casos mais graves, a um infarto do miocárdio. O dano pode ser intensificado por fatores relacionados ao estresse oxidativo e consequente ativação de vias regulatórias adaptativas. A capacidade de adaptação deste órgão, conhecida como plasticidade cardíaca, envolve processos celulares complexos, como a hipertrofia e a apoptose (GUYTON e HALL, 2021; KOEPPEN e STANTON, 2009).

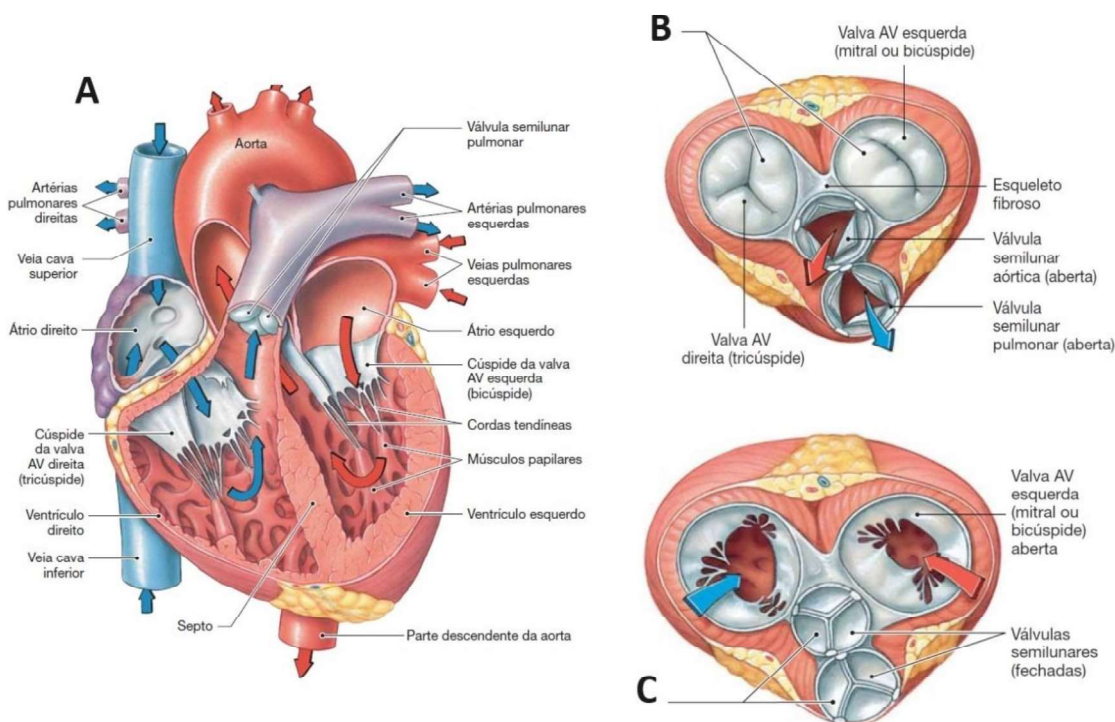


Figura 1. O coração como bomba.

Estrutura do coração, mostrando o fluxo sanguíneo unidirecional, assegurado por dois conjuntos de válvulas (A). Durante a contração ventricular as válvulas AV permanecem fechadas, a fim de impedir o fluxo retrógrado do sangue para dentro dos átrios (B). As válvulas semilunares impedem que o sangue que entrou nas artérias retorne para dentro dos ventrículos durante o relaxamento ventricular (C). (Adaptado de Silverthorn, 2017)

1.2 Estimulação β -adrenérgica

A estimulação β -adrenérgica é um importante mecanismo regulatório da função cardíaca. Os receptores β -adrenérgicos (subtipo β_1) estão presentes no coração em grande quantidade, sendo ativados, em situações de estresse e exercício físico intenso, por exemplo, pelas catecolaminas noradrenalina (proveniente dos neurônios simpáticos) e adrenalina (proveniente da medula da glândula suprarrenal) (GRIMM *et al.*, 2010).

A ativação desses receptores e a estimulação nas células marca-passo acelera a frequência cardíaca, porque as catecolaminas causam aumento no fluxo iônico através dos canais If (funny current) e de Ca^{2+} . O influxo de íons positivos acelera a taxa de despolarização, permitindo que a célula atinja o limiar mais rapidamente. Isso causa um aumento da taxa de disparo do potencial de ação e, conseqüentemente, da frequência cardíaca (GRIMM *et al.*, 2010).

As alterações nas propriedades de transporte dos canais iônicos se dão por meio do sistema de segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). No caso dos canais If, canais dependentes de nucleotídeos cíclicos, o próprio AMPC é o mensageiro, permitindo que estes canais permaneçam abertos por mais tempo. Durante as fases do potencial marca-passo, o aumento da permeabilidade ao Na^+ e ao Ca^{2+} acelera a despolarização e a frequência cardíaca (GRIMM *et al.*, 2010; YATANI *et al.*, 1999).

Vários fármacos que atuam como agonistas β -adrenérgicos são utilizados no tratamento de doenças cardíacas, como a insuficiência cardíaca, sendo capazes de aumentar a força de contração e a frequência cardíaca. No entanto, o uso prolongado desses fármacos pode levar à dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos e alterações na expressão de proteínas contráteis, resultando em efeitos adversos na função cardíaca (YATANI *et al.*, 1999).

1.3 Canais de cálcio

O acoplamento excitação-contração na fibra cardíaca depende de correntes iônicas relacionadas principalmente com os íons sódio, cálcio e potássio. Os canais para Ca^{2+} são especialmente importantes para o inotropismo do coração. No miocárdio existem dois tipos destes canais iônicos para Ca^{2+} : tipo-L e tipo-T (KOEPPEN e STANTON, 2009; DE PAOLI *et al.*, 2002).

O canal de Ca^{2+} tipo-L (do inglês, *large conductance*), também conhecido como canal de diidropiridina, possui alta condutância, abertura com longa duração, sendo ativado por alta voltagem. Nos miócitos cardíacos, o canal de cálcio tipo-L é responsável pela passagem da corrente $I_{\text{Ca,L}}$, que

desencadeia a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pela ativação do receptor 2 de rianodina (RyR2) (liberação de cálcio induzida por cálcio). A fosforilação desses canais aumenta sua permeabilidade ao cálcio e a contratilidade dos miócitos. O canal para Ca^{+2} tipo-T caracteriza-se por possuir baixa condutância, abertura transitória, e ativação em baixas voltagens, funcionando para controlar a atividade de marcação do nó sinoatrial (DE PAOLI *et al.*, 2002).

1.4 Modelos experimentais de lesão cardíaca

Modelos experimentais animais, utilizados em pesquisas sobre a insuficiência cardíaca (IC), simulam alguns aspectos da doença quanto aos parâmetros hemodinâmicos, ecocardiográficos e bioquímicos. A utilização destes modelos permite o desenvolvimento e avaliação de novas estratégias terapêuticas, especialmente com uso de ratos, que apresentam vantagens pela fácil reprodutibilidade, baixo custo, e rápida evolução da IC (CAMACHO *et al.*, 2016). Na literatura são encontrados diferentes modelos com características singulares que deve ser escolhida de acordo com as particularidades do estudo. Entre os modelos, pode-se citar o de doxorrubicina (DOX), que induz a formação de radicais livres e ampla peroxidação lipídica, levando à inflamação do miocárdio, desorganização morfológica das miofibrilas, apoptose, necrose, fibrose intersticial e dilatação e IC progressiva e irreversível, sendo uma técnica simples, não invasiva, porém com elevada mortalidade (SZENCZI *et al.*, 2015); o modelo de ligadura da artéria coronária, que causa isquemia do miocárdio e conseqüentemente, necrose tecidual, podendo ser utilizado em diversas espécies, e apresentando grande similaridade com o infarto do miocárdio em humanos, porém requerendo manejo cuidadoso e com alta taxa de mortalidade animal (JOHNS e OLSON, 1954); modelos de sobrecarga de pressão, com restrição ao fluxo da aorta, aumentando a gravidade e resultando em hipertrofia do VE com o crescimento do animal; modelos de sobrecarga de volume, quando se utiliza fluidos isotônicos ou coloides para reproduzir a congestão observada na IC; além de modelos menos utilizados, como indução de cardiomiopatias por patógenos ou diabetes (WEI *et al.*, 2003; , GOMES *et al.*, 2013; , MONNET e CHACHQUES, 2005; , HEYMANS *et al.*, 2006).

Destaca-se o modelo de hipertrofia cardíaca induzida pela administração subcutânea de isoproterenol, que tem sido amplamente utilizado em razão de causar em animais doença com características semelhantes à hipertrofia patológica em humanos.

O isoproterenol pode aumentar o estresse oxidativo e a degradação oxidativa dos lipídios, com o aumento de espécies reativas de oxigênio e enzimas eletrolíticas. Os níveis de antioxidantes são reduzidos, especialmente a CAT, SOD e GPx (SHUKLA, SHARMA e SINGH, 2015). A administração de ISO causa em ratos lesão miocárdica semelhante à observada em humanos, sendo um método rápido, simples e pouco invasivo (BROOKS e CONRAD, 2009).

Estudos histológicos mostraram que a administração de isoproterenol leva a alterações na arquitetura cardíaca, incluindo fibrose e degeneração miocítica (WONG et al., 2017). Além disso, a administração crônica de isoproterenol pode levar a hipertrofia cardíaca, disfunção ventricular esquerda e aumento na expressão de genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos (WEI et al., 2003).

1.5 Isoproterenol

Isoproterenol é um agonista β -adrenérgico, apresenta semelhança estrutural com a adrenalina e noradrenalina (Figura 2), e tem sido amplamente utilizado para induzir lesão cardíaca em modelos animais. A administração de isoproterenol pode resultar em uma sobrecarga de estresse oxidativo, aumento na atividade de enzimas pró-inflamatórias e apoptóticas, e diminuição da atividade antioxidante, levando a danos no tecido cardíaco (WONG *et al.*, 2017). Isso está associado à ativação do sistema adrenérgico e outros sistemas neuro-humorais, que aumentam a atividade do canal de Ca^{2+} do tipo L (TANG *et al.*, 2010). A ativação contínua de receptores β -adrenérgicos cardíacos, devido a estimulação intermitente do sistema nervoso autônomo simpático pelo ISO desencadeia no tecido o aumento da síntese proteica e da expressão de proto-oncogenes que levam à manifestação da hipertrofia (ZHANG *et al.*, 2003).

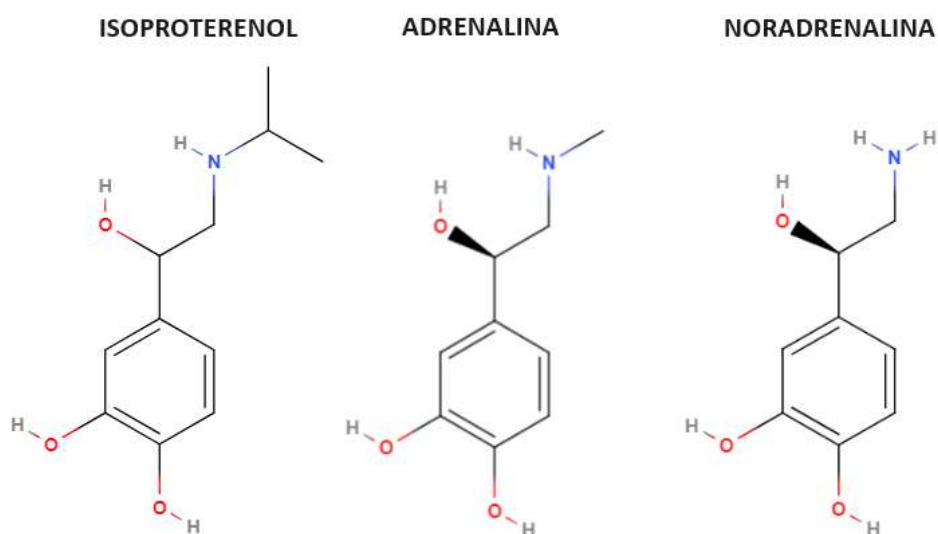


Figura 2: Estrutura das catecolaminas.

Semelhança estrutural das catecolaminas isoproterenol, adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina). (Criado em MolView.org).

Diferentes modelos de indução de IC pelo ISO são utilizados, e podem ser classificados de acordo com a posologia administrada: doses baixas (0,3–6 mg/kg de peso corporal) administradas de forma aguda ou crônica, durante 1–3 semanas; doses médias (10–85 mg/kg de peso corporal) aplicadas em dose única; e doses altas (150–300 mg/kg de peso corporal) aplicadas em dose única ou em duas doses consecutivas (NICHTOVA *et al.*, 2012).

Tem-se que doses baixas de ISO (0,3 a 6 mg/kg) induzem hipertrofia cardíaca acompanhada de fibrose e necrose do tecido. Nesta posologia os miócitos cardíacos apresentam sinais de apoptose que apareceram dentro de 3 a 6 horas após a aplicação única de ISO (GOLDSPINK *et al.*, 2004; KRENEK *et al.*, 2009). A apoptose e a perda contínua de miócitos viáveis poderiam ser um mecanismo para insuficiência miocárdica progressiva (COLUCCI *et al.*, 2000).

De fato, mesmo baixas doses desse agonista adrenérgico (5 mg/kg) podem causar remodelamento dos ventrículos esquerdo e direito e lesão cardíaca (KRENEK *et al.*, 2009; NICHTOVA *et al.*, 2012). As alterações no tecido cardíaco causadas pela ISO incluem a presença de focos de necrose, fibrose e inflamação (MEERAN *et al.*, 2021). No nível celular, é possível identificar aumento das miofibrilas e alterações mitocondriais, como inchaço

e ruptura das cristas e membranas externas (NICHTOVA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2007).

1.6 IAM e remodelamento pós IAM

O IAM é uma cardiopatia isquêmica causada por falha na perfusão do tecido cardíaco, causando necrose da parede miocárdica. Como resposta, ocorre a substituição do miocárdio lesado por tecido cicatricial, que causa uma maior carga de trabalho para as fibras cardíacas íntegras. A reação adaptativa dos cardiomiócitos frente ao estresse é apresentar hipertrofia, processo favorável para manutenção do débito cardíaco (PFEFFER e BRAUNWALD, 1990). A hipertrofia miocárdica é um importante componente do remodelamento, que permite ao coração manter suas funções básicas, como transportar oxigênio e nutrientes para outras células do organismo em resposta ao aumento das condições de sobrecarga (SAMAK *et al.*, 2016). Em razão da perda de tecido muscular contrátil, artifícios compensatórios ocorrem no VE, com intuito de preservar o débito cardíaco, como o mecanismo de Frank-Starling, que tende a manter a função de bomba da câmara esquerda (IWASAKA *et al.*, 1992).

Entretanto, mantendo tal adaptação por um longo período, pode ocorrer disfunção ventricular e a um remodelamento mal adaptativo do coração, que pode progredir para a insuficiência cardíaca (PFEFFER e BRAUNWALD, 1990). Ainda, os cardiomiócitos podem sofrer apoptose, levando à dilatação ventricular (SAMAK *et al.*, 2016), especialmente na câmara esquerda do coração, que por sua vez sofre alterações estruturais, tornando-se mais esférico, resultando, entre outras situações, na diminuição da fração de ejeção (DORN, 2007).

Observa-se um processo complexo, caracterizado por alterações moleculares e celulares no tecido cardíaco. A remodelação ventricular pós-IAM apresenta um aumento na expressão de fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador β (TGF- β), que pode levar a fibrose cardíaca e alterações na matriz extracelular (XIAO *et al.*, 2017).

A ativação de vias de sinalização, como a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), também tem sido implicada no processo de remodelação cardíaca

pós-IAM (DE CASTRO *et al.*, 2018). No coração lesado, essa proteína pode promover a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , causando inflamação e fibrose (LU *et al.*, 2004).

1.7 Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica caracterizada pela incapacidade do coração em bombear sangue de forma a atender as necessidades metabólicas dos tecidos, ou necessitando de altas pressões de enchimento para fazê-lo. Isso resulta na redução do débito cardíaco, tanto em repouso como em esforço (ROHDE, 2018; KOEPPEN e STANTON, 2009).

Trata-se de uma condição crônica e progressiva que apresenta aumento na prevalência devido ao envelhecimento da população, bem como à melhoria da sobrevida em outras doenças cardiovasculares, que podem levar à disfunção cardíaca secundária (ROHDE, 2018). Pode-se dizer que a IC é a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração.

A etiologia da doença está relacionada a alterações estruturais ou funcionais do coração, como anormalidade do miocárdio, das válvulas cardíacas e do pericárdio. Acredita-se que o infarto do miocárdio (IM) seja a principal causa da IC, estando presente em até 25% dos casos de IM (ROHDE, 2018). A mortalidade associada à IC é alta, com uma taxa de mortalidade de 50% em 5 anos após o diagnóstico. Ainda, das hospitalizações decorrentes de IC, aproximadamente metade é caracterizada por fração de ejeção reduzida (VIRANI *et al.*, 2021). Portanto, a IC representa um problema de saúde pública significativo, com impacto social e econômico relevante.

1.7.1 Epidemiologia

A insuficiência cardíaca afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e no Brasil, pode ser considerado um problema de saúde pública, visto que representa uma das principais causas de internação hospitalar e morte cardiovascular. Dados recentes mostram que a IC tem uma prevalência de cerca de 1-2% na população mundial, e a sua incidência aumenta com a idade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a IC é responsável por

cerca de 30 milhões de casos no mundo e cerca de 3,6 milhões de mortes por ano. A mesma organização (OMS) mostra que a IC é responsável por cerca de 2% das hospitalizações e 6-10% das hospitalizações em pessoas com mais de 65 anos em países desenvolvidos (WHO, 2021). No Brasil a IC foi responsável por 2,6% das hospitalizações e por 6% dos óbitos registrados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), demandando cerca de 3% do total de recursos utilizados para atender as internações realizadas pelo sistema, sendo a principal causa de hospitalização em pacientes com mais de 60 anos (BOCCHI *et al.*, 2009).

Pode-se afirmar que é uma condição clínica multifatorial e sua etiologia pode ser decorrente de diversas causas, como a hipertensão arterial, a doença arterial coronariana, doenças valvares, miocardiopatias, diabetes mellitus e outras condições. Embora a IC possa afetar indivíduos de qualquer idade, a sua incidência e prevalência aumentam com a idade. O aumento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional têm contribuído para o aumento da prevalência da IC (VIRANI *et al.*, 2021).

No Brasil, dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) realizada pelo Ministério da Saúde em 2019 mostram que a IC afeta cerca de 1,6 milhões de brasileiros acima de 18 anos, sendo mais prevalente em indivíduos do sexo feminino e em pessoas com idade acima de 60 anos. A PNS também evidenciou que a hipertensão arterial é a principal causa de IC no país, seguida da cardiopatia isquêmica e das miocardiopatias (IBGE, 2020).

Em um contexto amplo, a IC é uma condição clínica de alta morbidade e mortalidade, e representa um grande desafio para os sistemas de saúde em todo o mundo. O tratamento da IC envolve uma abordagem multidisciplinar, com medidas farmacológicas e não farmacológicas, visando o controle dos sintomas, a prevenção de complicações e a melhora da qualidade de vida dos pacientes (VIRANI *et al.*, 2021).

1.7.2 Classificações da IC

Para melhor entendimento e estudo da IC, existem classificações de acordo com algumas características clínicas e funcionais. A classificação mais recente é a European Society of Cardiology (ESC) de 2016, que divide a IC em

quatro classes funcionais e duas classes etiológicas. As classes funcionais se baseiam na limitação do paciente para atividades físicas e o grau de desconforto causado pelos sintomas. Já as classes etiológicas são divididas em IC com fração de ejeção preservada (ICFEP) e IC com fração de ejeção reduzida (ICFER), que se referem à fração de ejeção do ventrículo esquerdo, um indicador da capacidade de bombeamento do coração (PONIKOWSKI *et al.*, 2016).

Essa classificação tem se mostrado mais precisa para avaliar a gravidade da doença e direcionar o tratamento adequado. Além disso, ela permite uma melhor estratificação de risco para o paciente, o que é essencial para a tomada de decisão clínica.

1.8 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um processo bioquímico que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo em neutralizá-las através de mecanismos antioxidantes. As EROs incluem espécies como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH\bullet$). Essas espécies altamente reativas podem danificar componentes celulares importantes, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando a uma série de processos patológicos (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2010).

A formação das EROs ocorre em 2-5% do todo oxigênio que passa pelo processo de respiração celular na mitocôndria (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Ao longo da cadeia transportadora de elétrons, o oxigênio recebe quatro elétrons, resultando sua redução até água, e formando EROs. Situações como a hipóxia estão associadas ao aumento da produção de EROs. Além disso, outras enzimas, como a NADPH oxidase, também são responsáveis pela produção de EROs (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Tais moléculas são necessárias para a manutenção de funções fisiológicas normais, como a defesa imunológica e a sinalização celular. No entanto, em condições patológicas como a isquemia/reperfusão, a produção excessiva de EROs pode levar à lesão celular e tecidual (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2010).

No tecido cardíaco, a produção excessiva de EROs tem sido amplamente associada à patogênese da insuficiência cardíaca e do remodelamento cardíaco, por sua relação com a disfunção endotelial e o aumento da apoptose de cardiomiócitos, além de contribuir para o aumento da inflamação no tecido cardíaco (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2010; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

1.8.1 Espécies reativas de oxigênio

O radical superóxido (O_2^-) representa a espécie radicalar mais prevalente e abundante dentro da célula, originando-se da cadeia de transporte de elétrons, atividades de células fagocitárias e processos de auto-oxidação. A enzima superóxido dismutase desempenha um papel crucial na dismutação desse radical, resultando na formação de peróxido de hidrogênio (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2010).

Embora o H_2O_2 não seja classificado como um radical livre, é considerado uma espécie reativa de oxigênio (ERO), devido à sua capacidade potencial de gerar o radical hidroxila mediante interações com metais de transição (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2010; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Além disso, sua baixa reatividade permite a fácil transposição das membranas biológicas, confirmando seu papel como um sinalizador eficaz tanto no âmbito intercelular quanto intracelular. Apesar da curta meia-vida do radical hidroxila, este se destaca como a ERO mais potente, apresentando a capacidade de reagir com virtualmente todas as biomoléculas. Sua superioridade oxidante em relação a outras EROs é notável, uma vez que o organismo carece de sistemas enzimáticos de defesa específicos contra este radical (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2010; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

1.8.2 Antioxidantes

O sistema antioxidante foi um mecanismo evolutivo em resposta aos danos decorrentes do processo oxidativo, onde os organismos com respiração

aeróbica desenvolveram formas para regular as reações de oxirredução celular e reparar ou substituir moléculas danificadas.

Este sistema antioxidantes compreende defesas enzimáticas e não enzimáticas (HOGG e KALYANARAMAN, 1999; JONES, 2006). O sistema de defesa enzimático engloba as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), enzimas que atuam por meio de mecanismos preventivos, impedindo ou controlando a formação de radicais livres.

A enzima SOD representa a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo, desempenhando um papel crucial na proteção celular contra danos causados pelo radical superóxido, convertendo-o em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é metabolizado pelas enzimas CAT e GPx.

A catalase está relacionada com a redução do H_2O_2 em água e oxigênio, sendo dependente de NADPH (SCOTT *et al.*, 1991), processo preventivo na formação do radical hidroxila por meio das reações de Fenton ou de Haber-Weiss (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). A distribuição seletiva da catalase, principalmente nos peroxissomos, induz a variações nos níveis de atividade nos diversos tecidos. No IM os radicais superóxido gerados reduzem a atividade da CAT (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

A glutathiona peroxidase, por sua vez, exerce sua atividade na presença de peróxidos, notadamente peróxido de hidrogênio. A redução de H_2O_2 pela GPx é facilitada pela glutathiona reduzida (GSH), servindo como cofator. A redução dos níveis de GPx pode comprometer a recuperação após períodos de isquemia cardíaca (PRINCE *et al.*, 2009)

Além das enzimas antioxidantes, outras moléculas também contribuem para a defesa antioxidante não enzimática. Por exemplo, o GSH, um tripeptídeo composto pelos aminoácidos cisteína, glicina e ácido glutâmico, que age como um redutor de EROs e é capaz de regenerar a vitamina C e o tocoferol. A vitamina C é um composto hidrossolúvel que é capaz de doar elétrons para neutralizar radicais livres. Já o tocoferol é uma vitamina lipossolúvel que é incorporada nas membranas celulares, onde atua como um sequestrador de radicais livres (JONES, 2006).

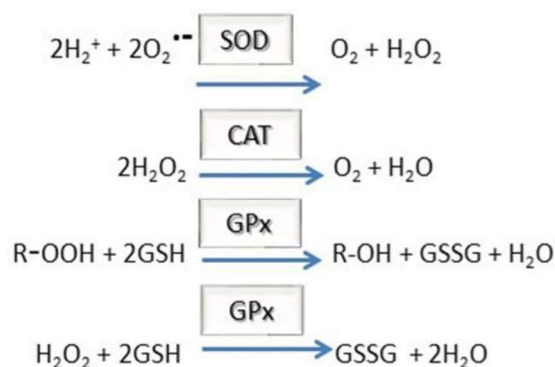


Figura 3. Reações da superóxido dismutase, catalase e glutatona redutase. (adaptado de Haliwell, 2007).

Outro importante antioxidante não enzimático é o hormônio melatonina, que atua tanto reduzindo a formação de EROs, como aumentando a atividade de enzimas antioxidantes SOD e GPx. Além disso, pode modular a produção de óxido nítrico (NO) e sua interação com os EROs, reduzindo a formação de peroxinitrito. (LU *et al.*, 2015).

A biodisponibilidade de óxido nítrico, que pode ser avaliada pelo balanço entre os níveis de espécies reativas de oxigênio e NO, é influenciada pelo estresse oxidativo (DE CASTRO *et al.*, 2014). Esse equilíbrio é essencial para prevenir danos oxidativos na maquinaria celular. Em um cenário com baixos níveis de NO ou altos níveis de EROs, o NO pode reagir com ânion superóxido e formar peroxinitrito (ONOO⁻), o que pode causar estresse nitrativo (RUSSO *et al.*, 2023). O NO é produzido principalmente pela óxido nítrico sintase (eNOS) endotelial, que é expressa no coração. Essa enzima tem um conhecido papel cardioprotetor (DE CASTRO *et al.*, 2014).

1.9 Inflamação

A inflamação tem sido cada vez mais reconhecida como um componente importante da patogênese da IC. Pacientes com IC apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β), dentre outras (TORRE-AMIONE *et al.*, 1996). A inflamação crônica no coração envolve diversas células, incluindo cardiomiócitos, fibroblastos, células inflamatórias infiltradas e células endoteliais. Essas células produzem e respondem a uma série de

mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, adesinas e fatores de crescimento (ADAMOPOULOS *et al.*, 2001).

A inflamação eficiente do miocárdio é necessária para defesa e reparo de danos ao tecido cardíaco, entretanto, quando em excesso ou de forma crônica, pode induzir grave dano tissular. Neste processo os miócitos expressam diversas moléculas para facilitar a infiltração de neutrófilos no miocárdio, como os receptores Toll-like 4 (TLR4) (YANG *et al.*, 2016). Sua ativação aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, que pode levar a respostas inflamatórias e danos adicionais ao miocárdio já lesado (ADAMOPOULOS *et al.*, 2001). O fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- κ B) pode ser ativado pela via do TLR4, por hipóxia ou estresse oxidativo, estando envolvido em uma variedade de doenças inflamatórias, inclusive no IM. Modelos de lesão de isquemia-reperfusão em camundongos mostram níveis significativamente aumentados de TLR4 e NF κ beta tanto na zona isquêmica quanto na região de risco potencial e que a apoptose de miócitos cardíacos é induzida durante o período inicial após lesão (LU *et al.*, 2016, CARRILLO-VICO *et al.*, 2005).

1.10 Apoptose

A apoptose celular apresenta um mecanismo complexo e sofisticado para eliminação programada de células danificadas ou desnecessárias, envolvendo uma cascata de eventos moleculares dependente de energia (KERR, WYLLIE e CURRIE, 1972). A via extrínseca é ativada por citocinas inflamatórias, como o TNF- α , enquanto a via intrínseca é ativada por estresse oxidativo e danos no DNA. A apoptose contribui para a progressão da IC, já que a perda de fibras cardíacas resulta na diminuição da contratilidade do miocárdio e do débito cardíaco.

A via mitocondrial (ou intrínseca) é comandada por genes pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2, como a proteína Bax, que aumenta a permeabilidade da membrana da mitocôndria, liberando no citosol o citocromo c e várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular (GOTTLIEB, 2000). De forma oposta, os genes anti-apoptóticos Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular, expressando a proteína Bcl-2, que atuam bloqueando a

liberação do citocromo c após o estímulo apoptogênico, não permitindo a ativação das caspases (GOTTLIEB, 2000). Outro gene importante na regulação do processo de morte celular é o supressor tumoral p53, que expressa a proteína p53, conhecida como indutora da apoptose e da parada do ciclo celular. Células que sofrem mutações e não são capazes de codificar este gene não sofrem apoptose (BENNETT, 1999).

1.11 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um metoxi-indol natural descrito pela primeira vez como um hormônio pineal e posteriormente demonstrado estar presente na maioria das células de mamíferos e não mamíferos. É sintetizada pela conversão inicial do triptofano em serotonina, e possui caráter anfifílico, que lhe permite atravessar as membranas celulares por difusão (CARRILLO-VICO *et al.*, 2005; PANDI-PERUMAL *et al.*, 2017). Além da melatonina produzida na glândula pineal, também se enfatiza a síntese nas células enterocromafins do trato gastrointestinal (TGI). O hormônio produzido neste local funciona como substância endócrina, autócrina, parácrina e luminal. Sugere-se, inclusive, que as concentrações diurnas deste hormônio sejam originadas do TGI. Entretanto, embora seja local de síntese de melatonina, o hormônio aparentemente é consumido no próprio TGI, mantendo baixas concentrações no organismo, não exercendo efeitos sistêmicos (BUBENIK, 2008).

Acredita-se que o seu efeito seja mediado tanto por meio de mecanismos relacionados aos receptores, como por sistemas independentes dos receptores. As ações da melatonina mediadas por receptores compreendem os receptores melatonérgicos de membrana (MT1 e MT2) localizados em todo o sistema vascular, incluindo o coração (cardiomiócitos, ventrículo esquerdo e artérias coronárias). Os receptores MT1 modulam a vasoconstrição arterial, inibem o disparo neuronal, além de influenciar as funções reprodutivas e metabólicas. Os receptores melatonérgico MT2 modulam a vasodilatação e a mudança de fase dos ritmos circadianos de disparo neuronal no núcleo supraquiasmático. Também inibem a liberação de dopamina na retina. Por outro lado, o mecanismo de ação independente do receptor da melatonina é

relacionado aos seus efeitos antioxidantes e protetores mitocondriais (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2017).

A função mais conhecida é a regulação do ritmo circadiano e os ciclos do sono-vigília, por meio da interação com os receptores melatonérgicos (CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018). Entretanto, sabe-se que este hormônio tem atuação mais ampla, por exemplo, reduzindo a peroxidação lipídica, a formação de peroxinitritos e a expressão da síntese de óxido nítrico, e aumentando a síntese de glutathione peroxidase. Ghaeli e colaboradores identificaram benefícios em pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) em razão do seu efeito antioxidante (GHAELI *et al.*, 2015). O menor nível sérico de melatonina em indivíduos pós-IAM aumenta o risco de danos cardíacos adicionais por lesão de isquemia-reperfusão, justamente pela melatonina atuar como um eliminador direto de radicais livres com alta eficácia. A melatonina também estimula indiretamente enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase, reduzindo assim o dano molecular em condições de elevado estresse oxidativo, como na lesão relacionada com o IAM (CARRILLO-VICO *et al.*, 2005; PANDI-PERUMAL *et al.*, 2017).

A melatonina também tem propriedades anti-inflamatórias, inibindo a ativação de células inflamatórias e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2017).

Diante dos efeitos benéficos citados, destaca-se outra característica importante da melatonina. Ensaios clínicos sobre a utilidade terapêutica da melatonina em diferentes campos da medicina mostram uma toxicidade muito baixa em diversas dosagens. Por exemplo, Galley e colaboradores mostraram que não houve efeitos adversos significativos após a melatonina oral em um estudo de fase 1 para escalonamento de dose em voluntários saudáveis. Foram observados somente sonolência transitória leve, sem efeitos nos padrões de sono. O estudo visava avaliar a tolerabilidade e a farmacocinética de doses de 20, 30, 50 e 100 mg de melatonina (GALLEY, 2014).

O papel terapêutico da melatonina nas doenças cardiovasculares tem apresentado benefícios potenciais na redução da lesão de isquemia-reperfusão. Os dados sugerem que a preservação dos níveis de melatonina

endógena, ou o uso de suplementos de melatonina pode ser benéfico nas doenças cardiovasculares. Ademais, a melatonina está disponível na forma farmacologicamente pura, é economicamente viável, é facilmente absorvida por qualquer via de administração, e apresenta baixa toxicidade (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2017). Diante disso, considerando o amplo impacto da IC no indivíduo e nas políticas públicas de saúde, e os profícuos resultados cardioprotetores da melatonina, faz-se necessário avaliar intervenções terapêuticas deste hormônio (BOCCHI *et al.*, 2009).

2. HIPÓTESE

Pressupõe-se que a melatonina atue protegendo o tecido miocárdico, funcionando de forma positiva na IC. Agindo como antioxidante, deve reduzir o estresse oxidativo, a expressão de proteínas inflamatórias NFκ-B, TNF-α e IL-1β e estabilizar a ação das proteínas relacionadas a apoptose (Bax).

Presume-se, ainda, que a melatonina atue positivamente nos parâmetros ecocardiográficos e histológicos.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito protetor da melatonina sobre parâmetros de estresse oxidativo, expressão de proteínas inflamatórias e relacionadas a apoptose, no coração de ratos com IC induzida por isoproterenol.

3.1 Objetivos específicos

a) Avaliar os parâmetros da ecocardiografia de ratos tratados ou não com melatonina, quanto a sua função ventricular sistólica, às espessuras parietais e ao tamanho das cavidades;

b) Analisar os níveis de espécies reativas de oxigênio, enzimas antioxidantes e danos a lipídios em ratos tratados ou não com melatonina;

c) Determinar a expressão de proteínas da via inflamatória NF- κ B, TNF- α e IL-1 β no coração de ratos com IAM tratados ou não com melatonina.

d) Estabelecer a expressão de proteínas da via apoptótica (Bax) no coração de ratos com IAM tratados ou não com melatonina.

e) Avaliar os parâmetros histológicos entre os grupos experimentais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O estudo foi realizado conforme o regulamentado pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e pelas diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Da mesma forma, os experimentos seguiram os preceitos de ética empregados pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A experimentação animal iniciou-se após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (processo número 40566).

4.2 Origem dos animais

Foram utilizados ratos Wistar machos ($n = 27$) (200 ± 50 g, 90 dias de idade) provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, e alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS em gaiolas plásticas. Receberam ração peletizada e água *ad libitum* e foram mantidos sob ciclos de 12 horas luz/ 12 horas escuro e temperatura de 21°C.

4.3 Desenho experimental e grupos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Controle, Isoproterenol (ISO) e Isoproterenol mais melatonina (ISO+M). Isoproterenol (Sigma-Aldrich, 16504-1G) dissolvido em 100µL de tampão fosfato-salino (PBS), foi utilizado para induzir lesão miocárdica nos ratos. Foi administrado a 5 mg/kg (injeção subcutânea) por 7 dias consecutivos (JING *et al.*, 2015). Após a administração de isoproterenol, a mortalidade nos grupos foi de cerca de 11% (três animais morreram por lesão cardíaca: um rato do grupo ISO e dois ratos do grupo ISO + M). Como resultado, o número amostral dos grupos foi o seguinte: Controle ($n = 9$), ISO ($n = 8$) e ISO + M ($n = 7$). Ratos ISO + M

receberam 10mg/kg/dia de melatonina (Sigma-Aldrich, M5250-1G) diluída em solução salina, por gavagem por 7 dias (SIMKO *et al.*, 2014). Os animais do grupo Controle receberam solução salina por via subcutânea e os grupos não tratados (Controle e ISO) receberam apenas solução salina por gavagem (Figura 4). O protocolo descrito foi realizado regularmente pela manhã, entre as 8 horas e 10 horas. Os animais foram pesados diariamente para monitorar o ganho de peso e ajustar as doses de melatonina administradas.

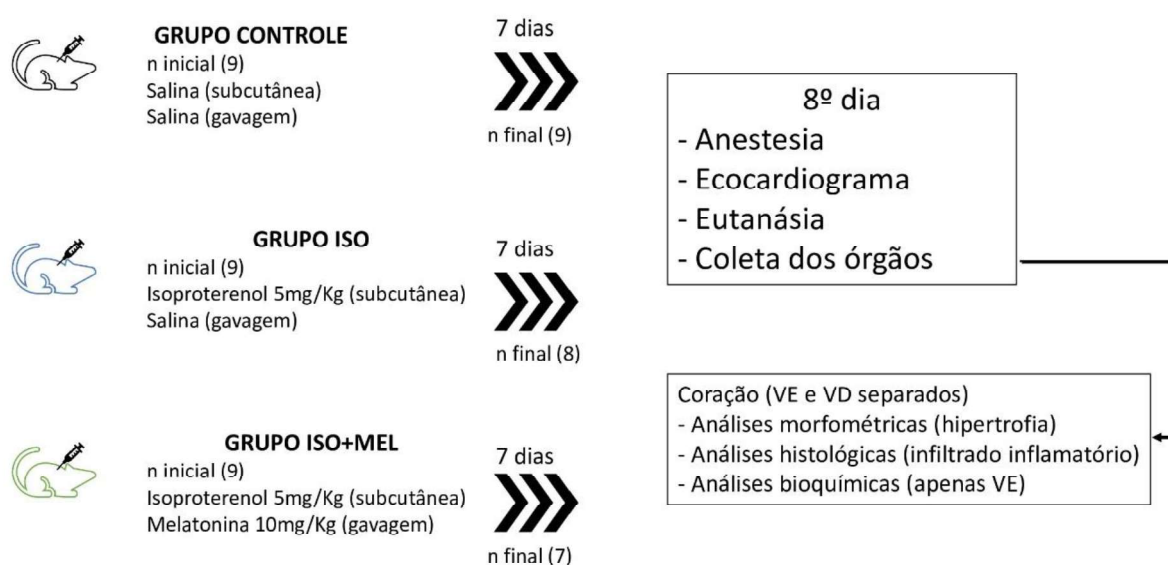


Figura 4. Esquema representativo do desenho experimental.

4.4 Avaliação ecocardiográfica e morfométrica

Os parâmetros ecocardiográficos do ventrículo esquerdo (VE) foram avaliados após o término do tratamento (no oitavo dia). As análises foram realizadas com sistema de ultrassom Philips HD7 XE com transdutor L2-13 MHz. Os ratos foram anestesiados e posicionados em decúbito lateral esquerdo para obtenção das imagens. Os diâmetros (em cm) sistólico (DS) e diastólico (DD) do VE foram avaliados pelo modo-M nos seguintes planos: basal, médio e apical. As áreas transversas sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (cm²) foram obtidas traçando-se a borda endocárdica em três níveis: basal, médio e apical (TAVARES *et al.*, 2010). As espessuras diastólica e sistólica da parede anterior e posterior do VE (cm) foram obtidas nos mesmos planos utilizando o modo-M (NOZAWA *et al.*, 2006). Os valores da fração de

encurtamento do VE (FEVE) foram obtidos utilizando-se a seguinte equação: $FEVE = \frac{DD-DS}{DD} \times 100$. A tensão de parede, o débito sistólico do VE, os volumes sistólico final e diastólico final do VE foram medidos conforme previamente descrito (TAVARES *et al.*, 2010).

Após avaliação ecocardiográfica, os animais sofreram eutanásia por overdose de anestésico. O tecido cardíaco foi rapidamente removido e medidas as massas dos VE e VD separadamente. A hipertrofia cardíaca e a hipertrofia ventricular esquerda foram calculadas usando a razão entre a massa do coração e a massa do VE em relação à massa corporal (mg/g) (DE CASTRO *et al.*, 2015). Parte do tecido cardíaco foi separado para avaliação histológica, bioquímica e molecular. O tecido cardíaco utilizado para essas últimas análises foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido (Figura 4).

4.5 Análise histológica

Para os estudos histológicos, os VE foram cortados no plano transversal e imersos em formalina tamponada a 10%, processados em concentrações crescentes de álcool e xilol e parafinizados em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Após, os ventrículos em parafina foram cortados com 4 μ m de espessura, fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE) (ZIMMER *et al.*, 2020). As lâminas de HE foram analisadas por um patologista especialista, de forma cega, para a presença de infiltrado inflamatório, que foi qualitativamente definido como ausente ou presente. Se presente, foi classificada em leve, moderada ou intensa, de acordo com a quantidade de células inflamatórias e extensão do infiltrado (ZIMMER *et al.*, 2020).

4.6 Preparação tecidual e medição da concentração de proteínas

O tecido ventricular foi homogeneizado em Ultra-Turrax usando fluoreto de fenil metilsulfonil 20 mmol/L e 1,15% p/v KCl. A suspensão foi submetida à centrifugação a 1000 g por 10 min a 0–4 °C para remoção dos restos celulares e núcleos. As análises bioquímicas foram realizadas utilizando-se os sobrenadantes (LLESUY *et al.*, 1985). Os níveis de proteína foram medidos

pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), e a albumina de soro bovino foi usada como padrão.

4.7 Avaliação de nitritos

Os nitritos (NO_2^-) foram determinados usando o reagente *Griess*, no qual um cromóforo com forte absorvância a 540 nm é formado pela reação do nitrito com uma mistura de Naftil-1-N-Etilenodiamina (0,1 %) e sulfanilamida (1 %). Os resultados foram expressos em mmol/L por miligrama de proteína (GRANGER *et al.*, 1999).

4.7.1 Determinação dos níveis de EROs

A geração de EROs foi medida por emissão de fluorescência de 20,70-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA). Na presença de EROs intracelulares, a DCFH-DA, que é permeável à membrana, rapidamente é oxidada em 2,7-diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente. As amostras foram excitadas a 488 nm. Essa emissão foi coletada com um filtro de passagem longa com 525 nm de comprimento, sendo expressa em nmols por miligrama de proteína (LEBEL *et al.*, 1992).

4.7.2 Determinação de grupos sulfidrila totais

A quantidade total de grupos sulfidril (-SH) nos homogeneizados de VD foi determinada de acordo com Sedlak e Lindsay. Foi lida a densidade óptica a 412 nm em espectrofotômetro em comparação com controle branco apropriado. A concentração de grupos sulfidril total foi expressa em pmol/mg proteína (SEDLAK e LINDSAY, 1968).

4.7.3 Método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para o ensaio de TBARS, foi adicionado ácido tricloroacético (10% p/v) ao homogeneizado para precipitar proteínas e acidificar amostras. Essa mistura

foi então centrifugada (1.000 g, por 3 min). A amostra livre de proteínas foi extraída e o ácido tiobarbitúrico (0,67% p/v) foi adicionado ao meio. Os tubos foram colocados em banho-maria (100 °C) por 15 min. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 535 nm. Como padrão foi utilizado malondialdeído comercial. Os resultados foram expressos em micromole por miligrama de proteína ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) (BUEGE e AUST, 1978).

4.7.4 Avaliação de Western Blot

Após homogeneização do VE e eletroforese de proteínas, as amostras (100 μg de proteína) foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio em sistema descontínuo, utilizando géis de separação e empilhamento de 8–14% (p/v) (LAEMMLI, 1970). Para a detecção foram utilizados os seguintes anticorpos: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (140 kDa), NF- κ B (65 kDa), TNF- α (26 kDa), IL-1 β (31 kDa) e Bax (20 kDa) (Santa Cruz, Santa Cruz Biotecnologia ou Tecnologia de Sinalização Celular Beverly, MA). Anticorpos primários foram detectados usando anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo, conjugados com *horseradish* peroxidase. Reagentes de detecção por quimioluminescência foram usados para desenvolver as membranas, e as autorradiografias geradas foram medidas quantitativamente com um densitômetro de imagem (*Image J*, *National Institutes of Health*, EUA). Para determinar os pesos moleculares das bandas, foi utilizado como referência um marcador de peso molecular padrão (RPN 800 *rainbow full range Bio-Rad*, CA, EUA). Os dados foram normalizados pelo método de Ponceau S (KLEIN *et al.*, 1995).

4.8 Análise estatística

Os dados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e analisados pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguida do pós-teste de *Student-Newman-Keuls*. Os dados não paramétricos foram expressos como mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*. Significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software Sigma*

Plot 12.0. Todos os gráficos foram criados com o *software GraphPad Prism* (versão 5.0).

4.9 Descarte de materiais biológicos e químicos

Os resíduos produzidos no experimento foram classificados em três grupos de acordo com a RDC ANVISA nº 306/04 e Resolução CONAMA nº 358/05: Grupo A que engloba os componentes biológicos, como as carcaças de animais e material contaminado; Grupo B referente a substâncias químicas; e o Grupo E para materiais perfurocortantes. O manejo dos resíduos como a segregação, condicionamento, armazenamento, coleta, transporte, tratamento e disposição final foi realizado de acordo com as normas do departamento de Fisiologia da UFRGS.

6. CONCLUSÕES

O papel terapêutico da melatonina nas doenças cardiovasculares vem se consolidando, especialmente no que tange aos benefícios potenciais na redução da lesão isquêmica. Neste estudo a melatonina apresentou efeitos cardioprotetores no modelo de lesão cardíaca induzida pelo isoproterenol. Dentre estes, destaca-se que a melatonina:

- Promoveu aumento da biodisponibilidade do NO;
- Atuou na redução da expressão de NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias;
- Agiu na atenuação do remodelamento do VE;
- Auxiliou na redução do infiltrado inflamatório do VD.

Desse modo, os resultados apontam a melatonina como uma possível aliada para mitigar os efeitos da lesão cardíaca. No entanto, mais estudos em modelos animais são necessários para definir a dose de melatonina e a duração ideal do tratamento, a fim de trazer esses resultados de testes em animais para a aplicação clínica

7. PERSPECTIVAS

Embora a relevância da melatonina esteja se ampliando com a progressiva realização de estudos, o conhecimento a respeito dos seus efeitos terapêuticos ainda é incipiente. Para permitir que os avanços científicos neste campo se traduzam em benefícios na prática clínica, especialmente no que tange às doenças cardiovasculares, muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas.

Uma alteração sutil no protocolo deste estudo pode ser realizada para trabalhos futuros. Por exemplo, analisar se o papel cardioprotetor da melatonina é capaz de variar se administrada em período prévio à indução de IC por isoproterenol. Ou ainda, se a continuidade do tratamento com melatonina posteriormente ao fim do protocolo de indução da IC traria efeitos diversos dos já conhecidos.

Também, compreende-se que a melatonina exógena é considerada uma substância segura, bem tolerada e com poucos efeitos colaterais, não apresentando sintomas de retirada, e, principalmente, apresenta efeitos cardioprotetores importantes. Dessa forma, torna-se necessário o estudo da melatonina em modelos de IC com maior tempo de duração, assim como ensaios clínicos mais extensos e de grande porte, a fim de avaliar sua eficácia como uma nova intervenção terapêutica para doenças cardiovasculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOPOULOS, Stamatis, PARISSIS, John T, KREMASTINOS, Dimitrios Th. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. **European journal of heart failure**, v. 3, n. 5, p. 517-26, 2001.

AL-RASHEED, Nouf M, AL-OTEIBI, Maha M, AL-MANEE, Reem Z, *et al.* Simvastatin prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through modulation of the JAK/STAT pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, Place., v., n., p. 3217-29, 2015.

ALTHUNIBAT, Osama Y, ABDUH, Maisa Siddiq, ABUKHALIL, Mohammad H, *et al.* Umbelliferone prevents isoproterenol-induced myocardial injury by upregulating Nrf2/HO-1 signaling, and attenuating oxidative stress, inflammation, and cell death in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 149, n., p. 112900, 2022.

BALTATU, Ovidiu C, AMARAL, Fernanda G, CAMPOS, Luciana A, *et al.* Melatonin, mitochondria and hypertension. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, n., p. 3955-64, 2017.

BALTATU, Ovidiu Constantin, SENAR, Sergio, CAMPOS, Luciana Aparecida, *et al.* Cardioprotective melatonin: translating from proof-of-concept studies to therapeutic use. **International Journal of Molecular Sciences**, Place., v. 20, n. 18, p. 4342, 2019.

BENNETT, Martin R. Mechanisms of p53-induced apoptosis. **Biochemical pharmacology**, v. 58, n. 7, p. 1089-1095, 1999.

BLANCO, Santos, HERNÁNDEZ, Raquel, FRANCHELLI, Gustavo, *et al.* Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. **Nitric Oxide**, v. 62, n., p. 32-43, 2017.

BOCCHI, Edimar Alcides, BRAGA, Fabiana Goulart Marcondes, FERREIRA, Silvia Moreira Ayub, *et al.* III Brazilian guidelines on chronic heart failure. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 93, n. 1 Suppl 1, p. 3-70, 2009.

BORON, Walter F.; BOULPAEP, Emile L. O coração como bomba. In: BORON, Walter F.; BOULPAEP, Emile L. **Fisiologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 529-553.

BROOKS, Wesley W, CONRAD, Chester H. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates.

Comparative medicine, v. 59, n. 4, p. 339-43, 2009.

BUEGE, John A, AUST, Steven D. [30] Microsomal lipid peroxidation.

Methods in enzymology. 52: Elsevier; 1978. p. 302-10.

BUBENIK, G. A. Thirty four years since the discovery. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, n. 2, p. 33-51, 2008.

CAMACHO, Paula, FAN, Huimin, LIU, Zhongmin, *et al.* Small mammalian animal models of heart disease. **American journal of cardiovascular disease**, Madison, v. 6, n. 3, p. 70, 2016.

CARRILLO-VICO, Antonio, GUERRERO, Juan M, LARDONE, Patricia J, *et al.* A review of the multiple actions of melatonin on the immune system.

Endocrine, v. 27, n., p. 189-200, 2005.

CIPOLLA-NETO, José; AMARAL, Fernanda Gaspar do. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 6, p. 990-1028, 2018.

COGGINS, Matthew, ROSENZWEIG, Anthony. The fire within: cardiac inflammatory signaling in health and disease. **Circulation research**, Place., v. 110, n. 1, p. 116-25, 2012.

COLUCCI, Wilson S, SAWYER, Douglas B, SINGH, Krishna, *et al.* Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. **Journal of cardiac failure**, Place., v. 6, n. 2 Suppl 1, p. 1-7, 2000.

DE CASTRO, Alexandre Luz, TAVARES, Angela Vicente, CAMPOS, Cristina, *et al.* Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 391, n. 1-2, p. 22-9, 2014.

DE CASTRO, Alexandre Luz, TAVARES, Angela Vicente, FERNANDES, Rafael Oliveira, *et al.* T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in the myocardium of infarcted rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 408, n., p. 235-43, 2015.

DE CASTRO, Alexandre Luz, FERNANDES, Rafael Oliveira, ORTIZ, Vanessa D, *et al.* Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction. **Apoptosis**, v. 21, n., p. 184-94, 2016.

DE CASTRO, Alexandre Luz, FERNANDES, Rafael Oliveira, ORTIZ, Vanessa D, *et al.* Thyroid hormones decrease the proinflammatory TLR4/NF- κ B pathway and improve functional parameters of the left ventricle of infarcted rats. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 461, n., p. 132-42, 2018.

DEGER, Necla, OZMEN, Rifat, KARABULUT, Derya. Thymoquinone regulates nitric oxide synthase enzymes and receptor-interacting serine-threonine kinases in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **Chemico-Biological Interactions**, Place., v. 365, n., p. 110090, 2022.

DE PAOLI, Petra., CERBAI, Elisabetta, KOIDL, Bernd, *et al.* Selectivity of different calcium antagonists on T- and L-type calcium currents in guinea-pig ventricular myocytes. **Pharmacological research**, v. 46, p. 491-497, 2002.

DORN, Gerald W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 49, n. 5, p. 962-70, 2007.

EL-SHAER, NO, EL GAZZAR, WB, ALLAM, MM, *et al.* Ghrelin ameliorated inflammation and oxidative stress in isoproterenol induced myocardial infarction through the endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (NRF2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **J Physiol Pharmacol**, Place., v. 72, n. 2, p. 273-82, 2021.

EVY, Daniel, GARRISON, Robert J, SAVAGE, Daniel D, *et al.* Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 22, p. 1561-6, 1990.

FENDER, Anke C, DOBREV, Dobromir. Nitric oxide as a fragile switch between cardioprotection and cardiac injury. **International Journal of Cardiology**, v. 343, n., p. 102-3, 2021.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, n., p. 97-112, 1995.

GALLEY, Helen F, LOWES, Damon A, ALLEN, Lee, *et al.* Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis. **Journal of pineal research**, v. 56, n. 4, p. 427-38, 2014.

GHAELI, Padideh *et al.* Effect of melatonin on cardiac injury after primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 14, n. 3, p. 851, 2015.

GOLDSPINK, David F, BURNISTON, Jatin G, ELLISON, Georgina M, *et al.* Catecholamine-induced apoptosis and necrosis in cardiac and skeletal myocytes of the rat in vivo: the same or separate death pathways? **Experimental physiology**, Place., v. 89, n. 4, p. 407-16, 2004.

GOMES, AC, FALCAO-PIRES, I, PIRES, AL, *et al.* Rodent models of heart failure: an updated review. **Heart failure reviews**, Norwell, v. 18, n., p. 219-49, 2013.

GOTTLIEB, Roberta A. Role of mitochondria in apoptosis. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 10, n. 3&4, 2000.

GRANGER, Donald L, ANSTEY, Nicholas M, MILLER, William C, *et al.* Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods in enzymology**, v. 301, n., p. 49-61, 1999.

GRIMM, Michael, BROWN, Joan Heller. β -Adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 48, n. 2, p. 322-30, 2010.

GUYTON, Arthur C.; HALL, Michael E.; HALL, John E.. **Tratado de fisiologia médica**. 14. ed RIO DE JANEIRO: Grupo GEN, 2021.

GUZIK, T, KORBUT, R, ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation. **J physiol pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 469-87, 2003.

HALLIWELL, Barry, GUTTERIDGE, John MC. Free radicals in biology and medicine: Ed 4. Clarendon Press, Oxford, USA, 2006.

HEYMANS, Stephane, PAUSCHINGER, Matthias, DE PALMA, Armando, *et al.* Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix

metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. **Circulation**, Dallas, v. 114, n. 6, p. 565-73, ago. 2006.

HOGG, Neil, KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1411, n. 2-3, p. 378-84, 1999.

HOU, Guoqiang, CHEN, Hongjin, YIN, Yuhua, *et al.* MEL ameliorates post-SAH cerebral vasospasm by affecting the expression of eNOS and HIF1 α H19/miR-138/eNOS/NO and H19/miR-675/HIF1 α . **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 19, n., p. 523-32, 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa nacional de saúde: 2019: percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e grandes regiões/IBGE, coordenação de trabalho e rendimento.** Rio de Janeiro: IBGE; 2020.

IWASAKA, Toshiji, SUGIURA, Tetsuro, NAKAMURA, Seishi, *et al.* Left ventricular function in myocardial infarction: predictive value during negative low-level exercise three weeks postinfarction. **Chest**, v. 102, n. 2, p. 335-40, 1992.

JING, Lei, WANG, Yun, ZHAO, Xiao-Min, *et al.* Cardioprotective effect of hydrogen-rich saline on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Heart, Lung and Circulation**, v. 24, n. 6, p. 602-10, 2015.

JOHNS, Thomas NP, OLSON, Byron J. Experimental myocardial infarction: I. A method of coronary occlusion in small animals. **Annals of surgery**, Philadelphia, v. 140, n. 5, p. 675, 1954.

JONES, Dean P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-79, 2006.

KERR, John FR; WYLLIE, Andrew H.; CURRIE, Alastair R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KLEIN, Deborah, KERN, Rita M, SOKOL, Rebecca Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 36, n. 1, p. 59-66, 1995.

KOEPPEN, Bruce M., STANTON, Bruce A. BERNE e LEVY: Fisiologia. 6ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KRENEK, Peter, KMECOVA, Jana, KUCEROVA, Dana, *et al.* Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. **European journal of heart failure**, v. 11, n. 2, p. 140-6, 2009.

LAEMMLI, Ulrich Karl. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LEBEL, Carl P, ISCHIROPOULOS, Harry, BONDY, Stephen C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227-31, 1992.

LI, Man, LI, Xuewen, YANG, Lifeng. Cardioprotective effects of garcinol following myocardial infarction in rats with isoproterenol-induced heart failure. **AMB Express**, Place., v. 10, n. 1, p. 1-7, 2020.

LLESUY, Susana F, MILEI, José, MOLINA, Hugo, *et al.* Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori Journal**, v. 71, n. 3, p. 241-9, 1985.

LOWRY, OliverH *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LU, Li, CHEN, Sue S, ZHANG, John Q, *et al.* Activation of nuclear factor- κ B and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 321, n. 4, p. 879-85, 2004.

LU, Meili, TANG, Futian, ZHANG, Jing, *et al.* Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats via regulation of toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 4, p. 599-606, 2015.

MAARMAN, Gerald, BLACKHURST, Dee, THIENEMANN, Friedrich, *et al.* Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension. **Journal of pineal research**, v. 59, n. 3, p. 343-53, 2015.

MEERAN, MF Nagoor, AZIMULLAH, Sheikh, ADEGHATE, Ernest, *et al.* Nootkatone attenuates myocardial oxidative damage, inflammation, and apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Phytomedicine**, v. 84, n., p. 153405, 2021.

MONNET, Eric, CHACHQUES, Juan Carlos. Animal models of heart failure: what is new? **The Annals of thoracic surgery**, Boston, v. 79, n. 4, p. 1445-53, abr. 2005.

MUKHERJEE, Debasri, GHOSH, Arnab K, BANDYOPADHYAY, Arun, *et al.* Melatonin protects against isoproterenol-induced alterations in cardiac mitochondrial energy-metabolizing enzymes, apoptotic proteins, and assists in complete recovery from myocardial injury in rats. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 2, p. 166-79, 2012.

NICHTOVA, Zuzana, NOVOTOVA, Marta, KRALOVA, Eva, *et al.* Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. **Gen Physiol Biophys**, v. 31, n. 2, p. 141-51, 2012.

NOZAWA, E, KANASHIRO, RM, MURAD, N, *et al.* Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n., p. 687-95, 2006

ONAI, Yasuyuki, SUZUKI, Jun-ichi, MAEJIMA, Yasuhiro, *et al.* Inhibition of NF- κ B improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Place., v. 292, n. 1, p. H530-H8, 2007.

PANDI-PERUMAL, Seithikurippu R. *et al.* Melatonin and human cardiovascular disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 122-132, 2017.

PATEL, Vaibhav, UPAGANLAWAR, Aman, ZALAWADIA, Rishit, *et al.* Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: a biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural

evaluation. **European journal of pharmacology**, v. 644, n. 1-3, p. 160-8, 2010.

PEREZ-VIZCAINO, Francisco, COGOLLUDO, Angel, MORENO, Laura. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 174, n. 3, p. 212-20, 2010.

PFEFFER, Marc A, BRAUNWALD, Eugene. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation**, v. 81, n. 4, p. 1161-72, 1990.

PONIKOWSKI, Piotr, VOORS, Adriaan A, ANKER, Stefan D, *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. **Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)**, Place., v. 74, n. 10, p. 1037-147, 2016.

PRINCE, Ponnian Stanely Mainzen, PRISCILLA, Hansi, DEVIKA, Periathambi Thangappan. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 615, n. 1-3, p. 139-43, 2009.

ROHDE, Luis Eduardo Paim. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. **Arq Bras Cardiol**, v. 111, n. 3, p. 436-539, 2018.

RUSSO, Isabella, BARALE, Cristina, MELCHIONDA, Elena, *et al.* Platelets and Cardioprotection: The Role of Nitric Oxide and Carbon Oxide. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6107, 2023.

SAMAK, Mostafa, FATULLAYEV, Javid, SABASHNIKOV, Anton, *et al.* Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis. **Medical science monitor basic research**, v. 22, n., p. 75, 2016.

SAXENA, Amit, RUSSO, Ilaria, FRANGOGIANNIS, Nikolaos G. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. **Translational Research**, v. 167, n. 1, p. 152-66, 2016.

SCOTT, Mark D, LUBIN, Bertram H, ZUO, Lin, *et al.* Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991.

SEDLAK, Jozef, LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n., p. 192-205, 1968.

SHUKLA, Santosh K, SHARMA, Suman B, SINGH, Usha R. β -Adrenoreceptor agonist isoproterenol alters oxidative status, inflammatory signaling, injury markers and apoptotic cell death in myocardium of rats. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 30, n., p. 27-34, 2015.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**, 7ª Edição, Artmed, 2017.

SIMKO, Fedor, BEDNAROVA, Kristina Repova, KRAJCIROVICOVA, Kristina, *et al.* Melatonin reduces cardiac remodeling and improves survival in rats with isoproterenol-induced heart failure. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p. 177-84, 2014.

SLOMINSKI, Andrzej T, ZMIJEWSKI, Michal A, SEMAK, Igor, *et al.* Melatonin, mitochondria, and the skin. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, n., p. 3913-25, 2017.

SZENCZI, Orsolya, KEMECSEI, Péter, HOLTHUIJSEN, Max FJ, *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 69, n. 5, p. 725-32, 2005.

TANG, Mingxin, ZHANG, Xiaoying, LI, Yingxin, *et al.* Enhanced basal contractility but reduced excitation-contraction coupling efficiency and β -adrenergic reserve of hearts with increased Cav1. 2 activity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 299, n. 2, p. H519-H28, ago. 2010.

TAVARES, Angela Maria Vicente, DA ROSA ARAÚJO, Alex Sander, BALDO, Guilherme, *et al.* Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. **Life sciences**, v. 87, n. 23-26, p. 699-706, 2010.

TORDJMAN, Sylvie, CHOKRON, Sylvie, DELORME, Richard, *et al.* Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. **Current neuropharmacology**, v. 15, n. 3, p. 434-43, 2017.

TORRE-AMIONE, Guillermo, KAPADIA, Samir, BENEDICT, Claude, *et al.* Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 27, n. 5, p. 1201-6, 1996.

VIRANI, Salim S, ALONSO, Alvaro, APARICIO, Hugo J, *et al.* Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 143, n. 8, p. e254-e743, 2021.

WEI, Michael, ONG, Leslie, SMITH, Maree T, *et al.* The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart, Lung and Circulation**, v. 12, n. 1, p. 44-50, 2003.

WONG, Zheng Wei, THANIKACHALAM, Punniyakoti Veeraveedu, RAMAMURTHY, Srinivasan. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, n., p. 1145-66, 2017.

World Health Organization (WHO). Fact Sheets. **Cardiovascular Disease**. 2021. Disponível em: [https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 16 out. 2023.

WU, Chin-Chen, CHIAO, Chin-Wei, HSIAO, George, *et al.* Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 3, p. 147-56, 2001.

XIAO, Li, HE, Huimin, MA, Lele, *et al.* Effects of miR-29a and miR-101a expression on myocardial interstitial collagen generation after aerobic exercise in myocardial-infarcted rats. **Archives of medical research**, v. 48, n. 1, p. 27-34, 2017.

YANG, Y, LV, J, JIANG, S, *et al.* The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. **Cell death & disease**, v. 7, n. 5, p. e2234-e, 2016.

YATANI, Atsuko, TAJIMA, Yasuhiro, GREEN, Stuart A. Coupling of β -adrenergic receptors to cardiac L-type Ca^{2+} channels: preferential coupling of

the β_1 versus β_2 receptor subtype and evidence for PKA-independent activation of the channel. **Cellular signalling**, v. 11, n. 5, p. 337-42, 1999.

ZHANG, Weihua, ELIMBAN, Vijayan, NIJJAR, Mohinder S, *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 8, n. 4, p. 173, 2003.

ZHANG, Yong-gang, LI, Yu-guang, LIU, Bao-guo, *et al.* Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol. **Acta pharmacologica sinica**, v. 28, n. 1, p. 36-43, 2007.

ZIMMER, A, TEIXEIRA, RB, BONETTO, JHP, *et al.* Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 464, n., p. 93-109, 2020.