

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina

Patrícia Aparecida Borim

**Potencial terapêutico do partenolide, inibidor
de inflamassoma, no infarto experimental do
miocárdio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia
em Clínica Médica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Marina Politi Okoshi**

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. **Mariana Gatto**

Patricia Aparecida Borim

**Potencial terapêutico do partenolide, inibidor
de inflamassoma, no infarto experimental do
miocárdio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia
em Clínica Médica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. ***Marina Politi Okoshi***

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. **Mariana Gatto**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Borim, Patricia Aparecida.

Potencial terapêutico do partenolide, inibidor de inflamassoma, no infarto experimental do miocárdio / Patricia Aparecida Borim. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marina Politi Okoshi

Coorientador: Mariana Gatto

Capes: 4.00.00.

1. Fibrose. 2. Infarto do Miocárdio. 3. Inflamassomos.
4. Remodelação Ventricular.

Palavras-chave: Fibrose; Infarto agudo do miocárdio; Inflamassoma; Partenolide.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PATRICIA APARECIDA BORIM, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 14:00 horas, no(a) Bloco 5 - Unidade de Pesquisa Experimental - Unipex, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de PATRICIA APARECIDA BORIM, intitulada **Potencial terapêutico do partenolide,**

inibidor de inflamassoma, no infarto experimental do miocárdio. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI

(Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu -

Unesp, Profa. Dra. MELIZA GOI ROSCANI (Participação Virtual) do(a) Depto. de Medicina /

CCBS/São Carlos - UFSCar, Prof. Dr. MARCELO DIARCÁDIA MARIANO CEZAR (Participação

Presencial) do(a) Treinador e Coordenador de Atletismo - Botucatu/SP. Após a exposição

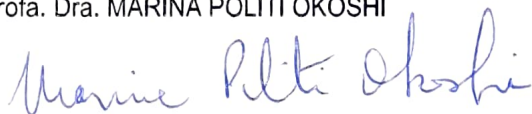
pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram

do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada

_____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi

assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI



Epígrafe

“Coisas boas nos acontecem quando a gente acredita, quando a gente tem fé, quando a gente coloca Deus a frente da nossa vida. Dificuldades todos nós temos, a diferença é que uns assumem, outros disfarçam, uns desistem de lutar e outros lutam por ainda acreditar”

Cecília Sfalsin

Às pessoas que foram e são as mais importantes da minha vida! Aos meus avós Laurentina dos Santos e Nelson Lopes, Tia Lázara dos Santos e minha mãe Margarida Messsias Borim (in memorian), Ao meu pai Odemar Luiz Borim aos meus irmãos Luiz Henrique Borim, Vicente José Borim, Tiago Messias Borim e minha irmã Adriana Ap. Borim. Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram e fazem por mim!!!!

DEDICO

Agradecimientos



Agradecimento especial

Mãe

Quando uma pessoa de valores vai embora da nossa vida, a única forma de sobreviver e dar conta disso é trazê-la morar dentro de nós no nosso coração até termos a oportunidade de viver o definitivo de um dia reencontra-los. E assim toda vez que falo de amor, a primeira pessoa que me vem à mente é minha mãe (Senhora Margarida). Essa fez parte do meu currículo, sendo sua história o melhor livro que li na minha vida e nossa convivência foi muito especial.... Mãe, companheira, amiga, confidente, ela me ensinou o valor da vida.

Passe o tempo que passar, vou me lembrar dos seus gestos, conselhos e de cada detalhe quando estávamos juntas, da forma que se preocupava e cuidava de todos nós "família". Minha master chef preferida, como gostava de cozinhar e agradar cada paladar, sua terapia predileta era cuidar das plantas, principalmente do seu lindo orquidário, imagino que até essas sentem a falta da maciez das suas mãos tão delicadas.. Imagino então, seus três pequenos indefesos cachorrinhos "Teló, Nenê e Lord", seus companherinhos inseparáveis, que hoje substituíram ao nosso carinho e amor para com eles.

Lembro do orgulho que sentia de quando perguntavam de mim, logo respondia com muita satisfação: "Ahh, a 'Patrícia' faz doutorado na Unesp" e ultimamente: "Ahh, a 'Patricia' está finalizando o doutorado na Unesp"... Quanto orgulho tinha de mim...

Lembro de cada detalhe dessa pessoa tão especial, e sem sombra de dúvidas e sem medo de ser injusta, de todos que já passaram na minha vida, a pessoa que mais deixou marcas e valores no meu coração foi ela - Dona Margarida. Aprendo que tudo é o agora e peço a Deus por nunca desaprender dessa lição.

Agradeço também a Deus por estar junto dela antes, após cirurgia e nos últimos dias da sua vida, e faria tudo novamente... Daria banho, dormiria numa cadeira ou num colchão, no chão, ou simplesmente

passaria a noite sem dormir. Agradeço por ter lhe dado o último
golinho de água, penteado seus lindos cabelos compridos, massageado
suas pernas.....assim Deus achou melhor fazer mais uma estrela brilhar
no céu de forma tranquila e serena.

A senhora foi e será o meu maior exemplo de ser humano a ser seguido
no plano terrestre.

Que seus ensinamentos me conduzam para que eu possa ser sempre uma
pessoa melhor e tentar fazer a diferença na vida das pessoas.

Ohhh, minha mãe... uma única coisa quero dizer: Que saudades eu
sinto da senhora!!!

Eu tenho muito orgulho de ter sido sua filha e muita admiração pela
mãe guerreira que sempre foi. Obrigada por tudo. Espero que onde
estiver, esteja orgulhosa de mim, porquê eu era seu orgulho.

Te Amo Eternamente!

Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar-me, pois só nele encontro paz e força que preciso para continuar. Ele me guia e abençoa a cada instante de minha vida. Agradeço-o a todo momento pela oportunidade proporcionada nessa minha vida de conseguir chegar tão longe, almejando sempre o melhor.

Este trabalho foi feito com muito amor e carinho, no entanto, ele não seria realizado sem a ajuda de pessoas, amigos e profissionais, que de forma direta ou indiretamente colaboraram para que este objetivo fosse concretizado. A colaboração, não apenas em termos científicos e práticos, mas também como um incentivo, um conselho, uma palavra de motivação, uma conversa, compreensão, etc. Todas as pessoas listadas abaixo são muito especiais e serão lembradas eternamente, espero ter lembrado de todas. Desde já muito obrigada e Deus abençoe a todos.

Aos meus familiares em geral, que caminharam comigo nessa longa jornada, que me auxiliaram quando foi preciso e me deram apoio incondicional. Amo vocês.

Ao meu querido pai Odemar Luiz Borim, minha inspiração diária, homem íntegro e trabalhador. Nele consigo ter coragem de seguir em frente e vejo que não posso desanimar. Agradeço a Deus por ter o melhor pai do Mundo.

Ao meu irmão mais velho Luiz Henrique... teve participação inquestionável no início da minha graduação, na qual nos formamos juntos! Sem sua ajuda, meu irmão, com certeza não estaria aqui hoje. Obrigada por sempre acreditar em mim.

À minha orientadora Profª. Drª. Marina Politi Okoshi, por ter aceitado me orientar, por acreditar, incentivar e sempre estar ao meu

lado. Minha eterna gratidão e admiração pela profissional diferenciada que é, levarei para sempre na minha memória. Agradeço pelos conselhos em tornar-me uma pessoa íntegra, disciplinada e competente. Muito obrigada de coração Profa Marina, por participar dessa etapa tão importante da minha formação!

Agradeço à minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Mariana Gatto, na qual tive a oportunidade de conviver no decorrer do aprimoramento no departamento de Doenças Tropicais, e que me incentivou a ingressar na Pós-Graduação, e me incentiva até hoje a continuar na carreira acadêmica. Obrigada Mari, por compartilhar comigo seu amplo conhecimento, por confiar em mim, por acreditar na minha capacidade, por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas e me ajudar. Sem você seria impossível chegar até aqui. Você é muito especial na minha vida, Deus te abençoe sempre.

À minha amiga irmã de moradia, academia, e de pós-graduação, Beatriz Pereira, obrigada por todo o companheirismo e apoio. Começamos e terminamos juntas esse árduo, porém gratificante, caminho da pós-graduação e agradeço por compartilhar comigo momentos de frustrações, desespero, desanimo, mas na maioria das vezes, momentos de alegria e divertimento principalmete numa taça de vinho. Obrigada pela sinsera amizade minha querida amiga irmã. Seu futuro será brilhante.

À minha querida amiga Francilene Capel, com a qual tive o prazer de conviver logo que cheguei em Botucatu. Você foi minha isnpiração. Obrigada pelo incentivo e principalmente pela amizade, carinho e por torcer tanto por mim. Tenho admiração por esse coração gigante que você tem. Você é especial.

Às minhas cunhadas Lediana e Michele, ao meu querido sobrinho Guilherme e à minha sobrinha Helena que já amo mesmo antes de conhecer.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer do Laboratório de insuficiência cardíaca; Mariana Janini, Luana, Lidiane, Felipe, Leiliane, Éder, Ana Clara e Gustavo, agradeço pela ajuda em toda essa trajetória, pelos ensinamentos das técnicas no laboratório, pelas risadas, pelos choros e pelo companheirismo. Aos alunos de iniciação científica, em especial Ana Luiza (que seu futuro seja iluminado), Ana Paula, João e Rafael.....Deus abençoe cada um de vocês!!

Ao Prof. Dr. Katashi Okoshi, agradeço pela avaliação ecocardiográfica de todos os animais desse trabalho, bem como pela disposição e paciência em nos ensinar.

Ao Prof. Dr. Leonardo Zornoff pela cirurgia de indução de infarto nos animais.

Aos funcionários da Unipex Unidade de pesquisa experimental –, em especial ao Zé Georgette, Vick, Leandro, Dijon, Regina Moreto, Ana Paula Doria, Xuxa, Bardella, Ana Cordela, Silvio, Zé (dos gatos), Denise, Esmite, Rogerinho, Danilo, Jaqueline, Luciana, Escube, Flávia, obrigada pela cooperação, gentileza e apoio para a realização desta tese.

Às meninas da limpeza Dona Lurdes, Daiane, Andréia e Telma sempre tão simpáticas e educadas.

Meus sinceros agradecimentos...

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP;
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES,
pelo suporte financeiro.

À Dr^a Danielle Vileigas e Dr^a Fernanda Chiuso Minicucci, pelas valiosas orientações proferidas no exame geral de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos meus supervisores do estágio docência Prof^a. Dr^a Adriana Polachini do Valle e Prof. Dr. Newton Key Hokama.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, da Seção de Pós-graduação Vânia Soler e Bruna Zanella, muito obrigada.

A todos, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste estudo, os meus sinceros agradecimentos!

Sumário

Sumário

RESUMO	19
ABSTRACT.....	21
LISTA DE ABREVIATURAS	22
INTRODUÇÃO	26
OBJETIVOS.....	34
Objetivo Geral	35
Objetivos Específicos	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Grupos experimentais.....	36
Indução do infarto agudo do miocárdio.....	38
Tratamento pós-operatório	39
Tratamento com partenolide	39
Avaliação estrutural e funcional do coração	39
Coleta de amostras	40
Análise histológica.....	41
Análise da expressão proteica por Western blot.....	42
Dosagem de citocinas.....	43
Expressão gênica por qPCR.....	43
Análise estatística	44
RESULTADOS	45
Avaliação ecocardiográfica	47
Estudo histológico.....	50
Expressão proteica.....	53
Concentração miocárdica de IL-1 β	54
Expressão gênica de componentes do inflamassoma NLRP3	55
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	65
MANUSCRITO.....	72

Registro do impacto esperado da tese na sociedade

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no Brasil e no mundo. O infarto agudo do miocárdio (IAM) contribui para grande parcela desses óbitos. Ativação da inflamação tem papel importante em mecanismos fisiopatológicos desencadeados após a isquemia miocárdica. Inibidores da inflamação têm sido avaliados como estratégia terapêutica para melhorar o prognóstico de pacientes pós-infarto. Neste estudo, analisamos os efeitos tardios do tratamento precoce com partenolide, um inibidor da inflamação, na função do coração e na inflamação que ocorre no músculo cardíaco 70 dias após o IAM.

Os resultados mostraram que a administração precoce de partenolide por sete dias para ratos com infarto agudo do miocárdio causa diminuição da concentração miocárdica de IL-1 β e tendência para redução da expressão gênica miocárdica da IL-1 β . A alteração da concentração miocárdica de IL-1 β é acompanhada por atenuação da hipertrofia cardíaca e miocitária e da fibrose miocárdica, importantes determinantes do prognóstico tardio de pacientes com infarto do miocárdio.

Record of the expected impact of the thesis on society

Record of the expected impact of the thesis on society cardiovascular diseases are the main causes of death in Brazil and around the world. Acute myocardial infarction (AMI) contributes to a large proportion of deaths. The activation of inflammation plays an important role in the pathophysiological mechanisms triggered after myocardial ischemia. Inflammation inhibitors have been evaluated as a therapeutic strategy to improve the prognosis of post-infarction patients. In this study, we analyzed the late effects of early treatment with parthenolide, an inflammation inhibitor, on heart function and inflammation that occurs in the heart muscle 70 days after AMI.

The results demonstrated that early administration of parthenolide for seven days to rats with acute myocardial infarction causes a decrease in myocardial IL-1 β concentration and a tendency to reduce myocardial IL-1 β gene expression. The change in myocardial concentration of IL-1 β is accompanied by the attenuation of cardiac and myocyte hypertrophy and myocardial fibrosis, important determinants of the late prognosis of patients with myocardial infarction



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PATRICIA APARECIDA BORIM, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 14:00 horas, no(a) Bloco 5 - Unidade de Pesquisa Experimental - Unipex, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de PATRICIA APARECIDA BORIM, intitulada **Potencial terapêutico do partenolide, inibidor de inflamassoma, no infarto experimental do miocárdio**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. MELIZA GOI ROSCANI (Participação Virtual) do(a) Depto. de Medicina / CCBS/São Carlos - UFSCar, Prof. Dr. MARCELO DIARCÁDIA MARIANO CEZAR (Participação Presencial) do(a) Treinador e Coordenador de Atletismo - Botucatu/SP. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI

Resumo

Introdução. O infarto agudo do miocárdio (IAM) decorre da obstrução ao fluxo sanguíneo nas artérias coronárias. A consequente morte celular resulta em ativação da resposta inflamatória, importante para a cicatrização da área infartada. No entanto, se a inflamação for exacerbada ou persistente, pode acarretar piora da função ventricular e levar à insuficiência cardíaca. Células necróticas liberam moléculas que são reconhecidas por receptores celulares presentes em células imunes e não imunes do miocárdio, desencadeando a resposta inflamatória. Um desses receptores é o sensor citosólico NLRP3 que, após ativação forma um complexo de proteínas chamado inflamassoma. A formação dessa plataforma leva à ativação da caspase-1, responsável por clivar formas precursoras de IL-1 β e IL-18 em formas ativas. As duas citocinas têm papel importante no recrutamento e ativação de leucócitos no local de injúria. Como o inflamassoma NLRP3 está envolvido na disfunção ventricular após isquemia cardíaca, inibidores de inflamassomas vêm sendo testados após o IAM. O partenolide (PAR) inibe a caspase-1 e a via de sinalização celular do NF- κ B e de inflamassomas. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do partenolide na remodelação cardíaca tardia de ratos submetidos ao IAM. **Metodologia:** Ratos Wistar foram divididos nos grupos Sham (n=17), IAM (n=14) e IAM/PAR (IAM tratado com PAR, n=16). Três dias após a indução do infarto, animais do grupo IAM/PAR foram tratados com 1 mg/kg/dia de PAR via intraperitoneal por 7 dias. Os grupos Sham e IAM receberam injeção de salina. Ecocardiograma foi realizado no final do período experimental de 70 dias. A fração intersticial de colágeno miocárdica foi analisada em cortes histológicos corados com *picrosirius red*. O tamanho do infarto e o menor diâmetro dos miócitos foram avaliados em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. A expressão gênica de componentes do inflamassoma miocárdico (NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β) foi avaliada por RT-PCR em tempo real. A concentração miocárdica da interleucina-1 β foi analisada por ELISA e a expressão das proteínas NLRP3, NLRP1, NLRC4, ASC, pró-caspase-1, caspase-1 ativa, pró-IL-1 β e IL-1 β ativa foi avaliada por Western blot. As comparações entre os grupos foram realizadas por teste T, ANOVA e Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Dunn. **Resultados:** O tamanho do infarto não diferiu entre os grupos infartados. Os grupos IAM e IAM/PAR apresentaram dilatação das câmaras cardíacas esquerdas com evidente disfunção sistólica, sem diferenças estatísticas entre os mesmos. O grupo IAM teve maior peso do ventrículo esquerdo e fração intersticial de colágeno, e menor diâmetro dos miócitos que os grupos Sham e IAM/PAR. A concentração miocárdica da interleucina-1 β foi menor no grupo IAM/PAR que no Sham e a expressão gênica da pró-interleucina-1 β apresentou tendência para ser menor no grupo IAM/PAR. Os demais marcadores inflamatórios não diferiram entre os grupos. **Conclusão:** A administração precoce de partenolide por sete dias para ratos com infarto agudo do miocárdio causa diminuição tardia da concentração miocárdica de IL-1 β com tendência para redução da expressão gênica miocárdica da IL-1 β . Alteração da concentração miocárdica de IL-1 β é acompanhada por atenuação da hipertrofia cardíaca e miocitária e da fibrose miocárdica.

Palavras-chave: infarto agudo miocárdio, remodelamento, inflamassoma, partenolide, disfunção cardíaca, fibrose e hipertrofia

Abstract

Introduction: Acute myocardial infarction (AMI) results from blood flow obstruction in the coronary arteries. The ensuing cell death induces inflammatory activation, which is important for the myocardial cicatricial process. However, if inflammation is exacerbated or persistent, it may impair ventricular function and cause heart failure. Necrotic cells release molecules which are recognized by cell receptors present on immune and non-immune heart cells and trigger the inflammatory response. A remarkable receptor is the cytosolic sensor NLRP3, which upon activation forms a protein complex called inflammasome. The inflammasome activates caspase-1, responsible for cleaving precursor forms of IL-1 β and IL-18 into their active forms. Both cytokines play an important role in the recruitment and activation of leucocytes at the damage site. As the NLRP3 inflammasome is involved in ventricular dysfunction after cardiac ischemia, the use of inflammasome inhibitors have been studied after AMI. Parthenolide (PAR) inhibits caspase-1, NF- κ B signaling pathways, and inflammasomes. **Objective:** To evaluate the effects of early administration of parthenolide on late cardiac remodeling in infarcted rats. **Methods:** Wistar rats were assigned into the groups Sham (n=17), AMI (n=14), and AMI/PAR (AMI treated with PAR, n=16). Three days after infarction induction, rats from AMI/PAR received 1 mg/kg/day PAR intraperitoneally for 7 days. Sham and AMI received saline injection. Echocardiogram was performed at the end of the experimental period of 70 days. Myocardial interstitial collagen fraction was analyzed in *picrosirius red*-stained histological sections. Infarction size and the lowest myocyte diameter were evaluated in haematoxylin and eosin-stained sections. Gene expression of myocardial inflammasome components (NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β) was assessed by real time RT-PCR. Myocardial concentration of pro-interleukin-1 β was analyzed by ELISA, and expression of the proteins NLRP3, NLRP1, NLRC4, ASC, pro-caspase-1, caspase-1 ativa, pro-IL-1 β and IL-1 β was evaluated by Western blot. Groups were compared by T test, ANOVA and Bonferroni or Kruskal-Wallis and Dunn. **Results:** Infarction size did not differ between groups. AMI and AMI/PAR had left chambers dilation with severe systolic dysfunction, with no differences between them. AMI had higher left ventricle weight and interstitial collagen fraction, and lower myocyte diameter than Sham and AMI/PAR. Myocardial interleukin-1 β concentration was lower in AMI/PAR than sham and the gene expression of pro-interleukin-1 β presented a trend to be lower in the AMI/PAR group. Other inflammatory markers did not differ between groups. **Conclusion:** Early administration of parthenolide for 7 days causes a decrease in late myocardial concentration of IL-1 β and causes a trend for gene expression of myocardial IL-1 β to be lower in rats after acute myocardial infarction. Changes in myocardial IL-1 β are combined with attenuation in cardiac and myocyte hypertrophy and myocardial fibrosis.

Keywords: acute myocardial infarction, remodeling, inflammasome, parthenolide, cardiac dysfunction, fibrosis and hypertrophy

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

A - Pico de velocidade do fluxo de enchimento mitral tardio

A' - Pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral

A' - Pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral

AE - Diâmetro do átrio esquerdo

ANOVA - Análise de variância

AO - Diâmetro da aorta

AP-1 - Proteína ativadora 1

APC – Células apresentadoras de antígeno

ASC – Proteína adaptadora

ATP - Adenosina trifosfato

BIR - Domínio inibidor de baculovírus

CARD - Domínio de recrutamento de caspases

CD - Células dendríticas

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

DAMP - Padrões Moleculares Associados a Danos

DATASUS - Sistema Único de Saúde

DCV - Doenças cardiovasculares

DDVE - Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSVE - Diâmetro sistólico do VE

E' - Pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral

E': Pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral

EAE - Encefalomielite autoimune experimental

Eco- Ecocardiograma

EDPP - Espessura diastólica da parede posterior do VE

EDSIV - Espessura diastólica do septo interventricular

ELISA -Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Esp. rel. VE: Espessura relativa do VE

ESPP - Espessura sistólica da parede posterior do VE

FC - Frequência cardíaca

FE – Fração de ejeção

FVA - Fração de variação da área do VE

GAPDH - Gene que codifica gliceraldeído-3-fosfato

GBD - Global Burden of Disease Study

GSDMD - Gasdermina D

HE - Hematoxilina-eosina

HMGB-1 - Proteína box-1 do grupo de alta mobilidade

HSP - Proteína de choque térmico

I/R - Isquemia/reperfusão

IAM - Infarto agudo do miocárdio

IAM/PAR - Infarto do miocárdio e tratamento com partenolide

IC - Insuficiência cardíaca

IFN- γ – Interferon- γ

I κ B - Inibidor de NF- κ B

IL-18 – Interleucina 18

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LPS – Lipopolissacarídeo

LRR – Repetições rica em leucina

MCC950 - Inibidor de receptor NLRP3

mRNA- RNA mensageiro

MVE – Massa do VE

NACHT - Domínio central de ligação a nucleotídeo

NAIPs - Proteína da Família NLR Inibidora de Apoptose

NK— $\kappa\beta$ - Factor nuclear kappa β

NLR - Receptores domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo

NLRC4 - Gene que codifica o inflamassoma NLRC4

NLRP (1-14) – NLRs expressos no domínio pirina N-terminal (PYD)

Onda A - Pico de velocidade do enchimento diastólico tardio

Onda E - Pico de velocidade do enchimento diastólico inicial

Onda S - Velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral

P2X7 - Ativação do canal do receptor purinérgicos

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PAR - Partenolide

PBMC - Célula mononuclear do sangue periférico

PBS - Tampão fosfato

PC – Peso corporal

PCR – Reacção de polimerização em cadeia

PRR - Receptores de reconhecimento padrão

PYD - Domínio pirina amino-terminal

RC - Remodelamento cardíaca

RNA - Ácido ribonucleico

RNAse – Ribonuclease

ROS - Espécies reativas do oxigênio

R-Smad - Receptor regulador Smad

S' - Velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral das paredes lateral e septal e sua média.

Sham - Controle operado

STAT3- Proteína transdutora de sinal e ativadora de sinal 3

TCD4 - Grupamento de diferenciação 4 de linfócitos

TCD8 - Grupamento de diferenciação 8 de linfócitos

TDE - Tempo de desaceleração da onda E mitral

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α - Fator alfa de necrose tumoral

TRIV - Tempo de relaxamento isovolumétrico

TRIV/R-R - TRIV normalizado para frequência cardíaca

VD - Ventriculo direito

VE - Ventriculo esquerdo

VEPP -Velocidade de encurtamento da parede posterior

α -SMA - Proteínas contráteis do músculo liso

% Enc. Endo - porcentagem de encurtamento endocárdico

Introdução

Apesar do grande avanço da medicina, as doenças cardiovasculares (DCV) ainda são as principais causas de morte no Brasil e no mundo (1,2). A Global Burden of Disease Study (GBD) estimou a ocorrência de 523 milhões de casos e 18,6 milhões de óbitos por DCV em 2019 (3,4). Dentre as DCVs, o infarto agudo do miocárdio (IAM) contribui para grande parcela dos óbitos.

No Brasil, segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), entre os anos de 2010 e 2021 foram registradas 1.066.194 internações por IAM no Brasil; os registros apontam que, em 2017, o IAM foi a principal causa de óbito (5,6). Com o envelhecimento da população, há potencial aumento da incidência e prevalência de doenças associadas ao envelhecimento, incluindo as DCVs como infarto, diabetes e obesidade (7).

Agudamente, a isquemia miocárdica resulta em necrose dos cardiomiócitos. Seguindo a fase de morte celular, inicia-se o processo de remodelação cardíaca (RC) (8,9), definido por alterações gênicas, moleculares e celulares que resultam em modificações na estrutura, geometria e função do coração (10,11). A remodelação é caracterizada, principalmente, por hipertrofia compensatória de cardiomiócitos remanescentes e fibrose miocárdica, que levam à disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (IC) (12,13).

Embora a patogênese da remodelação cardíaca que se segue ao IAM seja multifatorial, a ativação do sistema imune inato e consequente inflamação constituem importante fatores na fisiopatologia pós-infarto (14–16). O processo inflamatório iniciado após a isquemia, é inicialmente necessário para a recuperação do dano tecidual; no entanto, inflamação exuberante e persistente contribui para a progressão da RC (17). Assim, modulação da inflamação é um alvo importante para a cardioproteção. O reparo cardíaco após o IAM consiste em três fases: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação (18) (**Figura 1**).

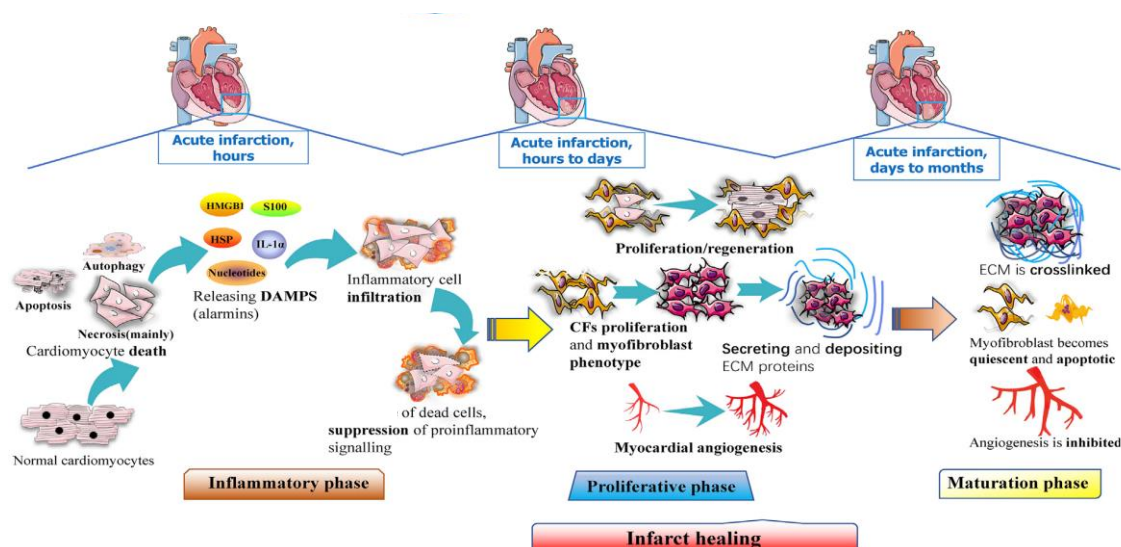


Figura 1. Fases do reparo cardíaco: inflamação, proliferação e maturação. Figura retirada de Wen ZJ et al, 2021)(19).

A fase inflamatória é precoce e ocorre nos primeiros três dias após o infarto. Células da imunidade inata que infiltram no miocárdio como monócitos e neutrófilos produzem mediadores inflamatórios e recrutam leucócitos para a área infartada, o que auxilia na eliminação de detritos celulares (20,21). Outras células imunes também participam da resposta inflamatória após o IAM, como os linfócitos B, relacionados à produção de anticorpos, e os linfócitos T, envolvidos na imunidade mediada por células (22). Os linfócitos T citotóxicos (TCD8) afetam adversamente a regeneração tecidual, exacerbando a inflamação local. Por outro lado, células T auxiliares (TCD4) são importantes na reparação tecidual devido a seu efeito regenerativo (23).

Após a necrose isquêmica, há liberação de moléculas que ativam células da imunidade inata e adaptativa e podem exacerbar a inflamação, causando morte adicional de cardiomiócitos (22,24,25). Inflamação persistente, que ultrapassa a fase de reparo, pode se estender para áreas não infartadas colaborando para o remodelamento ventricular adverso (25,26).

Quatro a sete dias pós o IAM, com a resolução da inflamação, inicia-se a fase proliferativa com aumento do número de fibroblastos e células endoteliais. Os fibroblastos tornam-se as células dominantes nesta fase. Eles passam por alterações funcionais apresentando atividade proliferativa

e migratória, e adquirem um fenótipo denominado miofibroblasto. Essas células possuem características de células musculares lisas com retículo endoplasmático extenso, proteínas contráteis do músculo liso (α -SMA) e miosina não-muscular, e alta capacidade de sintetizar matriz extracelular e tecido colágeno (10,12).

Miócitos necróticos liberam substâncias como adenosina trifosfato (ATP), ácidos nucleicos, espécies reativas do oxigênio (ROS) e miosinas cardíacas (16,29,30), que funcionam como “sinais de alerta” reconhecidos por receptores celulares chamados receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Esses receptores são expressos por células imunológicas e também por células não imunes como cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais (15,16,28). Entre os PRRs, os receptores de ligação a nucleotídeo (NLRs) serão foco deste estudo. O reconhecimento dos sinais de alerta pelos PRRs resulta na ativação de cascata inflamatória e de fatores de transcrição como o factor nuclear kappa B (NF- κ B), e na produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, que auxiliam no recrutamento de leucócitos para o tecido danificado (28,31). Os PRRs monitoram compartimentos intra e extracelulares para sinais de injúria tecidual ou substâncias estranhas e reconhecem moléculas presentes em patógenos (PAMPs) ou, como no caso do infarto, moléculas provenientes de dano celular (DAMPs).

Os membros da família dos NLRs são sensores com moléculas formadas por um domínio central de ligação a nucleotídeo (NACHT ou NBD), responsável pela sua ativação; um domínio carboxy-terminal com repetições de leucina (LRR), que funcionam como ligante de detecção e autorregulação e, por último, um domínio pirina amino-terminal (PYD), envolvido na sinalização do receptor. Os NLRs ativados recrutam e ativam as caspases por meio da proteína adaptadora ASC, que liga-se ao domínio PYD do receptor e permite que seu domínio CARD (domínio de ligação a caspases) faça ligação com o CARD das caspases, estimulando vias de sinalização (27,28).

Subtipos de NLRs, como: NLRP1, NLRP3 e o IPAF/NLRC4 formam os inflamassomas, plataformas de múltiplas proteínas que ativam a caspase-1, responsável por clivar precursores das interleucinas (IL)-1 β e IL-18 (pró-IL-1 β e pró-IL-18, respectivamente) em suas formas ativas. A

IL-1 β desempenha papel importante na mobilização e ativação de células imunes, epiteliais, endoteliais e fibroblastos; no aumento da produção de proteínas do sistema complemento e proteína C-reativa; na elevação da capacidade fagocítica de neutrófilos e macrófagos; e no processo de diferenciação de linfócitos (29–34). Desta maneira, os inflamassomas têm papel central na resposta imune estéril e na amplificação da resposta inflamatória (16,35).

A ativação de inflamassomas pode induzir morte celular por piroptose (36). As caspases 1, 4, 5 e 11 são mediadoras da piroptose, caracterizada por formação de poros que permitem o influxo de água e lise osmótica, com liberação de substâncias pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-18, proteína box-1 do grupo de alta mobilidade (HMGB-1) e proteína de choque térmico (HSP) (37). A ativação da caspase-1 desencadeada por inflamassomas cliva a gasdermina D (GSDMD) e gera um GSDMD N-terminal (GSDMD-NT) que reage com membranas celulares induzindo a formação de poros na membrana celular (36,37).

O NLRP3 contém o domínio PYD na sua porção N-terminal e recruta o adaptador ASC que interage com o domínio CARD da pró-caspase-1. Diferentemente do NLRP3, o NLRC4 contém o domínio CARD na porção N-terminal, ligando-se diretamente à pró-caspase-1, sem necessidade da ASC. O NLRP1 contém os domínios PYD e CARD, podendo ligar-se diretamente com a pró-caspase-1 pelo domínio CARD (27).

O NLRP3 é o inflamassoma mais estudado devido à sua capacidade de responder a diferentes estímulos. O NLRP3, com os domínios PYD, NACHT e LRR (38), é ativado por dois sinais. O primeiro sinal ou *priming* é desencadeado pela interação dos DAMPs com os receptores PRRs, que ativa o NF- κ B resultando na expressão de NLRP3 e pró-IL-1 β . Outros componentes como ASC, pró-IL-18 e pró-caspase são expressos constitutivamente nas células e sua expressão é aumentada por este *priming*. O segundo sinal consiste na ativação do NLRP3 e formação do complexo do inflamassoma por diferentes estímulos como efluxo de potássio em resposta a ATP extracelular, aumento de ROS, disfunção mitocondrial e ruptura de lisossomos com liberação de catepsinas e outros componentes lisossomais no citosol (39). Este inflamassoma tem papel

importante na indução da inflamação após o dano isquêmico (16,40,41).

Estudos experimentais mostraram ativação de inflamassomas no coração após lesão por isquemia/reperfusão. Além disso, camundongos *knockout* para o gene da proteína adaptadora ASC tiveram menor infiltração de células inflamatórias e tamanho do infarto após isquemia/reperfusão (42). Animais infartados apresentaram ativação miocárdica do NLRP3 associada com liberação de fator de transformação do crescimento beta, ATP e catepsina B lisossomal (43,44). A ativação de NLRP3 também causou mudança fenotípica dos fibroblastos, que passaram a produzir colágeno e matriz extracelular (45,46). Aumento da fibrose foi relacionado com ativação do NLRP3 localizado na mitocôndria dos fibroblastos, resultando em aumento da produção de ROS e ativação da via fibrótica (TGF- β) e receptor regulador Smad (R-Smad) (47).

No cenário clínico, foi observado aumento da concentração plasmática de caspase-1 e IL-1 β em autópsia de pacientes que faleceram por infarto do miocárdio (48,49). Adicionalmente, células mononucleares circulantes de pacientes com doença coronariana aguda apresentaram expressão elevada de NLRP3, IL-1 β e IL-18 em relação a controles saudáveis (50). Acúmulo de cristais de colesterol induziu a formação do inflamassoma NLRP3 e produção de IL-1 β em macrófagos presentes em placas ateroscleróticas, resultando em aumento da produção de metaloproteinases, infiltração de células inflamatórias, e dano tecidual (51). Pacientes que faleceram após IAM apresentaram aumento de agregados de ASC no coração (54). Pesquisadores observaram *in vivo* após infarto/reperfusão a expressão da ASC e mostraram que o inflamassoma pode ser ativado por ROS e efluxo de potássio. Além disso, descreveram que células infiltradas e células residentes como fibroblastos e cardiomiócitos expressam inflamassoma. Animais *knockout* para ASC e caspase-1 apresentaram menor concentração de IL-1 β , resposta inflamatória, área infartada, fibrose e disfunção ventricular (52).

A constatação que ativação do inflamassoma tem papel central em mecanismos fisiopatológicos desencadeados após a isquemia miocárdica levou a estudos para testar a eficácia de inibidores de inflamassomas para melhorar o prognóstico de pacientes com infarto. Bloqueio

farmacológico da IL-1 β reduziu apoptose e melhorou a função ventricular e a remodelação cardíaca após o infarto, tanto em humanos como em animais (53–55). Inibição direta do inflamassoma NLRP3 por uma molécula intermediária derivada da gliburida limitou a atividade da caspase-1, reduziu a área do infarto e a extensão do processo inflamatório e preservou a função cardíaca após isquemia/reperfusão em camundongos (31,56). Estudo recente utilizando o inibidor de NLRP3 MCC950 teve resultados similares em suínos submetidos a IAM (32).

Apesar de intensa investigação com o NLRP3, a participação dos inflamassomas NLRP1 e NLRC4 em inflamação estéril, principalmente após o IAM, é pouco conhecida. Esses inflamassomas são relacionados com a resposta imune a patógenos (57,58). Componentes destes inflamassomas, assim como IL-1 β e IL-18, foram expressos em neurônios, astrócitos e micróglia de camundongos 24 horas após isquemia tromboembólica cerebral. A administração de anticorpo neutralizante de NLRP1 reduziu a resposta inflamatória nesses animais (59). O NLRP1 também foi associado a retinopatia diabética em camundongos, e deficiência deste inflamassoma atenuou a neovascularização e reduziu a expressão de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e ASC/caspase-1 (60). Não encontramos estudos que mostrem o envolvimento do NLRP1 na inflamação após o IAM.

Mutações em genes do NLRC4 foram relacionadas com auto inflamação na enterocolite e na síndrome hemofagocítica (61). Freeman et al. (62) mostraram que pacientes com esclerose múltipla apresentaram aumento da expressão de NLRC4 em sítios de lesão. Os achados foram confirmados em modelo experimental de neuro-inflamação, no qual astrócitos e micróglia presentes nas lesões apresentavam ativação do inflamassoma NLRC4, ASC e caspase-1. A ativação foi dependente da mobilização de cálcio e efluxo de K⁺, e cursou com aumento da produção de IL-1 β . Poucas evidências sugerem participação do NLRC4 em inflamação cardíaca. Devi et al. (63) verificaram que o diabetes agrava a insuficiência cardíaca pós-infarto por deficiência de mitofagia, resultando em ativação de NLRC4 e caspase-1 e aumentou da morte de cardiomiócitos e liberação de IL-18.

O partenolide (PAR), uma lactonaesquiterpênica encontrada em plantas da família

Asteraceae (margaridas) e *Magnoliaceae* (magnolias), inibe o NF- κ B, a caspase-1 e inflamassomas (33,34). O fármaco vem sendo utilizado para alívio de sintomas e tratamento de doenças inflamatórias devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antitumorais (43,44). Autores mostraram que o PAR melhora as funções neurológicas e neuroinflamação de camundongos com lesão cerebral traumática, suprimindo transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT3), NF- κ B e ativação do inflamassoma NLRP3 (64). Adição do PAR em cultura de condrócitos articulares de pacientes com artrite reumatoide inibiu a expressão de TNF- α , metaloproteinases, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e IL-1 β . O PAR também foi eficaz *in vivo*, reduzindo o escore de erosão da cartilagem e a inflamação sinovial (65). Em ratos com neuropatia, o fármaco reduziu a expressão de IL-1 β e IL-18 e atenuou a lesão neuropática (66). Em modelo de sepse desencadeada por lipopolissacáride (LPS), a administração de PAR dentro de 6 e 12 horas após o estímulo diminuiu a expressão de NF- κ B e sua atividade inflamatória (67). Na encefalomielite autoimune experimental, o tratamento com PAR diminuiu o quadro clínico, a infiltração de células inflamatórias, a desmielinização do sistema nervoso central e a expressão de citocinas inflamatórias em tecido imune periférico, como baço e linfonodos. Portanto, os resultados sugerem que o PAR pode ser um potencial alvo terapêutico para doenças inflamatórias autoimunes (68). Não identificamos na literatura estudos que tenham avaliado os efeitos do PAR no controle da ativação de inflamassomas e na remodelação cardíaca após infarto do miocárdio.

Hipótese de trabalho

Neste estudo testamos a hipótese que o partenolide promove inibição precoce do inflamassoma NLRP3 e que a inibição resulta em efeitos benéficos tardios na remodelação cardíaca de ratos com infarto do miocárdio.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento precoce com partenolide, inibidor do inflamassoma NLRP3, na remodelação cardíaca tardia de ratos com infarto do miocárdio. Adicionalmente será analisada a expressão precoce de marcadores inflamatórios miocárdicos após infarto agudo do miocárdio em ratos.

Objetivos Específicos

- Analisar a expressão precoce de marcadores inflamatórios miocárdicos após infarto agudo do miocárdio em ratos incluindo os inflamassomas NLRP3, NALP1 e NLRC4.
- Avaliar o efeito do tratamento precoce com partenolide em variáveis histológicas e funcionais do coração; na expressão miocárdica do inflamassoma NLRP3; e na expressão miocárdica de citocinas pró-inflamatórias de ratos com infarto do miocárdio de longa evolução.

Os resultados estão apresentados em dois capítulos: inicialmente, mostramos os resultados do tratamento precoce com partenolide na remodelação cardíaca tardia. A seguir, apresentamos em forma de manuscrito a ser submetido para publicação, os resultados sobre a expressão precoce de marcadores inflamatórios após o infarto agudo do miocárdio em ratos.

Material e Métodos

Grupos experimentais

Delineamento experimental

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 200 e 250 g provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, UNESP. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas, com três ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 °C) e ciclos invertidos de luminosidade de 12 horas. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob nº1307/2019.

O delineamento experimental está representado na **Figura 2**. Os animais foram analisados 70 dias após a indução do infarto do miocárdio.

Os seguintes grupos experimentais foram constituídos: Sham, infarto do miocárdio (IAM) e infarto do miocárdio tratado com partenolide (IAM/PAR). Nos ratos do grupo IAM/PAR, o tratamento com partenolide foi iniciado três dias após a indução do IAM e mantido diariamente por 7 dias. Vinte e um dias após a cirurgia, os ratos dos grupos IAM e IAM/PAR foram avaliados por ecocardiograma para avaliação do tamanho do infarto. No 69º dia pós-infarto os ratos foram submetidos a novo ecocardiograma e eutanasiados no dia seguinte.

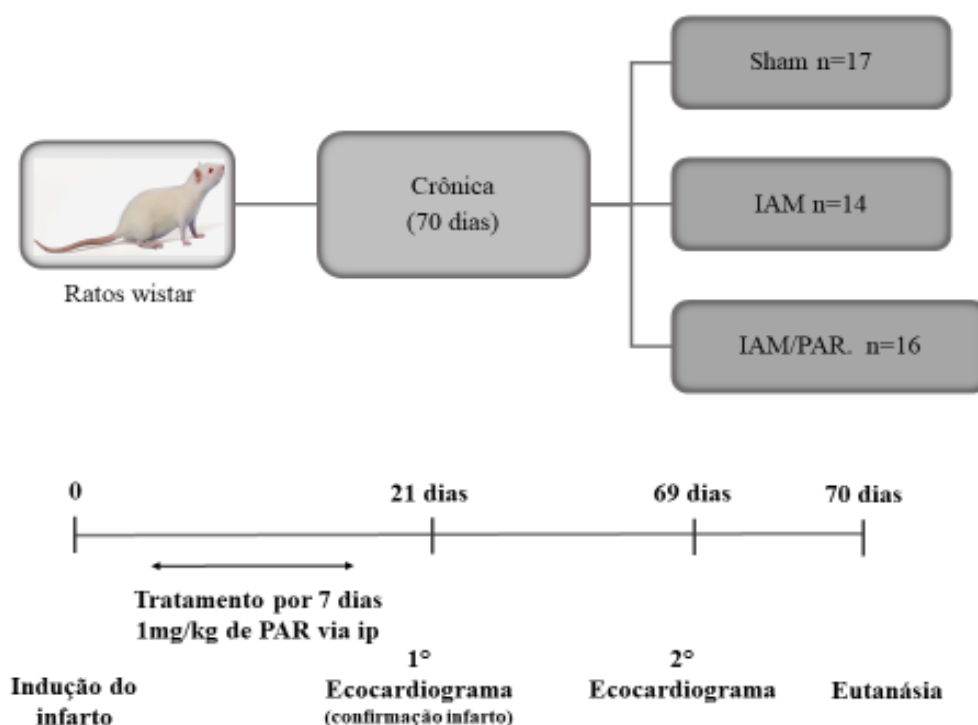


Figura 2. Delineamento experimental. IAM: infarto do miocárdio; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide; ip: intraperitoneal.

Indução do infarto agudo do miocárdio

O IAM foi induzido de acordo com o método previamente descrito (69). Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e morfina (5 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária descendente anterior esquerda ligada com fio mononylon 5.0 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração foi recolocado no tórax, os pulmões foram inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente com oxigênio. Os animais pertencentes ao grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária, responsável pela produção do infarto.

Tratamento pós-operatório

Os ratos foram recuperados por 8 h durante o período pós-operatório imediato. Dor foi prevenida ou tratada pelos analgésicos dipirona sódica (300 mg/kg, misturada à água de beber) e tramadol (5 mg/kg, por via intraperitoneal, a cada 8 h), durante 72 h após a cirurgia.

Tratamento com partenolide

Animais do grupo IAM/PAR foram tratados com 1 mg/kg/dia por via intraperitoneal com partenolide ultrapuro (MedChemExpress, Monmouth Junction, Nova Jérsei- EUA), do 3º ao 10º dia após o infarto, totalizando 7 dias de tratamento. A solução estoque de PAR foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) seguida de agitação em vórtex. Os ratos foram pesados diariamente e a diluição final para uso foi feita em água destilada.

Avaliação estrutural e funcional do coração

Ecocardiograma foi realizado 21 dias após a cirurgia para avaliação do tamanho do infarto (dados não apresentados) e ao final do período experimental, de acordo com o método previamente descrito (70,71). Os ratos foram sedados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado o equipamento modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. Para realizar as medidas estruturais do coração, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, com o transdutor em posição parasternal, eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada com o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral ao nível dos músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas com o cursor no modo-M no plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em impressora modelo UP-895 (Sony, Japan). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com paquímetro (Mitutoyo,

Japan). As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólicas da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV), e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE (Esp. Rel. VE) foi calculada dividindo-se a EDPP multiplicada por dois pelo DDVE. A massa do VE foi calculada pela fórmula $[(DDVE+EDPP+EDSIV)^3-(DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc. endoc.): $[(DDVE-DSVE)/DDVE] \times 100$; 2) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior, fração de ejeção (FE) e fração de variação da área do VE (FVA). A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E mitral (TDE); e 3) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca (TRIVn). A avaliação conjunta da função diastólica e sistólica do VE foi realizada pelo índice de desempenho miocárdico, também conhecido por índice de Tei (soma do tempo de contração isovolumétrica e TRIV, dividido pelo tempo de ejeção do VE). O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular da velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (onda S'), pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades de deslocamento das paredes lateral e septal), e pela razão entre as ondas E/E', e E'/A'.

Coleta de amostras

Tecidos e sangue foram coletados na Unidade de Pesquisa Experimental, UNIPEX, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Um dia após a realização do segundo ecocardiograma, os animais foram pesados, eutanasiados com injeção intraperitoneal de dose elevada de tiopental (120 mg/kg) e decapitados. Após coleta de sangue, o coração foi retirado por

toracotomia mediana. Os átrios, o ventrículo direito (VD) e o VE, incluindo o septo, foram dissecados e pesados. A seguir, amostras do coração foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C. Amostras de soro foram separadas e armazenadas a -80 ° C até o momento das dosagens.

Análise histológica

Na análise histológica foram avaliados o tamanho do infarto, a área seccional transversa dos miócitos, e a fração intersticial de colágeno. Foi realizado corte transversal no VE a 6 mm do ápice para a base; esse corte reflete a média dos resultados de cortes de todo o ventrículo (72). O tecido foi mantido em solução de formol a 10% por 24 h. A seguir, foi lavado em água corrente por 24 h e transferido para solução com etanol 70%. Os cortes histológicos foram corados em lâminas com solução de hematoxilina-eosina (HE) e examinados em microscópio Leica DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado do programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). O tamanho do infarto foi determinado pela razão entre a soma dos comprimentos epicárdico e endocárdico do segmento infartado e a soma das circunferências epicárdica e endocárdica totais. O valor foi expresso em porcentagem de área total do VE.

A fração intersticial de colágeno foi mensurada em lâminas coradas com *picrosirius red*, analisando-se a região não infartada do VE. Vinte campos diferentes de cada amostra foram fotografados com objetiva 40X no microscópio Leica DM LS. A quantificação foi realizada com o programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Com a função “count/size”, foi selecionada a região corada em vermelho que representava o colágeno. O programa calcula automaticamente a fração colágena intersticial.

O grau de hipertrofia dos miócitos foi avaliado por morfometria em tecido congelado de região não infartada. Amostras de tecido foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20 °C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos

de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras. Os cortes foram corados pelo método de hematoxilina e eosina. O menor diâmetro dos cardiomiócitos foi avaliado com o auxílio de microscópio, como previamente descrito. Em cada lâmina foram mensurados os menores diâmetros passando pelo núcleo de 150 a 200 cardiomiócitos. As análises histológicas foram realizadas no *software* Image Pro-plus descrito acima, e por um mesmo examinador cego ao tratamento (70,72).

Análise da expressão proteica por Western blot

A expressão proteica de NLRP3, NLRP1, NLRC4, ASC, pró-caspase-1, caspase-1 ativa, pró-IL-1 β e IL-1 β ativa foi analisada por Western blot. Proteínas foram extraídas do miocárdio (40-50 mg) em tubos com tampão RIPA contendo inibidor de protease e fosfatase, com uso de esferas de zircônio (0,5 mm) durante 5 min a 4 °C, em homogenizador Bullet Blender® (Next Advance, Inc., NY, USA). Após a homogenização, as amostras foram centrifugadas por 20 min, a 12.000 rpm, a 4 °C. O conteúdo de proteínas do sobrenadante foi quantificado pelo método de Bradford. As amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Sigma, ref. S3401) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A seguir, as amostras foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose (Biorad). Após bloqueio da membrana, foi realizada a incubação com anticorpos primários anti- NLRP1, NLRC4, NLRP3 (Thermo Fisher Scientific sc06-23, US), ASC (Santa Cruz Biotechnology-Inc. F-9, sc-271054, Oregon-USA), caspase-1 (Santa Cruz Biotechnology-Inc. 14F468, sc-56036, Europe) e IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology-Inc. 11E5, sc52012, Europe). A membrana foi então, lavada com PBS e Tween 20, incubada com anticorpo secundário e, a seguir, lavada com PBS e Tween 20. Os anticorpos foram removidos e a membrana novamente incubada com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase, anti-rabbit IgG-HRP (Abcam,

Cambridge, MA, USA) ou anti-mouse IgG-HRP (Abcam, Cambridge, MA, USA). Os sinais foram visualizados com auxílio de kit para quimioluminescência e fotodocumentador; as imagens foram obtidas em software ImageQuantTM 800 (IQ800) ©Cytiva, EUA, e analisadas no software ImageJ.

Dosagem de citocinas

A concentração da citocina inflamatória IL-1 β foi quantificada em sobrenadante de tecido miocárdico. A dosagem foi efetuada com kits de DuoSet ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Systems DY501 Kit, Rat (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram adquiridos em leitor *BioTek*® a 450 nm no software GEN5 Data Analysis Software, EUA, localizado na UNIPEX.

Expressão gênica por qPCR

RNA total foi extraído do miocárdio utilizando TRIZOL® (Ambicon Life Technologies, Carlsbad, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific, River Oaks Parkway, San Jose, CA) a partir dos valores de absorbância em 260 nm e foram expressos em ng/ μ L. As amostras foram avaliadas quanto à razão 260/280, que deve estar em aproximadamente 2.0. A integridade do RNA total de cada amostra foi avaliada em eletroforese capilar através da obtenção do RIN (RNA Integrity Number), utilizando o Agilent RNA 6000 Nano Kit no equipamento Bioanalyzer 2100 (©Agilent Technologies, EUA).

A transcrição reversa foi realizada após tratamento do RNA com DNase I (Thermo Scientific) segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, o cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total, com o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Master Mix (Life Technologies, EUA). Para cada μ g de RNA tratado (10 μ L de volume final) foram adicionados 10 μ L de mix contendo 2 μ L de primers randômicos (Random Primer 10X), 2 μ L de RT Buffer 10X, 0,8 μ L de DNTP 25X, 1 μ L de transcriptase reversa Multiscribe e 4,2 μ L de água ultrapura. A

solução foi homogeneizada e incubada em termociclador nas seguintes condições: 25 °C por 10 min, 37 °C por 2 h e 85 °C por 5 min. As amostras foram mantidas em freezer a -20 °C, até a utilização na reação de PCR em tempo real (qPCR).

A amplificação dos genes NLRP3 (Rn04244620m1), caspase-1 (Rn00562724_m1), ASC (Rn00597229_g1) e IL-1 β (Rn01514151_m1) foi realizada por qPCR no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com o kit TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Scientific) e os respectivos ensaios Taqman de cada gene. O volume total da reação foi de 10 μ L composto de 2,0 μ L de cDNA, 5 μ L de TaqMan Gene Expression Master Mix (2X), 0,5 μ L de TaqMan Assay (20X) e 2,5 μ L de água ultrapura. As reações foram executadas nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 1 min, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60 °C por 1 min). A expressão relativa (fold-change: $2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes de interesse foi calculada pela normalização com os valores de Ct (threshold cycle) dos genes de referência ciclofilina (Rn00690933_m1) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase- Rn01775763_g1).

Análise estatística

Os resultados são apresentados em média $\pm$ desvio padrão ou mediana e quartis, de acordo com a distribuição. As comparações entre os grupos foram analisadas por teste t, ANOVA complementada pelo teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. O nível de significância considerado foi de 5%. As análises foram realizadas no software SigmaPlot for Windows version 12.0. Os gráficos foram feitos no programa Graph Pad Prism 7.

Resultados

O experimento foi iniciado com 110 ratos. Quarenta e quatro animais morreram no período peri-operatório e um durante a realização do primeiro ecocardiograma. Treze ratos apresentaram tamanho de infarto menor que 30% da área total do VE e foram excluídos do estudo após os resultados do primeiro ecocardiograma, e cinco faleceram no decorrer do estudo. O tamanho amostral e a mortalidade estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Tamanho amostral e mortalidade durante o período experimental

	Quantidade inicial de ratos	Óbito IAM	Óbito 1º Eco	Exclusão IAM <30%	Óbitos no biotério	Final
Ratos operados	110	44	1	13	5	47

IAM: infarto agudo do miocárdio; Eco: ecocardiograma

As variáveis anatômicas estão apresentadas na Tabela 2. O peso corporal final não diferiu entre os grupos. O peso do ventrículo esquerdo (VE) foi maior no IAM que nos grupos Sham e IAM/PAR e o peso do VE normalizado pelo peso corporal foi maior no IAM que no Sham. O peso do ventrículo direito e dos átrios, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, foi maior nos grupos infartados que no Sham.

Tabela 2. Variáveis anatômicas

	Sham (n=17)	IAM (n=14)	IAM/PAR (n=16)
PC (g)	422 (401-447)	424 (403-453)	404 (387-424)
VE (g)	0,78±0,09	0,88±0,07*	0,79±0,09#
VE/PC (mg/g)	1,83±0,22	2,07±0,15*	1,96±0,247
VD (g)	0,24(0,21-0,27)	0,35(0,26-0,45)*	0,36(0,24-0,46)*
VD/PC (mg/g)	0,56(0,51-0,63)	0,75(0,61-1,10)*	0,83(0,60-1,22)*
Átrios (g)	0,10 (0,09-0,11)	0,17(0,11-0,29)*	0,19 (0,15-0,25)*
Átrios/PC (mg/g)	0,24(0,22-0,26)	0,37(0,30-0,71)*	0,48(0,32-0,64)*

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IAM: infarto agudo do miocárdio; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide; n: tamanho amostral; PC: peso corporal; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; Átrios: peso do átrios. ANOVA e Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Dunn; * p<0,05 vs Sham e # p<0,05 vs IAM.

Avaliação ecocardiográfica

Na Tabela 3, estão apresentadas variáveis estruturais do coração ao final do experimento. O peso corporal não diferiu entre os grupos. Os diâmetros diastólico e sistólico do VE, a espessura diastólica da parede posterior do VE, o diâmetro do átrio esquerdo, a massa do VE, e as áreas sistólica e diastólica do VE foram maiores em ambos os grupos infartados que no Sham. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos IAM/PAR e IAM.

Tabela 3. Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais do coração no final do experimento

	Sham (n=17)	IAM (n=14)	IAM/PAR (n=16)
PC (g)	422 (401-447)	424 (403-453)	404 (387-424)
DDVE (mm)	8,05±0,43	10,41±0,77*	10,09±1,05*
DDVE/PC (mg/kg)	18,8±1,40	24,5±2,65*	24,8±2,57*
DSVE (mm)	4,27±0,50	8,48±1,32*	8,42±1,36*
EDPP (mm)	1,33±0,02	1,63±0,30*	1,71±0,17*
EDSIV (mm)	1,35±0,02	1,50±0,28	1,48±0,19
Esp. rel. VE	0,33±0,02	0,32±0,06	0,34±0,04
AO (mm)	4,06±0,14	3,94±0,15	3,82±0,19*
AE (mm)	5,63±0,41	7,46±1,61*	7,60±1,38*
AE/AO	1,39±0,08	1,90±0,43*	2,00±0,38*
AE/PC (mm/kg)	13,18±1,31	17,53±3,91*	18,81±3,89*
Massa VE (g)	0,72 (0,70-0,77)	1,31 (1,16-1,62)*	1,28 (1,13-1,64)*
Área diastólica (mm²)	46,4±5,68	89,1±21,14*	88,4±18,17*
Área sistólica (mm²)	14,1±2,89	69,3±22,87*	61,9±15,09*
% de área infartada	-	39,8±10,7	44,1±9,1

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IAM: infarto agudo do miocárdio; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide; n: tamanho amostral; PC: peso corporal; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; Esp. rel. VE: espessura relativa do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. ANOVA e Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Dunn; * p< 0,05 vs Sham.

Os índices de função sistólica do VE estão mostrados na Tabela 4. Os grupos infartados apresentaram menor porcentagem de encurtamento endocárdico, velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, fração de ejeção, fração de variação da área e ondas S' lateral, septal e

média, e maior índice de Tei que o Sham. Não observamos diferenças significativas entre os grupos IAM/PAR e IAM.

Tabela 4. Índices ecocardiográficos de função sistólica do ventrículo esquerdo

	Sham (n=17)	IAM (n=14)	IAM/PAR (n=16)
FC (bpm)	264 (248-280)	292 (262-361)	282 (251-350)
% enc. endoc.	47,0 ± 4,70	19,0 ± 8,00*	16,9 ± 5,86*
VEPP (mm/s)	39,8 ± 4,99	23,6 ± 8,53*	21,4 ± 5,04*
Índice de Tei	0,50 (0,45-0,58)	0,74 (0,69-0,81)*	0,80 (0,76-0,82)*
FE	0,85 ± 0,04	0,45 ± 0,15*	0,42 ± 0,13*
FVA (%)	69,7 ± 5,01	23,7 ± 10,54*	30,2 ± 6,25*
S' lateral (cm/s)	3,36 ± 0,37	2,87 ± 0,33*	2,90 ± 0,47*
S' septal (cm/s)	3,41 ± 0,33	2,73 ± 0,35*	2,68 ± 0,36*
S' média (cm/s)	3,38 ± 0,27	2,80 ± 0,28*	2,79 ± 0,30*

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IAM: infarto agudo do miocárdio; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide; n: tamanho amostral; FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; % enc. endoc.: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE); FE: fração de ejeção; FVA: fração de variação da área do VE; S': velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral das paredes lateral e septal e sua média. ANOVA e Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Dunn; * p<0,05 vs Sham.

Os índices de função diastólica do VE estão mostrados na Tabela 5. O pico de velocidade do fluxo de enchimento mitral inicial (onda E) e a razão E/A foram maiores e o tempo de desaceleração da onda E mitral (TDE) menor no grupo IAM/PAR que no Sham. O tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (TRIV) foi maior no grupo IAM que no Sham e o TRIV normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn) foi maior nos grupos IAM e IAM/PAR que no Sham.

Tabela 5. Índices ecocardiográficos de função diastólica do ventrículo esquerdo

	Sham (n=17)	IAM (n=14)	IAM/PAR (n=16)
E mitral (cm/s)	71,0 (68,5-73,0)	76,0 (70,0-90,0)	85,0 (71,0-87,0)*
A mitral (cm/s)	43,6±5,70	35,9±17,24	30,5±19,10
E/A	1,63±0,25	3,05±2,06	3,63±1,91*
TDE (ms)	48,5 (45,0-51,3)	45,0 (30,0-55,0)	37,0 (34,0-42,0)*
TRIV (ms)	27,0±3,0	31,8±3,8*	30,0±4,0
TRIVn	56,9±6,20	70,9±8,52*	66,1±10,59*
E' média (cm/s)	3,52±0,49	3,35±0,35	3,55±0,78
E' lateral (cm/s)	3,52 ±0,43	3,17 ±0,83	3,53 ±1,25
E' septal (cm/s)	3,51±0,63	3,52 ±0,48	3,56 ±0,94
E/E' média	20,2 ±2,87	23,5 ±4,46	23,4 ±4,14
A' média (cm/s)	3,49±0,85	3,01±0,47	3,00±0,77
A' lateral (cm/s)	3,68±0,77	3,03±0,95	3,06±0,79
A' septal (cm/s)	3,30 ±1,02	2,98 ±0,84	2,93 ±1,06
E'/A'	1,07±0,30	1,13±0,18	1,23±0,34

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis. IAM: infarto do miocárdio; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide; n: tamanho amostral; E mitral: pico de velocidade do fluxo de enchimento mitral inicial; A mitral: pico de velocidade do fluxo de enchimento mitral tardio; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca; E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; A': pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral. ANOVA e Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Dunn; * p<0,05 vs Sham.

Estudo histológico

A Figura 3 ilustra a porcentagem de área infartada medida em cortes histológicos do VE. O tamanho do infarto não diferiu entre os grupos IAM/PAR e IAM.

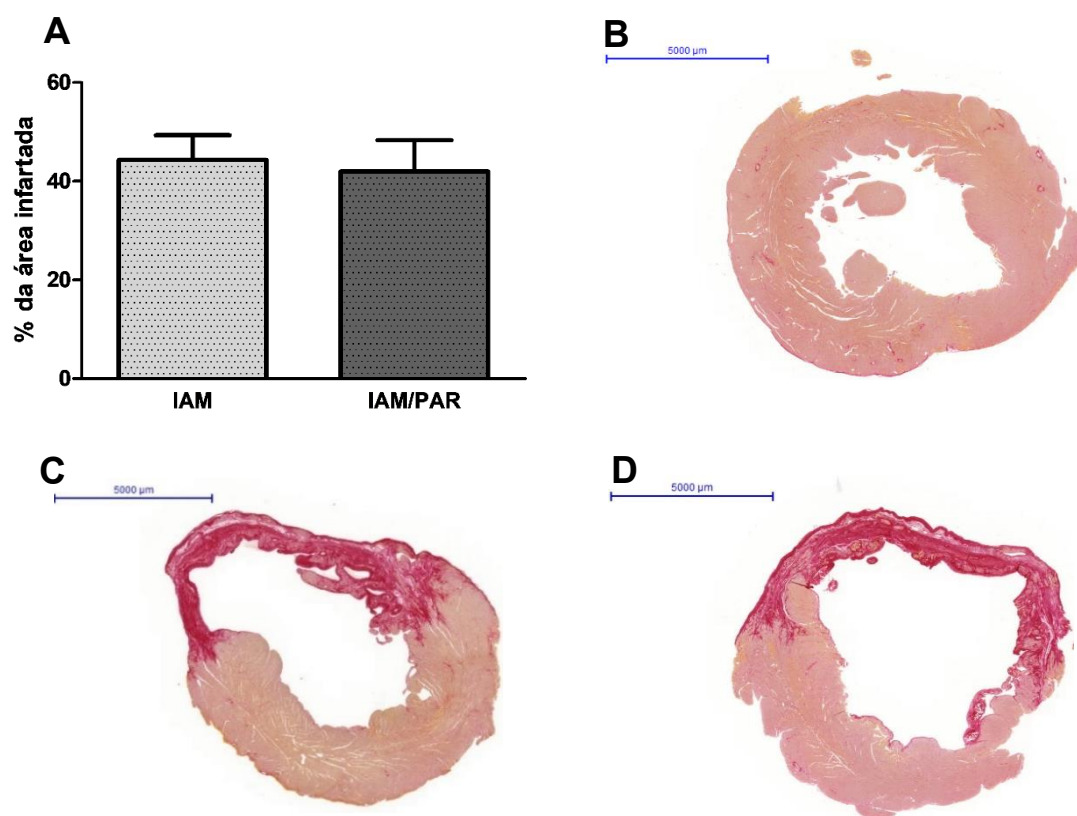


Figura 3. Tamanho do infarto do miocárdio. Porcentagem de área infartada (A); imagens representativas de cortes histológicos do VE corados com Picrosirius red nos grupos Sham (B, n=11), infarto do miocárdio (IAM; C, n=11), e IAM tratado com partenolide (IAM/PAR; D, n=14). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; teste T de Student.

O menor diâmetro dos miócitos foi maior no grupo IAM que nos grupos IAM/PAR e Sham (Figura 4).

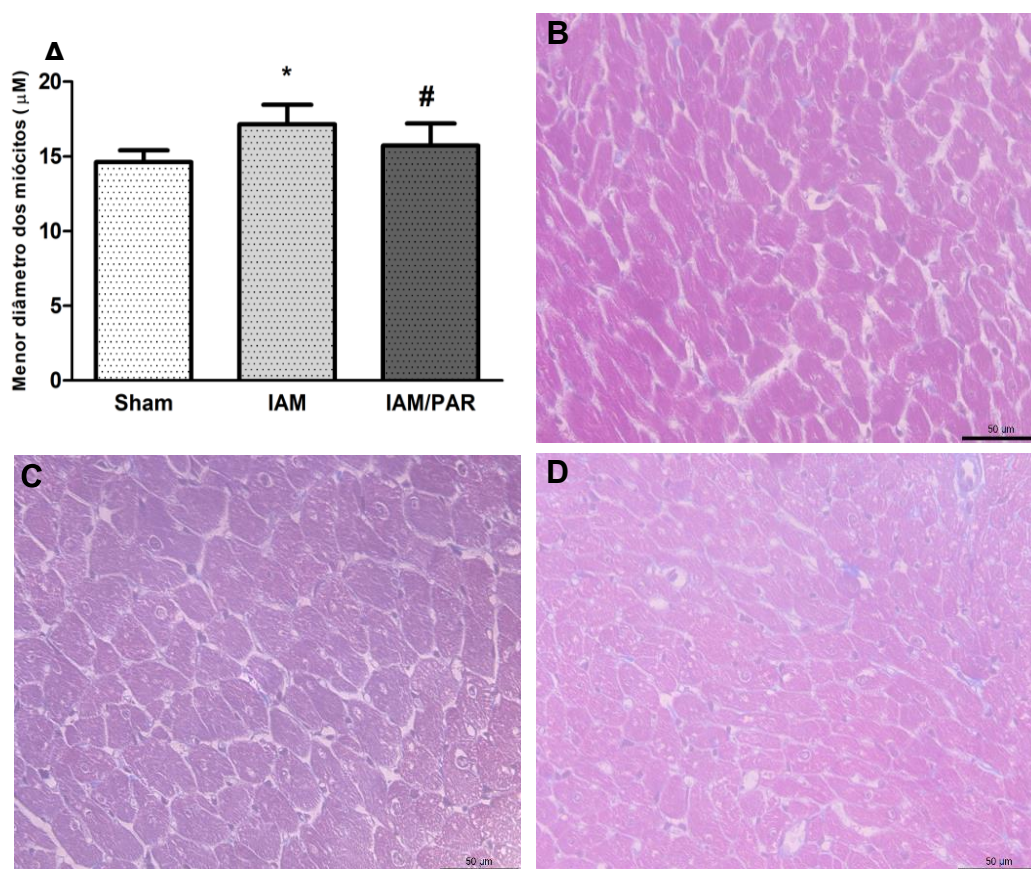


Figura 4. Menor diâmetro dos miócitos (A); cortes histológicos representativos do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina-eosina nos grupos Sham (B, n=17); infarto do miocárdio (IAM; C, n=14) e IAM tratado com partenolide (IAM/PAR; D, n=16). Dados expressos por média $\pm$ desvio padrão; ANOVA e Bonferroni; * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs IAM. Aumento de 40x.

A fração intersticial de colágeno foi maior no grupo IAM que nos grupos Sham e IAM/PAR (Figura 5).

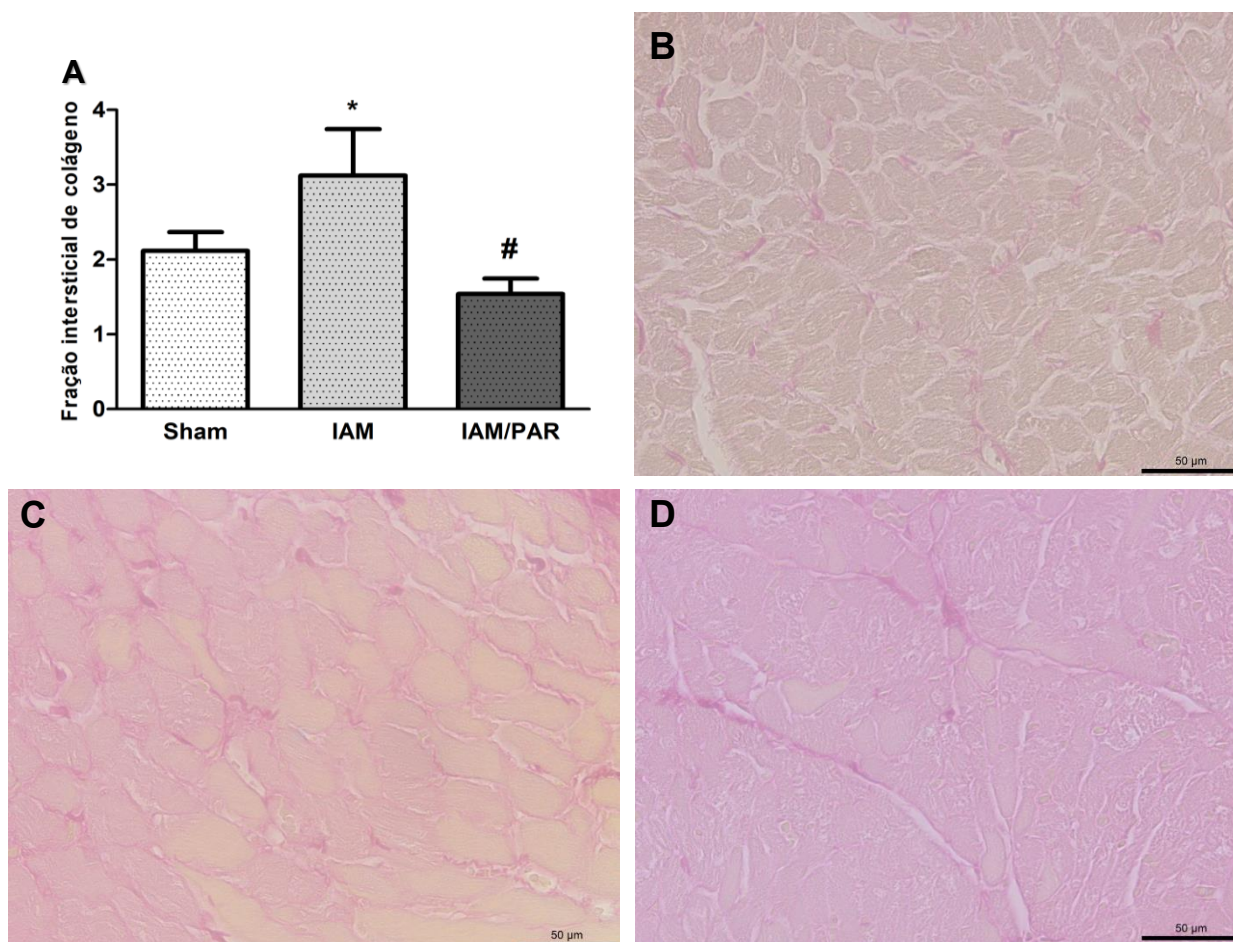


Figura 5. Fração intersticial de colágeno (A); imagens representativas de cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados com *Picrosirius red* nos grupos Sham (B, n=10), infarto do miocárdio (IAM; C, n=10), e IAM tratado com partenolide (IAM/PAR; D, n=10). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA e Bonferroni; *p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs IAM. Aumento de 40x.

Expressão proteica

A expressão proteica da NLRP1, NLRP3, NLRC4, ASC, pró-caspase-1, caspase-1 e IL-1 β ativa não diferiu entre os grupos (**Figura 6**). Houve tendência para a expressão da pró-IL-1 β ser maior no grupo IAM ($p=0,088$).

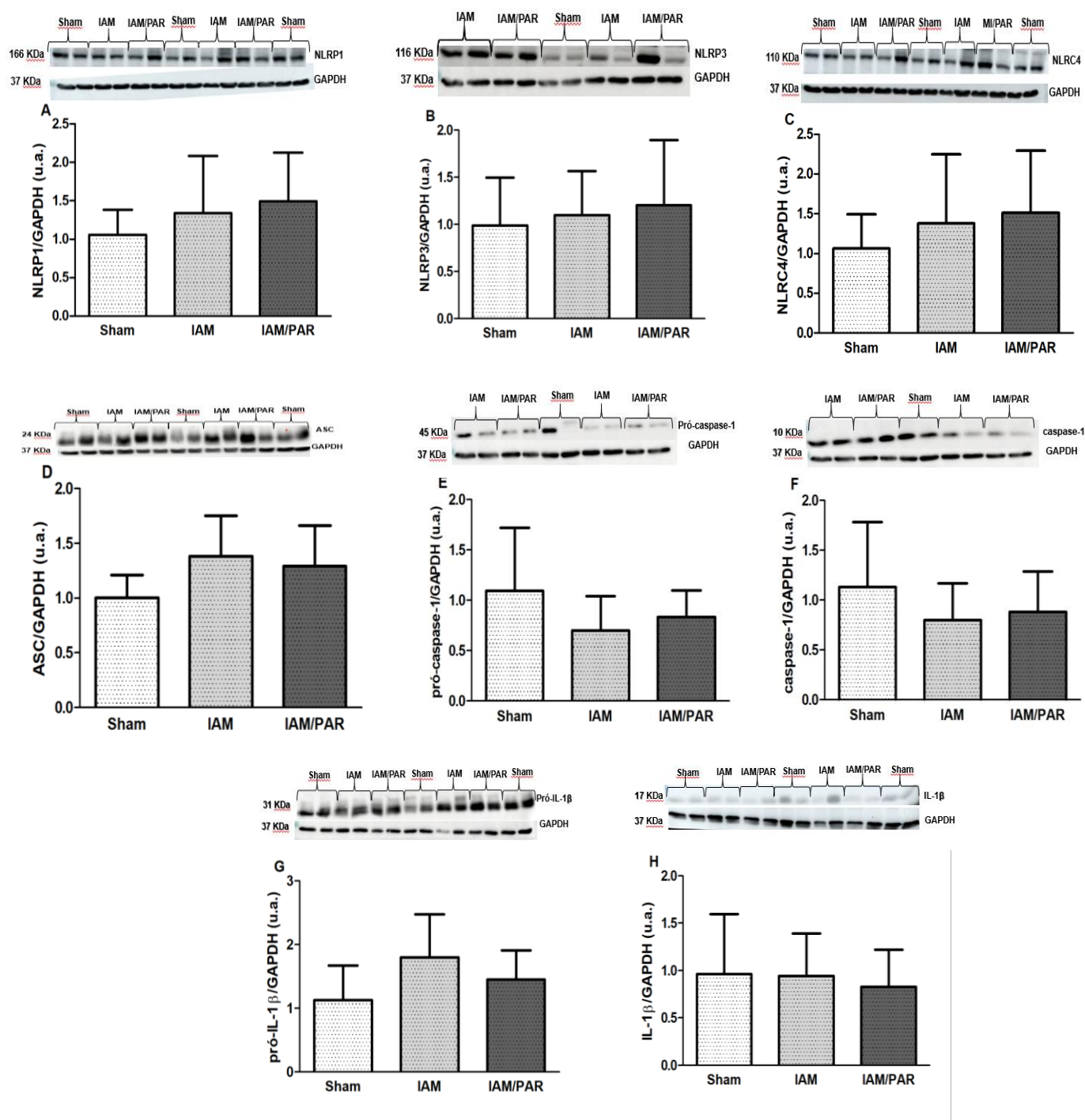


Figura 6. Expressão proteica miocárdica avaliada por Western blot: NLRP1 (A), NLRP3 (B) NLRC4(C), ASC (D), pró-caspase-1 (E), caspase-1(F) pró-IL-1 β (G) e IL-1 β (H). Tamanho amostral: 8 por grupo. IAM: infarto do miocárdio; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide; u.a.: unidades arbitrárias. Dados expressos em média $\pm$ DP; ANOVA e Bonferroni; pró-IL-1 β : $p=0,088$.

Concentração miocárdica de IL-1 β

O grupo IAM/PAR apresentou menor concentração da citocina IL-1 β que o grupo Sham

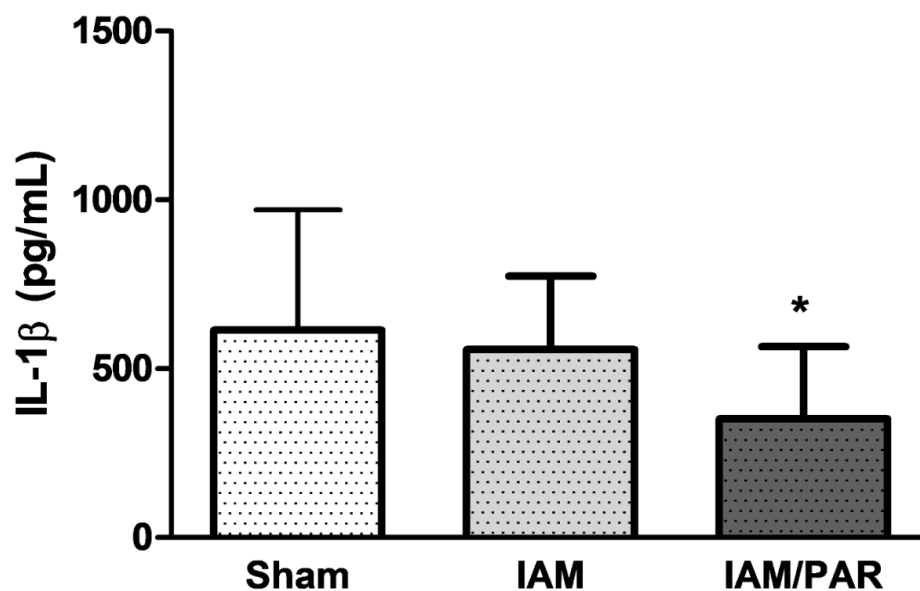


Figura 7. Concentração miocárdica da citocina inflamatória IL-1 β avaliada por ELISA. Sham, n=17; IAM: infarto do miocárdio, n=14; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide, n=16. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA e Bonferroni; * p<0,05 vs Sham.

Expressão gênica de componentes do inflamassoma NLRP3

A expressão gênica do NLRP3, ASC e caspase-1 não diferiu entre os grupos. A expressão da IL-1 β foi maior no grupo IAM que no Sham (Figura 8).

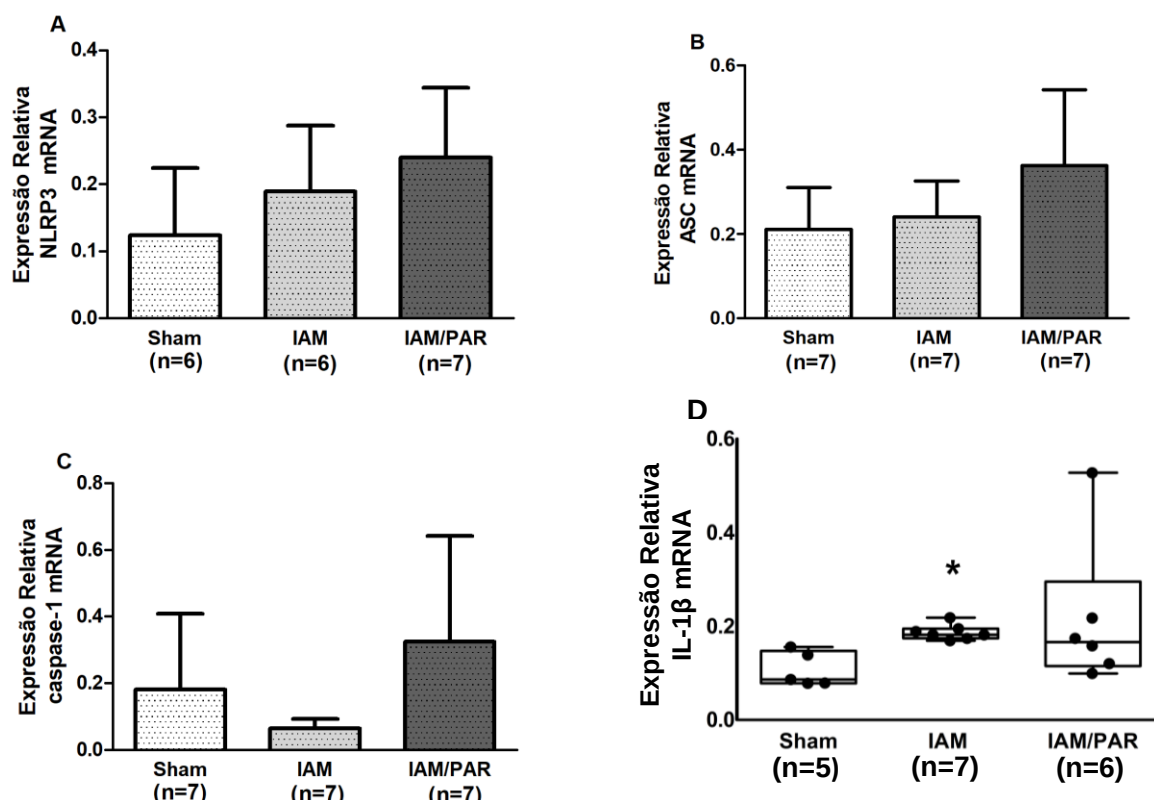


Figura 8. Expressão gênica miocárdica de componentes do inflamassoma NLRP3. A expressão gênica do NLRP3 (A); ASC (B); caspase-1 (C); e IL-1 β (D) foi normalizada pela expressão do gene constitutivo GAPDH. IAM: infarto do miocárdio; IAM/PAR: IAM tratado com partenolide. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA e Bonferroni; * $p < 0,05$ vs Sham.

Discussão

Neste estudo, avaliamos pela primeira vez os efeitos do tratamento precoce com partenolide (PAR) na remodelação cardíaca tardia de ratos com infarto do miocárdio. Adicionalmente, analisamos a expressão gênica e proteica de inflamassomas.

O modelo experimental de infarto em ratos é prático, apresenta custo relativamente baixo, e mimetiza causas frequentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto do miocárdio. Como apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados a estudos clínicos subsequentes, é amplamente utilizado para investigar a fisiopatologia e o tratamento da remodelação cardíaca (72). O infarto experimental em ratos cursa com desenvolvimento de insuficiência cardíaca esquerda de lenta evolução, de modo semelhante ao que comumente se observa na insuficiência cardíaca em humanos.

Uma das desvantagens do modelo, entretanto, é que a ligadura da artéria descendente anterior esquerda pode levar a diferentes tamanhos de infarto e, conseqüentemente, a graus variados de injúria cardíaca e disfunção ventricular (73,74). Intervenções terapêuticas realizadas 24 horas após a indução do infarto não influenciam o tamanho da área infartada. A análise ecocardiográfica realizada três semanas após a indução do infarto objetivou avaliar o tamanho do infarto. Para evitar comparações entre animais com diferentes graus de injúria cardíaca, ratos com infarto menor que 30% da área total do ventrículo esquerdo foram excluídos do estudo logo após a obtenção dos resultados do primeiro ecocardiograma. Entretanto, o método considerado padrão ouro para determinar o tamanho da área infartada é a mensuração por histologia. Assim, ao final do estudo, foram realizadas lâminas histológicas dos corações para determinação final do tamanho do infarto. Após o resultado, animais que eventualmente apresentassem infartos pequenos foram excluídos do estudo.

Nossos resultados mostraram que o tamanho do infarto, acima de 40 % da área total do ventrículo esquerdo, foi expressivo e semelhante nos dois grupos infartados. Desta forma, foi possível comparar os resultados entre os grupos IAM e IAM/PAR. Conseqüentemente ao grande tamanho do infarto, o grau de injúria cardíaca foi severo nos dois grupos infartados, com dilatação das câmaras cardíacas esquerdas e importante disfunção sistólica e leve disfunção diastólica,

caracterizada pelo aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca.

Atualmente, estratégias para o tratamento da fase aguda do infarto do miocárdio estão centradas na restauração do fluxo na artéria coronária pela dissolução do trombo por meio de medicamentos e/ou implantação de stent intravascular. Essas estratégias são habitualmente bem-sucedidas, reduzindo o tamanho do infarto e limitando o dano ao coração. Adicionalmente, nas últimas décadas houve considerável avanço no tratamento clínico de pacientes após a fase aguda do IAM. Apesar destes avanços, pacientes com IAM ainda apresentam aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular a curto e longo prazo. Portanto, ainda há necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do IAM para prevenção de remodelação adversa e eventual insuficiência cardíaca.

As terapias direcionadas ao inflamassoma podem ser uma opção viável para reduzir o grau de remodelação cardíaca e prevenir o desenvolvimento de insuficiência cardíaca pós-infarto (75). Não identificamos na literatura estudos que tenham avaliado os efeitos do partenolide como inibidor do inflamassoma NLRP3 na remodelação cardíaca e expressão sérica e miocárdica de substâncias inflamatórias em ratos submetidos ao IAM.

O partenolide é uma lactona sesquiterpênica natural. O composto foi extraído pela primeira vez da planta matricária (*Tanacetum parthenium*) como fitoterápico oral da tradicional medicina da Grécia. Possui extenso histórico de aplicação para aliviar febre, dor de cabeça, e artrite (76). Uma de suas substâncias bioativas é o anel de α -metileno- γ -lactona de dez membros e compostos epóxi, que podem interagir com loci nucleofílicos de biomoléculas (77–79). Somente mais recentemente, suas propriedades anti-inflamatórias foram melhor esclarecidas. O PAR pode inibir o processo inflamatório por meio de bloqueio da I κ B quinase com consequente inibição da atividade do NF- κ B (34,80). A inibição da via do NF- κ B foi demonstrada em modelo *in vivo* de isquemia e reperfusão miocárdica, no qual a administração de PAR levou a redução do tamanho do infarto e do estado de inflamação (81). O NF- κ B modula diferentes eventos celulares como proliferação, diferenciação e sobrevivência. O NF- κ B pode promover a expressão de mediadores

pró-inflamatórios incluindo citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, moléculas de adesão e enzimas incluindo as formas induzíveis de ciclooxygenase e óxido nítrico sintase. Portanto, o NF- κ B se comporta como regulador central da imunidade inata e de processos inflamatórios (78).

O PAR pode também bloquear inflamassomas e reduzir a liberação de fatores pró-inflamatórios independentemente da via do NF- κ B (34). Por exemplo, em modelo animal de neurite, o PAR inibiu diretamente a atividade de inflamassomas e da caspase-1 (82). A inibição da caspase-1 foi bem documentada em cultura de macrófagos nas quais o PAR bloqueou diretamente a caspase-1 e a atividade da ATPase do NLRP3. Assim, foi sugerido que o PAR pode atuar em um alvo que é comum a todas as vias de sinalização de inflamassomas, que é a caspase-1, único componente comum a todos os inflamassomas (34).

A duração dos efeitos do PAR foi avaliada em estudos experimentais. Por exemplo, a expressão miocárdica de NF- κ B ocorre 1 hora após administração do estimulador lipopolissacarídeo (LPS) em ratos. O PAR causa bloqueio completo da expressão do NF- κ B quando administrado 6 horas antes de desafio com LPS; entretanto, não há bloqueio quando o PAR é administrado 24 horas antes do LPS, sugerindo que seu efeito desaparece 24 horas após sua administração (67,83). Doses variáveis entre 250 μ g/kg em dose única a 10 mg/kg/dia do PAR têm produzido efeitos em ratos e camundongos (34,81,84). Como doses de 1 e 2 mg/kg foram suficientes para inibir a expressão da IL-1 β (82), em nosso estudo optamos pela administração do PAR na dose de 1 mg/kg/dia.

Após o infarto do miocárdio, o reparo tecidual é intimamente relacionado com a reação inflamatória, sem a qual ele não ocorre (84). Entretanto, excessiva ativação inflamatória pode levar a lesões cardíacas adicionais. Na fase crônica, o processo de remodelação cardíaca caracteriza-se por diversas alterações, entre as quais se destacam a hipertrofia de miócitos e a fibrose miocárdica em regiões não infartadas do ventrículo esquerdo. A formação de tecido fibrótico é necessária e essencial no processo de cicatrização da área infartada. Entretanto, o desenvolvimento crônico e progressivo de fibrose está associado ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca e mau prognóstico cardiovascular. Se persistentes, essas anormalidades levam a aumento da rigidez

ventricular e podem evoluir com dilatação do ventrículo esquerdo. Finalmente, podem ocorrer insuficiência cardíaca e óbito (84). Assim, terapêuticas voltadas para impedir a progressão da fibrose e hipertrofia miocitária são consideradas importantes ferramentas no controle da remodelação cardíaca pós-infarto (85).

Em acordo com o exposto acima, ao final do período experimental, os grupos IAM e IAM/PAR apresentaram diâmetro dos miócitos e fração intersticial de colágeno maiores que o grupo Sham, indicando a presença de hipertrofia miocitária e de fibrose miocárdica. O tratamento com partenolide diminuiu a hipertrofia e a fração intersticial de colágeno em relação ao grupo IAM. O achado sobre a hipertrofia miocitária é reforçado pelo fato que o peso do VE foi maior no grupo IAM que nos grupos IAM/PAR e Sham.

Apesar de reduzir o grau de hipertrofia miocitária e de fibrose miocárdica, o partenolide não alterou a remodelação cardíaca ou a disfunção ventricular quando avaliadas por ecocardiograma, já que as variáveis não diferiram entre os grupos IAM/PAR e IAM.

Resultados semelhantes aos nossos foram observados por Skoumal et al. (86) na hipertrofia cardíaca induzida por angiotensina II em ratos. A administração de PAR na dose de 0,5 mg/kg/dia não alterou a pressão arterial ou a função ventricular, mas reduziu o grau de hipertrofia ventricular e de fibrose intersticial e quase aboliu o aumento induzido pela angiotensina II no número de células positivas para prolil-4-hidroxilase, um marcador de células sintetizadoras de colágeno. Adicionalmente, o PAR reduziu a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e a expressão de interleucina-6, ambas induzidas pela angiotensina II. Portanto, assim como em nosso estudo, o partenolide teve efeitos favoráveis na prevenção de hipertrofia ventricular e no desenvolvimento de fibrose intersticial miocárdica (86–88).

Dados da literatura mostram que o partenolide também teve efeitos favoráveis na redução de fibrose em outros órgãos, como no peritônio de camundongos em diálise peritoneal, nos quais o efeito terapêutico ocorreu por inibição do eixo de sinalização da via NF- κ B/TGF- β /Smad (89).

Neste estudo testamos a hipótese que o partenolide inibe a ativação precoce de inflamassomas que se segue ao infarto agudo do miocárdio. Como deleção gênica do inflamassoma

NLRP3 melhorou a sobrevivência de camundongos infartados e reduziu a remodelação cardíaca e a fibrose miocárdica (90,91) consideramos que inibição precoce de inflamassomas miocárdicas resultaria em efeitos benéficos tardios.

Assim, avaliamos a concentração de interleucina-1 β e a expressão gênica e proteica de diferentes marcadores de inflamação no miocárdio. A concentração miocárdica da interleucina-1 β foi menor no grupo IAM/PAR que no Sham e a expressão proteica da pró-interleucina-1 β apresentou tendência para ser menor no grupo IAM/PAR. Os demais marcadores não diferiram entre os grupos.

A IL-1 β é uma das citocinas mais estudadas na resposta imune inata. Ela faz parte da família da IL-1, que possui 11 membros de citocinas. Aumento de sua atividade contribui para a patogênese de várias doenças pró-inflamatórias. Mais recentemente, a IL-1 β foi associada a risco aumentado e maior gravidade de doenças cardiovasculares. A citocina IL-1 β é sintetizada como proteína precursora, dependendo de posterior processamento ativado pela caspase-1 para tornar-se madura e exercer sua função. Nos fibroblastos, ativação de inflamassomas leva à liberação da IL-1 β , que induz alterações pró-fibróticas e contribui para o processo de cicatrização do infarto (17).

Estudos experimentais têm mostrado que a IL-1 β desempenha papel crítico na patogênese do infarto. A IL-1 β é expressa principalmente em células mielóides, como macrófagos e células dendríticas, mas também pode derivar de outros tipos celulares, como células endoteliais e fibroblastos. A IL-1 β participa da ativação da secreção de outras citocinas e quimiocinas inflamatórias, iniciando cascata de eventos que incluem recrutamento e ativação de leucócitos no local da inflamação. A secreção da IL-1 β é regulada, principalmente, pelos inflamassomas, complexo de multiproteínas intracelulares que atuam como plataforma molecular para ativar a protease caspase-1, que regula a ativação da pró-IL-1 β em IL-1 β com subsequente inflamação (92). Evidências mostram que a secreção de IL-1 β envolve tanto a via do NF- κ B quanto a caspase-1 (34).

A IL-1 β pode reduzir a contratilidade miocárdica e favorecer a remodelação ventricular adversa com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Na fase crônica pós-infarto, a produção

local ou sistêmica de IL-1 β prejudica a responsividade do receptor β -adrenérgico, promovendo a remodelação adversa e piora da disfunção ventricular (16).

Não identificamos na literatura estudos que tenham avaliado os efeitos da inibição precoce de inflamassomas na remodelação cardíaca tardia pós-infarto do miocárdio. Sandanger et al. (46) observaram aumento da expressão de mRNA de NLRP3 e IL-1 β em fibroblastos cardíacos de camundongos 21 dias pós-infarto. Os achados sugerem que o inflamassoma NLRP3 é ativado no miocárdio após o infarto, particularmente nos fibroblastos (46). Interessantemente, camundongos deficientes em NLRP3 apresentaram redução de dano hipóxico e melhora da função cardíaca após serem submetidos a isquemia e reperfusão coronariana (43). Outros inibidores do inflamassoma NLRP3 e do NF- κ B como a colchicina e o composto Bay 11-7082 vêm sendo testados em estudos clínicos e experimentais (93–96)

Em resumo, nossos resultados mostram que não ocorre ativação inflamatória miocárdica tardia após infarto do miocárdio em ratos. A administração precoce de partenolide por sete dias para ratos com infarto agudo do miocárdio causou diminuição tardia da concentração miocárdica de IL-1 β com tendência para redução da expressão gênica miocárdica da IL-1 β . A redução da concentração miocárdica de IL-1 β foi acompanhada por atenuação de alterações cardíacas tardias como a hipertrofia cardíaca e miocitária e a fibrose miocárdica. Como hipertrofia e fibrose miocárdica são importantes fatores determinantes do prognóstico tardio de pacientes com cardiopatia de variadas etiologias, estes efeitos do partenolide podem ser considerados clinicamente importantes. Entretanto, não foram observadas alterações em variáveis ecocardiográficas. Portanto, é possível que, como os ratos tiveram grau avançado de injúria cardíaca e disfunção sistólica, a inibição precoce do processo inflamatório não foi suficiente para atenuar a remodelação cardíaca patológica. Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar se inibição inflamatória com partenolide pode ser benéfica em ratos com menores tamanhos de infarto do miocárdio e graus menos severos de disfunção cardíaca.

Conclusão

A administração precoce de partenolide por sete dias para ratos com infarto agudo do miocárdio causa diminuição tardia da concentração miocárdica de IL-1 β e tendência para redução da expressão gênica miocárdica da IL-1 β . A alteração da concentração miocárdica de IL-1 β é acompanhada por atenuação da hipertrofia cardíaca e miocitária e da fibrose miocárdica.

Referências

1. Gonz A, Shamooin L, Carlos F. NLRP3 inflammasome in vascular disease : A recurrent villain to combat pharmacologically. *Antioxidants*. 2022;11:1–17.
2. Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, Gsell W, Pusovnik M, Van den Eynde J, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2022;33:357–66.
3. Kim SJ. Global awareness of myocardial infarction symptoms in general population. *Korean Circ J*. 2021;51:983–96.
4. Fernandez Rico C, Konate K, Josse E, Nargeot J, Barrère-Lemaire S, Boisguérin P. Therapeutic peptides to treat myocardial ischemia-reperfusion injury. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:20pages.
5. Freitas RB. Do paciente com infarto agudo do miocárdio no Brasil. *Rev Saude*. 2021;8:100–27.
6. Secretaria de Vigilância em Saúde. Principais causas de morte 2017. Disponível em: < <http://svs.aims.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/gbd-brasil/principais-causas/>> acesso em: 22-06-2022.
7. Bleve A, Motta F, Durante B, Pandolfo C, Selmi C, Sica A. Immunosenescence, inflammaging, and frailty: Role of myeloid cells in age-related diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022;64:123–44.
8. Latet SC, Hoymans VY, Van Herck PL, Vrints CJ. The cellular immune system in the post-myocardial infarction repair process. *Int J Cardiol*. 2015;179:240–7.
9. Van Der Laan AM, Nahrendorf M, Piek JJ. Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: Role of the cellular immune response. *Heart*. 2012;98:1384–90.
10. Shinde A V., Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;70:74–82.
11. Uygur A, Lee RT. Mechanisms of cardiac regeneration. *Dev Cell*. 2016;36:62–74.
12. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res*. 2000;48:89–100.
13. Yousef ZR, Redwood SR, Marber MS. Postinfarction left ventricular remodelling: Where are the theories and trials leading us? *Heart*. 2000;83:76–80.
14. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110(1):159–73.
15. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J*. 2014;55:101–5.
16. Toldo S, Mezzaroma E, Mauro AG, Salloum F, Van Tassell BW, Abbate A. The inflammasome in myocardial injury and cardiac remodeling. *Antioxidants Redox Signal*. 2015;22:1146–61.
17. Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van Tassell BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2020;126:1260–80.
18. Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2018;186:73–87.
19. Wen ZJ, Xin H, Wang YC, Liu HW, Gao YY, Zhang YF. Emerging roles of circRNAs in the pathological process of myocardial infarction. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2021;26:828–48.
20. Frangogiannis SDP and NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial

- infarction: From inflammation to fibrosis. *Physiol Behav.* 2017;176:139–48.
21. Foglio E, Pellegrini L, Russo MA, Limana F. HMGB1-mediated activation of the inflammatory-reparative response following myocardial infarction. *Cells.* 2022;11:1–21.
 22. Sánchez-Trujillo L, Vázquez-Garza E, Castillo EC, García-Rivas G, Torre-Amione G. Role of adaptive immunity in the development and progression of heart failure: New evidence. *Arch Med Res.* 2017;48:1–11.
 23. Moon S, Hong J, Go S, Kim BS. Immunomodulation for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Regen Med.* 2023;20:389–409.
 24. Hofmann U, Frantz S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res.* 2015;116:354–67.
 25. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;62:24–35.
 26. Li Z, Abdullah CS, Jin Z-Q. Inhibition of PKC- θ preserves cardiac function and reduces fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol.* 2014;171:2913–24.
 27. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140:821–32.
 28. Place DE, Kanneganti T. Science direct recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol.* 2018;50:32–8.
 29. Toldo S, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Farkas D, Marchetti C, Voelkel NF, et al. Interleukin-1 β blockade improves cardiac remodelling after myocardial infarction without interrupting the inflammasome in the mouse. *Exp Physiol.* 2013;98:734–45.
 30. Toldo S, Marchetti C, Mauro AG, Chojnacki J, Mezzaroma E, Carbone S, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol.* 2016;209:215–20.
 31. Marchetti C, Toldo S, Chojnacki J, Mezzaroma E, Liu K, Salloum FN, et al. Pharmacologic inhibition of the NLRP3 inflammasome preserves cardiac function after ischemic and nonischemic injury in the mouse. *J Cardi Pharmacol.* 2015;66:1–8.
 32. Van Hout GPJ, Bosch L, Ellenbroek GHJM, De Haan JJ, Van Solinge WW, Cooper MA, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2017;38:828–36.
 33. Wang M, Li Q. Parthenolide could become a promising and stable drug with anti-inflammatory effects. *Nat Prod Res.* 2015;29:1092–101.
 34. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem.* 2010;285:9792–802.
 35. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:31–40.
 36. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc Res.* 2022;118:372–85.
 37. Zeng C, Wang R, Tan H. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications. *Int J Biol Sci.* 2019;15:1345–57.
 38. Song H, Yang B, Li Y, Qian A, Kang Y, Shan X. Focus on the mechanisms and functions of pyroptosis, inflammasomes, and inflammatory caspases in infectious diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:21.
 39. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci.* 2016;41:1012–21.

40. Bracey NA, Beck PL, Muruve DA, Hirota SA, Guo J, Jabagi H, et al. The NLRP3 inflammasome promotes myocardial dysfunction in structural cardiomyopathy through interleukin-1 β . *Exp Physiol*. 2013;98:462–72.
41. Butts B, Gary RA, Dunbar SB, Butler J. The importance of NLRP3 inflammasome in heart failure. *J Card Fail*. 2015;21:586–93.
42. Chicco AJ, McCune SA, Emter CA, Sparagna GC, Rees ML, Bolden DA, et al. Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension*. 2008;51:1096–102.
43. Freund RRA, Gobrecht P, Fischer D, Arndt HD. Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide. *Nat Prod Rep*. 2020;37:541–65.
44. Pareek A, Suthar M, Rathore GS, Bansal V. Feverfew (*tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacogn Rev*. 2011;5:103–10.
45. Liu W, Zhang X, Zhao M, Zhang X, Chi J, Liu Y, et al. Activation in M1 but not M2 macrophages contributes to cardiac remodeling after myocardial infarction in rats: A critical role of the calcium sensing receptor/NLRP3 inflammasome. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35:2483–500.
46. Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen A V., et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013;99:164–74.
47. Bracey NA, Gershkovich B, Chun J, Vilaysane A, Meijndert HC, Wright JR, et al. Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *J Biol Chem*. 2014;289:19571–84.
48. Ren Z, Yang K, Zhao M, Liu W, Zhang X, Chi J, et al. Calcium-Sensing Receptor on Neutrophil Promotes Myocardial Apoptosis and Fibrosis After Acute Myocardial Infarction via NLRP3 Inflammasome Activation. *Can J Cardiol*. 2020;36:893–905.
49. Wang Y, Liu X, Shi H, Yu Y, Yu Y, Li M, et al. NLRP3 inflammasome, an immune-inflammatory target in pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases. *Clin Transl Med*. 2020;10:91–106.
50. Satoh M, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: Results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clin Sci*. 2014;126:233–41.
51. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357–61.
52. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123:594–604.
53. Van Tassell BW, Varma A, Salloum FN, Das A, Seropian IM, Toldo S, et al. Interleukin-1 trap attenuates cardiac remodeling after experimental acute myocardial infarction in mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;55:117–22.
54. Toldo S, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Farkas D, Marchetti C, Voelkel NF, et al. Interleukin-1 β blockade improves cardiac remodelling after myocardial infarction without interrupting the inflammasome in the mouse. *Exp Physiol*. 2013;98:734–45.
55. Emmi G, Urban ML, Imazio M, Gattorno M, Maestroni S, Lopalco G, et al. Use of interleukin-1 blockers in pericardial and cardiovascular diseases. *Curr Cardiol Rep*. 2018;20:12 pages.
56. Toldo S, Marchetti C, Mauro AG, Chojnacki J, Mezzaroma E, Carbone S, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial

- ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol.* 2016;209:215–20.
57. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature.* 2011;477:596–602.
 58. Chavarría-Smith J, Vance RE. The NLRP1 inflammasomes. *Immunol Rev.* 2015;265:22–34.
 59. Abulafia DP, De Rivero Vaccari JP, Lozano JD, Lotocki G, Keane RW, Dietrich WD. Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:534–44.
 60. Li Y, Liu C, Wan X-S, Li S-W. NLRP1 deficiency attenuates diabetic retinopathy (DR) in mice through suppressing inflammation response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun;501:351–7.
 61. Romberg N, Al Moussawi K, Nelson-Williams C, Stiegler AL, Loring E, Choi M, et al. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. *Nat Genet.* 2014;46:1135–9.
 62. Freeman L, Guo H, David CN, Brickey WJ, Jha S, Ting JP-Y. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J Exp Med.* 2017;214:1351–70.
 63. Durga Devi T, Babu M, Mäkinen P, Kaikkonen MU, Heinaniemi M, Laakso H, et al. Aggravated Postinfarct Heart Failure in Type 2 Diabetes Is Associated with Impaired Mitophagy and Exaggerated Inflammasome Activation. *Am J Pathol.* 2017;187:2659–73.
 64. Ding W, Cai C, Zhu X, Wang J, Jiang Q. International Immunopharmacology Parthenolide ameliorates neurological deficits and neuroinflammation in mice with traumatic brain injury by suppressing STAT3/NF- κ B and inflammasome activation. 2022;108:15 pages.
 65. Liu Q, Zhao J, Tan R, Zhou H, Lin Z, Zheng M, et al. Parthenolide inhibits pro-inflammatory cytokine production and exhibits protective effects on progression of collagen-induced arthritis in a rat model. *Scand J Rheumatol.* 2015;44:182–91.
 66. Popiolek-Barczyk K, Kolosowska N, Piotrowska A, Makuch W, Rojewska E, Jurga AM, et al. Parthenolide relieves pain and promotes M2 microglia/macrophage polarization in rat model of neuropathy. *Neural Plast.* 2015;2014:15 pages.
 67. Xie H, Wang C, Wu X, Liu X, Qiao S, Liu C, et al. Parthenolide attenuates LPS-induced activation of NF- κ B in a time-dependent manner in rat myocardium. *J Biomed Res.* 2012;26:37–43.
 68. Zhang Z, Zhang K, Zhang M, Zhang X, Zhang R. Parthenolide suppresses T helper 17 and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Immunol.* 2022;13:1–13.
 69. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:208–14.
 70. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima ARR, et al. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:13 pages.
 71. Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:1–8.
 72. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira SA, Campos DHS, Lima ARR, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543–51.
 73. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac remodeling: Concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq Bras C.* 2016;106:62–9.

74. Hentschke VS, Capalonga L, Rossato DD, Perini JL, Alves JP, Quagliotto E, et al. Functional capacity in a rat model of heart failure: impact of myocardial infarct size. *Exp Physiol*. 2017;102:1448–58.
75. Eapen ZJ, Tang WHW, Felker GM, Hernandez AF, Mahaffey KW, Lincoff AM, et al. Defining heart failure end points in ST-segment elevation myocardial infarction trials: Integrating past experiences to chart a path forward. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012;5:594–600.
76. Liu J, Cui M, Wang Y, Wang J. Trends in parthenolide research over the past two decades: A bibliometric analysis. *Heliyon*. 2023;9:e17843.
77. Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett*. 1997;402:85–90.
78. Carlisi D, Lauricella M, D'anneo A, De Blasio A, Celesia A, Pratelli G, et al. Parthenolide and Its soluble analogues: Multitasking compounds with antitumor properties. *Biomedicines*. 2022;10:25 pages.
79. Mathema VB, Koh YS, Thakuri BC, Sillanpää M. Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. *Inflammation*. 2012;35:560–5.
80. Kwok BHB, Koh B, Ndubuisi MI, Elofsson M, Crews CM. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. *Chem Biol*. 2001;8:759–66.
81. Zingarelli B, Hake PW, Denenberg A, Wong HR. Sesquiterpene lactone parthenolide, an inhibitor of I κ B kinase complex and nuclear factor I κ B, exerts beneficial effects in myocardial reperfusion injury. 2002;17:127–34.
82. Zhang M, Liu RT, Zhang P, Zhang N, Yang CL, Yue LT, et al. Parthenolide inhibits the initiation of experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*. 2017;305:154–61.
83. Li X, Cui X, Li Y, Fitz Y, Hsu L, Eichacker PQ. Parthenolide has limited effects on nuclear factor- κ B increases and worsens survival in lipopolysaccharide-challenged C57BL/6J mice. *Cytokine*. 2006;33:299–308.
84. Seropian IM, Toldo S, Van Tassell BW, Abbate A. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1593–603.
85. Terashvili M, Bosnjak ZJ. Stem cell therapies in cardiovascular disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2019;33:209–22.
86. Skoumal R, Tóth M, Serpi R, Rysä J, Leskinen H, Ulvila J, et al. Parthenolide inhibits STAT3 signaling and attenuates angiotensin II-induced left ventricular hypertrophy via modulation of fibroblast activity. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:634–41.
87. Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2014;19:173–85.
88. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: Contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009;81:474–81.
89. Zhang Y, Feng W, Peng X, Zhu L, Wang Z, Shen H, et al. Parthenolide alleviates peritoneal fibrosis by inhibiting inflammation via the NF- κ B TGF- β /Smad signaling axis. 2022;10:25 pages.
90. Louwe MC, Olsen MB, Kaasbøll OJ, Yang K, Fosshaug LE, Alfsnes K, et al. Absence of NLRP3 inflammasome in hematopoietic cells reduces adverse remodeling after experimental myocardial infarction. *JACC Basic to Transl Sci*. 2020;5:1210–24.
91. Wang Z, Hu W, Lu C, Ma Z, Jiang S, Gu C, et al. Targeting NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) inflammasome in

- cardiovascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:2765–79.
92. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. 2021;1–14.
 93. Fujisue K, Sugamura K, Kurokawa H, Matsubara J, Ishii M, Izumiya Y, et al. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ J.* 2017;81:1174–82.
 94. Devereux S, Giannopoulos G, Angelidis C, Alexopoulos N, Filippatos G, Papoutsidakis N, et al. Anti-inflammatory treatment with colchicine in acute myocardial infarction: A pilot study. *Circulation.* 2015;132:1395–403.
 95. Kim YS, Kim JS, Kwon JS, Jeong MH, Cho JG, Park JC, et al. BAY 11-7082, a nuclear factor- κ B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model. 2010;54:348–53.
 96. Liu Y, Lian K, Zhang L, Wang R, Yi F, Gao C, et al. TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2014;109:25 pages.

Manuscrito

NLRC4 inflammasome expression after acute myocardial infarction in rats

Patrícia Aparecida Borim¹, Mariana Gatto¹, Gustavo Augusto Ferreira Mota¹, Ana Luiza Barioni Meirelles¹, Anna Clara Consorti dos Santos¹, Luana Urbana Pagan¹, Eder Anderson Rodrigues¹, Lidiane Moreira de Souza¹, Felipe Cesar Damatto¹, Elida Paula Benquique Ojopi², Leiliane Rodriguez dos Santos Oliveira¹, Leonardo Antonio Mamede Zornoff¹, Katashi Okoshi¹, Marina Politi Okoshi¹

1 Internal Medicine Department, Botucatu Medical School, UNESP, Brazil

2 Pathology Department, Botucatu Medical School, UNESP, Brazil

BACKGROUND

Despite major advances in the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases, myocardial infarction (MI) still has a high risk of morbidity and mortality ([Tsao, et al 2023](#)). Myocardial ischemia leads to cardiomyocyte necrosis, which activates myocardial and systemic innate immune response and intense inflammatory process ([Frangogiannis, 2015](#)). The initial inflammatory response is helpful to restore tissue injury; however, unregulated and exacerbated inflammation contributes to the progression of cardiac remodeling and consequent heart failure ([Mezzaroma, et al 2011](#); [Ren et al 2020](#); [Gatto et al 2023](#)).

Necrotic myocardial cells release molecules that act as danger signals, called damage associated molecular patterns (DAMPs), and are recognized by different cell receptors expressed by immune cells, cardiomyocytes and fibroblasts ([Mezzaroma et al, 2021](#)). Some receptors such as NOD-like receptors (NLRs) trigger the formation of inflammasomes, a multiprotein complex that releases and activates interleukin (IL)-1 β and IL-18. The NLR family pyrin domain-containing protein 1 (NLRP1) and protein 3 (NLRP3), and NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) inflammasomes are sensors that have distinct ligands and recognize several DAMPs ([Christgen, S et al 2020](#); [Martinon et al 2002](#)).

The inflammasome sensors are usually characterized by a central nucleotide-binding and oligomerization domain (NACHT) and C-terminal leucine-rich repeat domain (LRRs). NLRP3 contains amino-terminal pyrin domain (PYD); to recruit pro-caspase-1, it uses the adapter apoptosis-associated speck-like protein (ASC), which contains both PYD and caspase-recruiting domain (CARD) and acts as a bridge between the sensor and pro-caspase-1. NLRP1 and NLRC4 sensors have in their N-terminal portion the CARD and can directly recruit pro-caspase-1 by CARD-CARD interaction ([Martinon et al 2002](#); [Fernandes-Alnemri et al 2007](#)). NLRP1 and NLRC4 can also connect to ASC, leading to a more efficient caspase-1 activation

(Broz et al 2010). Sensor proteins can be sensitized by intra and extracellular stimuli; after activation, they recruit the protease caspase-1, which cleaves inactive precursors of IL-1 β and IL-18 into their mature and active forms (Abbate et al, 2020).

IL-1 β , released after MI by macrophages, neutrophils, cardiomyocytes and fibroblasts, acts in the mobilization of immune cells from the bone marrow to the site of ischemia, promoting pathological remodeling and contributing to contractile dysfunction (Abbate et al 2011; Sager et al 2015). Inhibition of IL-1 β after MI reduces the cardiac inflammatory process and reduces hospitalizations for heart failure and the incidence of new-onset heart failure (Abbate et al 2013; Abbate et al 2020; Everett et al 2019). The NLRP3 is the most studied inflammasome. Activation of the NLRP3 inflammasome in post-MI fibroblasts contributes to increased IL-1 β production (Sandanger et al 2013). Experimental studies have shown that NLRP3 activation after MI and consequent increase in IL-1 β contributes to adverse cardiac remodeling and heart failure (Yao et al 2018; Bracey et al 2013; Bian et al 2020). Increased NLRP3 expression and caspase-1 activity was observed after ischemic damage, and inhibition of NLRP3 resulted in smaller infarcted area in rodents (Mezzaroma et al 2011). Furthermore, NLRP3-deficient mice had decreased infarct size and attenuated cardiac dysfunction following ischemia/reperfusion (Kawaguchi et al 2011).

Despite extensive studies on NLRP3, the role of NLRP1 and NLRC4 inflammasomes in sterile inflammation, especially after MI, is poorly understood. NLRP1 and NLRC4 have been associated with inflammatory diseases and defense against infections (Man and Kanneganti 2015; Pontillo et al 2012a; Pontillo et al 2012b). Both inflammasomes are activated in the heart and endothelial cells of coronary heart disease patients (Borborema et al 2020; Johansson et al 2015). NLRC4 was activated in the hearts of cardiac failure patients while NLRP1 and NLRP3 inflammasomes remained unchanged (Onodi et al 2021). However, NLRP1 was activated via endoplasmic reticulum stress after myocardial ischemic injury and

associated with increased apoptosis and tissue damage in mice (Yang et al 2021; Cao et al 2020). Hyper activation of NLRC4 and caspase-1 increased cardiomyocyte death, worsened cardiac function and aggravated post-MI heart failure in an experimental model of diabetes mellitus (Durga Devi 2017).

Evidence shows that activation of inflammasomes plays a central role in the pathophysiological mechanisms of several inflammatory diseases, including MI, and NLRP3 participates in the inflammatory response after MI. However, only a few studies have evaluated the participation of NLRP1 and NLRC4 inflammasomes in acute inflammation after ischemic damage. The purpose of this study was to evaluate the expression of inflammatory markers including the NLRP1, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in the myocardium 72 hours after infarction in rats.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals and study protocol

Male Wistar rats weighing between 200–250 g were purchased from the Central Animal Center of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP, Brazil. The animals were fed with food and water *ad libitum* and kept in collective cages with three rats each in a temperature-controlled environment (24 ± 2 °C) and 12-h light–dark cycles. The study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Botucatu Medical School, UNESP (protocol nº 1307/2019) and all experiments were conducted following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Research Council (2011).

MI was induced by ligating the left anterior descending coronary artery as previously described (Guizoni, 2016). The rats from the control group (Sham) underwent the same surgical procedure without the coronary artery ligation. Animals were assigned to Sham and myocardial

infarction (MI) groups and euthanized 72 hours after the MI induction.

Collection of tissues

Seventy-two hours after MI induction, the rats were weighed and anesthetized with intraperitoneal sodium thiopental (120 mg/kg) and euthanized. After blood collection, hearts were removed by thoracotomy. Atria and ventricles were dissected and weighed. Left ventricle (LV) and serum samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Infarction size

The degree of heart injury by MI was assessed by the percentage of the infarcted area in relation to the total LV area and by the cross-sectional area of the myocytes. A LV slice was cut at 5 to 6 mm from the apex, which reflects the average of results from the entire ventricle ([Martinez, 2016](#)). Samples were fixed in 10% buffered formalin solution for 24 h following by wash in water and transferred to 70% ethanol, as previously described ([Martinez, 2016](#)). LV slices were stained with hematoxylin-eosin solution and examined in a microscope (Leica DM LS, Nussloch, Germany) coupled to a computerized imaging analysis system (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Infarction size was calculated by dividing the sum of endocardial and epicardial infarcted ventricular lengths by the sum of the total (infarcted and viable myocardium) endocardial and epicardial ventricular circumferences ([Martinez, 2016](#)). Values were expressed as percentage of the total LV area. Only rats with MI > 30% of total LV area at histological evaluation were included in the study.

Histological analysis

Serial transverse 8 µm thick sections were cut from non-infarcted LV in a cryostat, cooled to -20 °C and stained with haematoxylin and eosin. The smallest diameters passing

through the nucleus of 150 to 200 cardiomyocytes were measured ([Pagan LU, 2015](#)). Other slides were stained with Picrosirius red and used to quantify interstitial collagen fraction. On average, 20 microscopic fields were analyzed with a 40 X lens. Perivascular collagen was excluded from this analysis. Measurements were performed with a microscope (Leica DM LS; Nussloch, Germany) attached to a computerized imaging analysis system (Pro Plus software, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) ([Gomes MJ, 2016](#); [Gimenes R, 2018](#)).

Inflammasome expression by Western blot

Myocardial tissue was homogenized in RIPA buffer containing protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and phosphatase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) inhibitors using a bead beater homogenizer (Bullet Blender®, Next Advance, Inc., NY, USA), and centrifuged at 12,000 g, 4 °C, for 20 min. Protein concentrations were assessed using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). A total of 40-50 µg protein lysate was resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Armsham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The blotted membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 137 mmol/L NaCl and 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4 – 8 °C with the following primary antibodies: anti-NLRP3 (1:500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), NLRC4 (1:500, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA), NLRP1, ASC, caspase-1 and IL-1β (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Blots were then incubated for 1.5 h at room temperature with secondary antibody anti-rabbit IgG-HRP (Abcam, Cambridge, MA, USA) and anti-mouse IgG-HRP (Abcam) followed by chemiluminescence detection with SuperSignal® West Pico kit (Thermo Scientific) using Image Quant™ 800 (IQ800) (GE Healthcare). Quantification of band intensities was performed using Image J software (NIH). Results were normalized to the GAPDH (1:5000, Abcam).

Cytokine concentration

Concentration of IL-1 β was quantified in heart homogenate and in serum by ELISA. DuoSet Systems Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Results were acquired in the BioTek reader (Winooski, VT, USA) at 450 nm using the GEN5 software.

Gene expression by qRT-PCR

Gene expression of inflammasomes was evaluated by Real Time Quantitative PCR (RT-q-PCR). Total RNA was extracted from myocardium using TRIZOL® (Ambicon Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were quantified using Nano Drop spectrophotometer (Thermo Scientific) with absorbance values at 260 nm and expressed in ng/ μ L. All samples had an absorbance ratio at 260/280 nm of approximately 2.0.

The cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using reverse transcriptase High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following manufacturer's instructions. Amplification of NLRP3 (Rn04244620_m1), caspase-1 (Rn00562724_m1), ASC (Rn00597229_g1) and IL-1 β (Rn01514151_m1) genes was performed by qPCR in the StepOne™ Real-Time PCR System equipment (Applied Biosystems) with the TaqMan™ Gene Expression Master Mix kit (Thermo Scientific). Cyclophilin (Rn00690933_m1) and GAPDH (Rn01775763_g1) were used as housekeeping controls to normalize the relative fluorescence signal of the target genes. Each sample was analyzed in duplicate. Relative expression (fold-change: $2^{-\Delta\Delta Ct}$) of the interest genes was calculated by normalizing by the threshold cycle (Ct) values of the reference genes.

Statistical analysis

Results are presented as mean $\pm$ standard deviation or median and quartiles, according to distribution. Comparisons between groups were performed by Student's T-test or Mann-Whitney. Analyzes were performed using SigmaPlot software (Palo Alto, CA, USA) version 12.0. The significance level considered was 5%.

RESULTS

Experimental groups

Perioperative mortality after myocardial infarction induction is approximately 30%. Therefore, we subjected 35 rats to surgery to induce myocardial infarction (MI group) and 17 to a fictitious surgery (Sham group). Nineteen rats from IM and 2 from Sham died during the surgery and the perioperative period.

Anatomical variables are shown in Table 1. The MI group presented higher values of atrium weights, atrium/BW and LV/BW ratios compared to the Sham group.

Table 1. Anatomical variables

	Sham (n=15)	MI (n=16)
BW (g)	263 $\pm$ 31	249 $\pm$ 16
LV (g)	0.55 (0.49-0.65)	0.59 (0.57-0.64)
LV/BW (mg/g)	2.17 $\pm$ 0.15	2.44$\pm$0.17*
RV (g)	0.19 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03
RV/BW (mg/g)	0.74 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.11
Atria (g)	0.07 $\pm$ 0.01	0.11$\pm$0.03*
Atria/BW (mg/g)	0.27 $\pm$ 0.05	0.45$\pm$0.12*

MI: myocardial infarction; n: sample size; BW: body weight, LV: left ventricle weight; RV: right ventricle weight. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation or median and percentiles; test T de Student or Mann-Whitney; * p<0.001.

Histological study

The infarct size was 46% in the MI group (Figure 1). Cardiomyocyte diameters did not differ between groups (Figure 2) and interstitial collagen fraction was higher in the MI group (Figure 3).

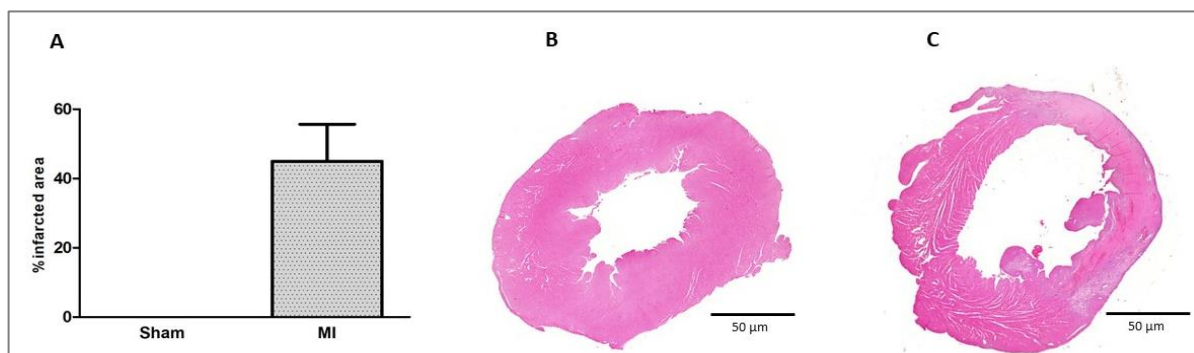


Figure 1. Myocardial infarction size. Infarcted area as a percentage of total left ventricle area (A); representative eosin-hematoxylin-stained left ventricle sections from Sham (B, n=9) and myocardial infarction (MI, n=10) groups. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation.

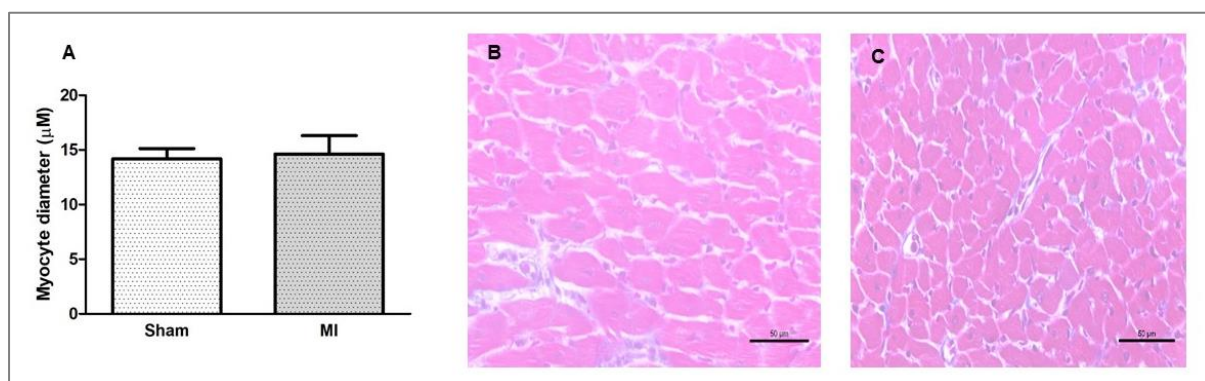


Figure 2. Left ventricle myocyte diameter (A); representative eosin-hematoxylin-stained left ventricle sections from Sham (B, n=9) and MI (C, n=11) groups. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation; Student's T test. 40x magnification.

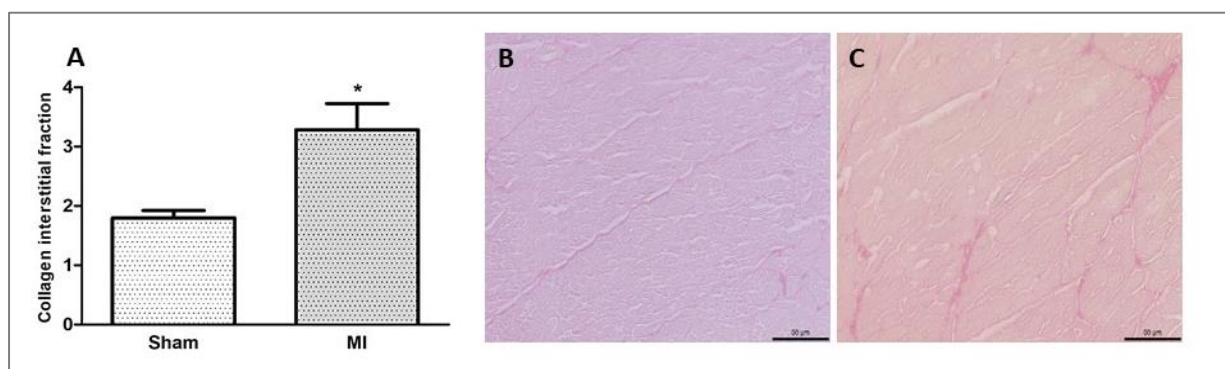
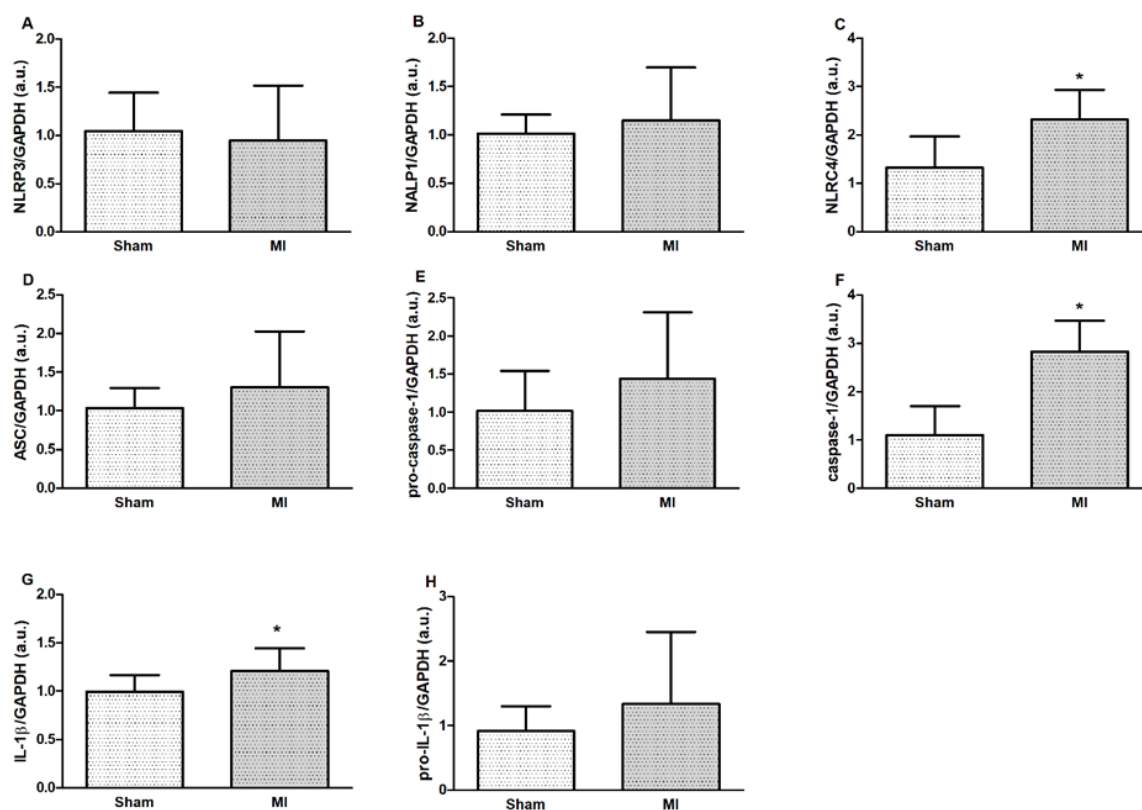


Figure 3. Left ventricle collagen interstitial fraction (A); representative *Picrosirius red*-stained left ventricle sections from Sham (B) and myocardial infarction (MI, C) groups. Data expressed as mean ± standard deviation; Student's T test; * $p < 0.001$. Sample size: 10 per group. 40x magnification.

Protein expression of inflammasomes

NLR4, caspase-1 and IL-1 β protein expression was higher in the MI group (Figure 4).

NLRP3, NLRP1, ASC, pro-caspase-1 and pro-IL-1 β expression did not differ between groups.



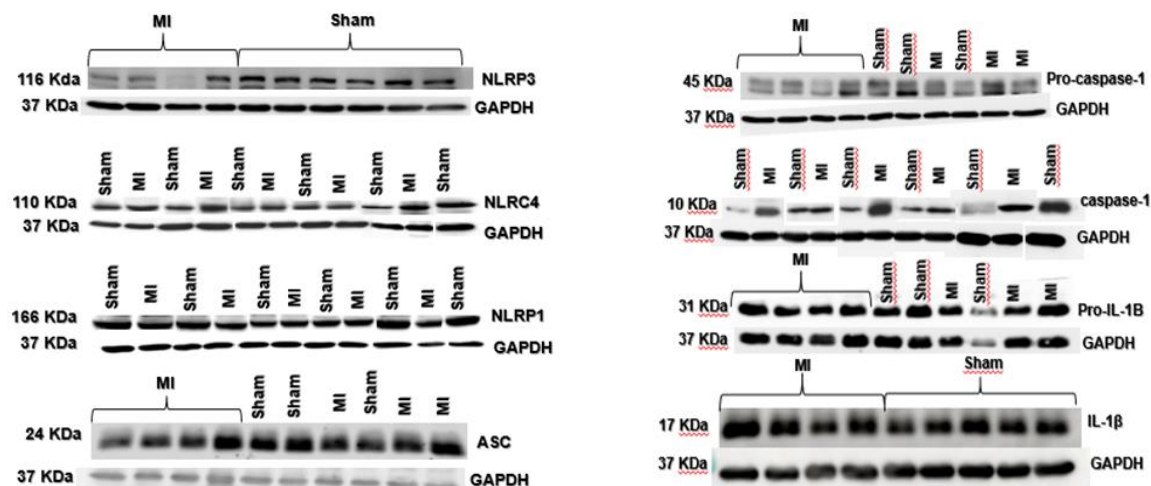


Figure 4. Protein expression and representative gels of myocardial inflammasome components analyzed by Western blot: NLRP3 (A), NALP1 (B), NLRC4 (C), ASC (D), pro-caspase-1 (E), caspase-1 (F), pro-IL-1 β (G), and IL -1 β (H). Sample size: Sham 15; MI 16; MI: myocardial infarction. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation; Student's T test; * $p < 0.05$

IL-1 β concentration

Myocardial and serum concentration of IL-1 β was higher in the MI group (Figure 5).

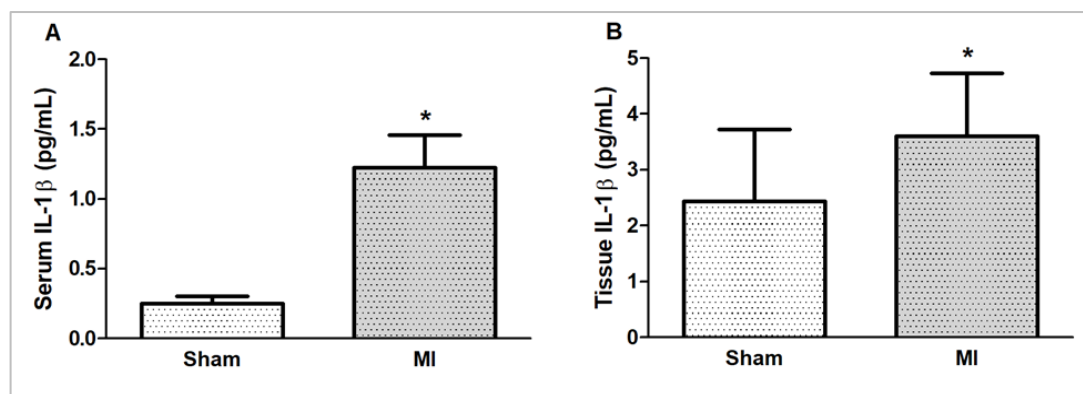


Figure 5. IL-1 β serum (A; Sham n=5; MI n=6) and myocardial (B; Sham n=15; MI n=16) concentration evaluated by ELISA. MI: myocardial infarction. Data expressed as mean $\pm$ SD; Student's T test; * $p < 0.05$.

Gene expression

Gene expression of NLRP3 and ASC was higher in the MI group. Gene expression of caspase-1 and IL-1 β did not differ between groups (**Figure 6**).

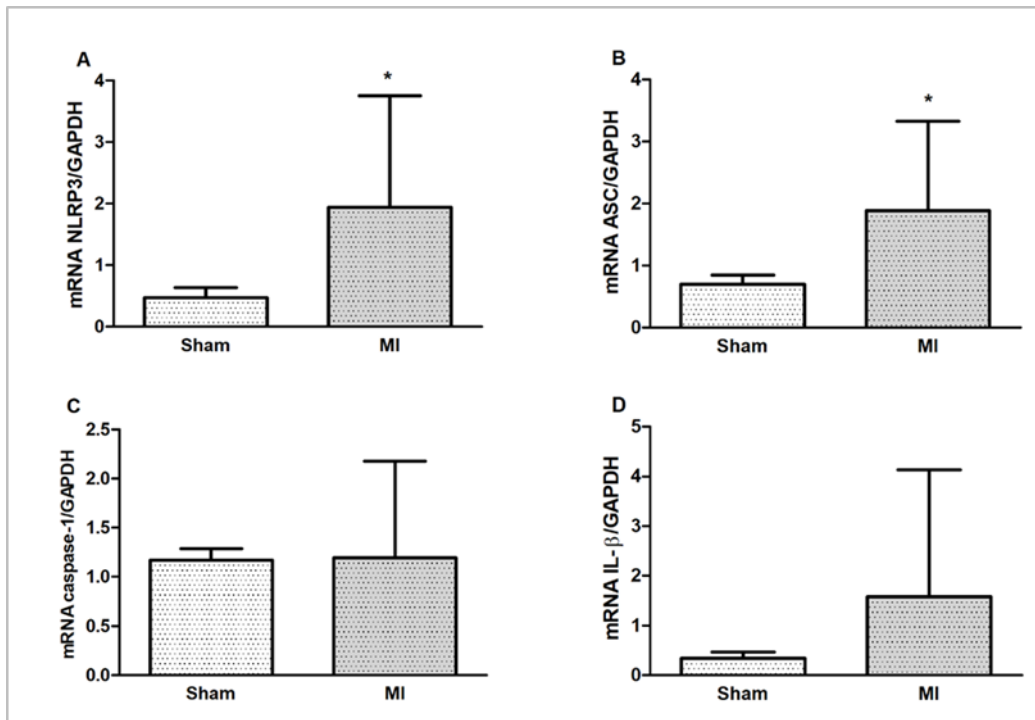


Figure 6. Myocardial gene expression of inflammasome components: NLRP3 (A), ASC (B), caspase-1 (C), and interleukin (IL)-1 β (D) normalized by the expression of the constitutive genes GAPDH and cyclophilin. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation; Student's T test; * $p < 0.005$.

DISCUSSION

In this study, we evaluated the myocardial expression of inflammasomes 72 hours after myocardial infarction, a period characterized by an acute inflammatory process.

Our results showed a higher myocardial gene expression of NLRP3 and ASC in infarcted rats, corroborating previous studies in animals and patients ([Sandanger et al 2013](#); [Kawaguchi et al 2011](#); [Zhang et al 2019](#)). Progression of several cardiovascular diseases, including myocardial infarction, has been related to increased gene and protein levels of the NLRP3 inflammasome, which may perpetuate inflammation and induce cardiac hypertrophy and dysfunction ([Yue R, et al 2021](#); [Bracey et al 2013](#)).

Gene transcription of inflammasome components is an important step in inflammasome platform activation. Two signals are necessary to inflammasome assembly in most cells. Signal 1 or priming, triggered by activation of cellular receptors, such as toll-like receptor (TLR) and IL-1 receptor (IL-1R), recognizes cellular debris and DAMPs including ATP, angiotensin II, fatty acids, glucose, high-mobility group box 1 (HMGB1), heat shock proteins (HSPs), and ROS released from dead myocytes ([Mauro et al 2019](#); [Toldo et al 2015](#)). Sensitization of TLR and IL-1R is followed by activation of inflammatory pathways and translocation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) that triggers transcriptional increase in NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and pro-IL-1 β . The signal 1 and the increase in mRNA copies of inflammasome key components are essential to activate the inflammasome platform in cardiac tissue ([Mauro et al 2019](#)). The second signal is consistent with stimulation and formation of the inflammasome complex, which is triggered by intra and extracellular changes, such as activation of the P2X7 purinergic receptor and K⁺ efflux, release of cathepsins by lysosomal damage, and increased ROS levels ([Pellegrini C, et al 2021](#)).

Gene expression of ASC was increased in MI group. ASC is an adapter protein that links the NLRP3 sensor to pro-caspase-1. After sensitization, the NLRP3 sensor oligomerizes, binds to ASC and, through PYD-PYD interaction, recruit pro-caspase-1, which by self-cleavage becomes active caspase-1, forming a filamentous structure with a core where pro-IL-1 β is cleaved into active form ([Mauro et al 2019](#)). Elevated ASC expression has been linked to increased risk of heart failure ([Butts et al 2016](#)), while gene deletion is associated with lower infarction size and myocardial fibrosis and improved ventricular function in infarcted mice ([Kawaguchi et al 2011](#)). In accordance, we observed that the higher ASC expression in the MI

group was combined with increased collagen interstitial fraction. ASC is necessary for caspase-1 activation in the NLRP3 inflammasome, but not in NLRP1 and NLRC4 inflammasomes, which have a CARD domain and can bind directly to caspase-1 ([Martinon et al 2002](#); [Fernandes-Alnemri et al 2007](#)). However, NLRP1 and NLRC4-induced activation of caspase-1 is more efficient and generates higher levels of IL-1 β when ASC protein is present ([Latz et al 2013](#); [Broz et al 2010](#)).

Similarly to other studies ([Shi et al 2021](#); [Frantz et al 2003](#); [Pomerantz et al 2001](#)), a higher protein expression of caspase-1 was observed in the MI group. The contribution of caspase-1 to exacerbation of inflammation and worsening of cardiac function was exemplified by the fact that genetic deletion of caspase-1 preserves cardiac function and reduces infarct size and IL-1 β levels in mice ([Kawaguchi et al 2011](#)). Caspase-1 deletion also had a protective effect by reducing left ventricular dilation and mortality in infarcted animals ([Frantz et al 2003](#); [Pomerantz et al 2001](#)).

We next analyzed protein expression of the NLRP1 and NLRC4 inflammasomes and their components. NLRC4 inflammasome is involved in the immune response against pathogens and autoimmune diseases. Its activation increases IL-1 β levels amplifying the inflammation ([Pontillo et al 2012b](#); [Man and Kanneganti 2015](#); [Canna et al 2014](#); [Freeman et al 2017](#)). NLRC4 levels are related to atherosclerosis and increased production of IL-18 in acute coronary disease patients ([Borborema et al 2020](#); [Johansson et al 2020](#); [Onodi et al 2021](#)). Increased NLRC4 expression was found in blood cells of coronary stenosis patients and in myocardium of heart failure subjects. Activation of the NLRC4 inflammasome is exacerbated 7 days after ischemia in diabetic mice hearts, which leads to increased concentration of IL-18 and necrosis in the area close to the infarction. Interestingly, NLRC4 activation was related to increased mitochondrial DNA due to impaired mitophagy ([Durga Devi et al 2017](#)). Although NLRC4 and its relationship with cardiovascular disease have attracted the attention of researchers, the role of this inflammasome after ischemic damage, especially its involvement in acute inflammation, is still unclear.

The human NLRP1 inflammasome has a PYD domain and requires ASC to bind to caspase-1, while murine NLRP1b can bind to caspase-1 directly ([Guey et al, 2014](#)). In our study, the expression of this inflammasome did not differ between groups, suggesting that, at least during this period, NLRP1 was not necessary to induce the inflammatory process. NLRP1 expression also did not differ between failing heart patients and healthy subjects ([Onodi et al](#)). On the other hand, NLRP1 activation was increased in the inflammatory response in arterial

endothelial cells and aortic stenosis lesion ([Borborema et al](#); [Wang et al 2018](#)). The involvement of the NLRP1 inflammasome in cardiac injury was exemplified in ischemia-reperfusion models, which showed that NLRP1 activation occurred by endoplasmic reticulum stress through the NF- κ B pathway, and that NLRP1-induced inflammation can be suppressed by increased autophagic flux ([Cao et al](#); [Yang et al](#)).

IL-1 β is a member of the IL-1 family. It plays crucial roles in the inflammatory response by increasing adhesion molecules and chemokines which mobilizes and activates immune cells, endothelial cells, and fibroblasts to damaged sites; production of proteins of the complement system and C-reactive protein; and phagocytic capacity of neutrophils and macrophages ([Dinarello, 2009](#)). However, IL-1 β is also related to perpetuation of inflammation ([Abbate et al 2020](#)). Our results showed that in acute post-infarction inflammation IL-1 β increases in serum and myocardium, corroborating other reports ([Garvin et al 2018](#); [Kawaguchi et al 2011](#)). High plasma concentration of IL-1 β was observed 6 hours after ischemia-reperfusion in rats and were related to increased cardiomyocyte necrosis ([Garvin et al 2018](#)). Similar results were observed 24 hours after infarction in mice ([Bian et al 2020](#)).

At basal condition, IL-1 β is stored in inactive form and its level is low. After priming, the synthesis of IL-1 β increases in the cytosol, requiring caspase-1 to its cleavage and activation ([Mezzaroma et al 2021](#)). Caspase-1 also cleaves the protein gasdermin D (GSDMD), exposing its N-terminal portion (GSDMD-NT), which binds to plasma membrane lipids and creates pores, facilitating the release of IL-1 β to the extracellular environment ([Evavold et al 2017](#)). The plasma membrane pores cause electrolyte imbalance, water entry in cells, and myocyte rupture, a type of cell death called pyroptosis ([Dinarello 2009](#); [Shi et al 2021](#); [Yue et al 2021](#)). In this study, we observed increased concentration of IL-1 β in serum and myocardium, and increased myocardial IL-1 β protein expression. In contrast, IL-1 β mRNA did not differ between groups. The discrepant result may be due to the fact that IL-1 β gene expression was not assessed in different myocardial cell types. During acute inflammation, IL-1 β is mostly produced by fibroblasts and immune cells; despite the presence of active caspase-1, cardiomyocytes produce small amount of IL-1 β ([Sandanger et al 2013](#); [Kawaguchi et al 2011](#); [Mezzaroma et al 2011](#)). Myocardial damage and increased IL-1 β levels occur prior to the infiltration of macrophages and neutrophils at the site of injury during ischemia-reperfusion in mice ([Kawaguchi et al 2011](#)). Interestingly, activation of inflammasomes in myocytes leads to contractile function impairment and IL-1 β production by other cell types that can indirectly contribute to worsening cardiac function ([Mezzaroma et al 2011](#); [Toldo et al 2016](#); [Abbate et al 2020](#)).

In summary, activation of inflammasomes plays an essential role in the pathophysiological mechanisms triggered after myocardial infarction ([Abbate et al 2020a](#); [Abbate et al 2020b](#); [Everett et al 2019](#); [Emmi et al 2018](#)). Understanding the participation of different inflammasomes after infarction should contribute to the development of drugs aimed at preserving ventricular function and attenuating heart failure in infarction patients.

CONCLUSION

Myocardial infarction acutely induces inflammation characterized by increased gene expression of NLRP3 and ASC; protein expression of NLRC4, caspase-1, and interleukin-1 β ; and serum and myocardial concentration of interleukin-1 β in combination with increased myocardial collagen interstitial fraction.

REFERENCES

Abbate A, Salloum FN, Van Tassell BW, Vecile E, Toldo S, Seropian I, Mezzaroma E, Dobrina A. Alterations in the interleukin-1/interleukin-1 receptor antagonist balance modulate cardiac remodeling following myocardial infarction in the mouse. *PLoS One*. 2011;6:e27923.

Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van Tassell BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2020 Apr 24;126(9):1260-1280.

Abbate A, Trankle CR, Buckley L, et al. Interleukin-1 blockade inhibits the acute inflammatory response in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Heart Association*. 2020 b;9:e014941.

Abbate A, Van Tassell BW, Biondi-Zoccai G, Kontos MC, Grizzard JD, Spillman DW, Oddi C, Roberts CS, Melchior RD, Mueller GH, et al. Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial (2) (VCUART2) pilot study].

Am J Cardiol. 2013;111:1394–1400.

Activation. Am J Pathol (2017) 187:2659–73.

Bian Y, Li X, Pang P, Hu XL, Yu ST, Liu YN, Li X, Wang N, Wang JH, Xiao W, Du WJ, Yang BF. Kanglexin, a novel anthraquinone compound, protects against myocardial ischemic injury in mice by suppressing NLRP3 and pyroptosis. *Acta Pharmacol Sin.* 2020 Mar;41(3):319-326.

Borborema MEA, Crovella S, Oliveira D, de Azevêdo Silva J. Inflammasome Activation by NLRP1 and NLRC4 in Patients With Coronary Stenosis. *Immunobiology* (2020) 225:151940.

Bracey NA, Beck PL, Muruve DA, Hirota SA, Guo J, Jabagi H, Wright JR Jr, Macdonald JA, Lees-Miller JP, Roach D, Semeniuk LM, Duff HJ. The Nlrp3 inflammasome promotes myocardial dysfunction in structural cardiomyopathy through interleukin-1 β . *Exp Physiol.* 2013 Feb;98(2):462-72.

Broz, P., Von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E., Monack, D.M., 2010. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 8, 471–483.

Butts, B., Gary, R. A., Dunbar, S. B., and Butler, J. (2016). Methylation of apoptosis associated speck-like protein with a caspase recruitment domain and outcomes in heart failure. *J. Card. Fail.* 22, 340–346.

Canna SW, de Jesus AA, Gouni S, Brooks SR, Marrero B, Liu Y, et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet.* 2014 Oct;46(10):1140–6.

Cao L, Chen Y, Zhang Z, Li Y, Zhao P. Endoplasmic Reticulum Stress- Induced NLRP1 Inflammasome Activation Contributes to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Shock (Augusta Ga)* (2019) 51:511–8.

Christgen, S., Place, D.E., Kanneganti, T.D., 2020. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. *Cell Res.*

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519–550.

Durga Devi T, Babu M, Mäkinen P, Kaikkonen MU, Heinaniemi M, Laakso H, Ylä-Herttuala E, Rieppo L, Liimatainen T, Naumenko N, Tavi P, Ylä-Herttuala S. Aggravated Postinfarct Heart Failure in Type 2 Diabetes Is Associated with Impaired Mitophagy and Exaggerated Inflammasome Activation. *Am J Pathol.* 2017 Dec;187(12):2659-2673.

Emmi G, Urban ML, Imazio M, Gattorno M, Maestroni S, Lopalco G, et al. Use of Interleukin-1 Blockers in Pericardial and Cardiovascular Diseases. *Curr Cardiol Rep*. 2018;20(8).

Everett BM, Cornel JH, Lainscak M, Anker SD, Abbate A, Thuren T, Libby P, Glynn RJ, Ridker PM. Anti-inflammatory therapy with canakinumab for the prevention of hospitalization for heart failure. *Circulation*. 2019;139:1289–1299.

Fernandes-Alnemri, T.; Wu, J.; Yu, J.-W.; Datta, P.; Miller, B.; Jankowski, W.; Rosenberg, S.; Zhang, J.; Alnemri, E.S. The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell Death via caspase-1 activation. *Cell Death Dis*. 2007, 14, 1590–1604.

Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol* 30: 240–245, 2015.

Frantz S, Ducharme A, Sawyer D, Rohde LE, Kobzik L, Fukazawa R, Tracey D, Allen H, Lee RT, Kelly RA. Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 35: 685–694, 2003. doi:10.

Freeman L, Guo H, David CN, Brickey WJ, Jha S, Ting JP-Y. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J Exp Med*. 2017 May 1;214(5):1351–70.

Garvin AM, Jackson MA, Korzick DH. Inhibition of programmed necrosis limits infarct size through altered mitochondrial and immune responses in the aged female rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018 Nov 1;315(5):H1434-H1442.

Gatto M, Mota GAF, Okoshi MP. Influence of the Immune System on Cardiovascular Disease. *Arq Bras Cardiol*. 2023 Jul;120(8):e20230398

Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):1–8.

Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima ARR, et al. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.

Guizoni D.M., Oliveira-Junior S.A., Noor S.L.R., Pagan L.U., Martinez P.F., Lima A.R.R., Gomes M.J., Damatto R.L., Cezar M.D., Bonomo C., et al. Effects of late exercise on cardiac remodeling and myocardial calcium handling proteins in rats with moderate and large size myocardial infarction. *Int. J. Cardiol*. 2016;221:406–412.

Guey B, Bodnar M, Manié SN, Tardivel A and Petrilli V. Caspase-1 Autoproteolysis is Differentially Required for NLRP1b and NLRP3 Inflammasome Function. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:17254–9.

Johansson Å, Eriksson N, Becker RC, Storey RF, Himmelmann A, Hagström E, et al. NLRC4 Inflammasome Is an Important Regulator of Interleukin-18 Levels in Patients With Acute Coronary Syndromes: Genome-Wide Association Study in the PLATelet Inhibition and Patient Outcomes Trial (PLATO). *Circ Cardiovasc Genet* (2015) 8:498–506.

Jong, W. M. C., et al. (Nov. 2014). Nlrp3 plays no role in acute cardiac infarction due to low cardiac expression. *International Journal of Cardiology*, 177(1), 41–43

Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* (2011) 123:594–604.

Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 397–411.

Man, S. M., and Kanneganti, T. D. (2015). Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* 265, 6–21.

Martinez P.F., Bonomo C., Guizoni D.M., Oliveira S.A., Damatto R.L., Cezar M.D.M., Lima A.R.R., Pagan L.U., Seiva F.R., Bueno R.T., et al. Modulation of MAPK and NF- κ B signaling pathways by antioxidant therapy in skeletal muscle of heart failure rats. *Cell. Physiol. Biochem.* 2016;39:371–384.

Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The Inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell*.

Mauro AG, Bonaventura A, Mezzaroma E, Quader M, Toldo S. NLRP3 Inflammasome in Acute Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019 Sep;74(3):175-187.

Mezzaroma E, Abbate A, Toldo S. NLRP3 Inflammasome Inhibitors in Cardiovascular Diseases. *Molecules.* 2021 Feb 12;26(4):976. PMID: 33673188.

Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49):19725-30.

Onódi Z, Ruppert M, Kucsera D, Sayour AA, Tóth VE, Koncsos G, et al. AIM2-Driven Inflammasome Activation in Heart Failure. *Cardiovasc Res* (2021) 117:2639–51.

Pagan LU, Damatto RL, Cezar MD, et al. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:61-74.

Pellegrini C, Martelli A, Antonioli L, Fornai M, Blandizzi C, Calderone V. NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases: Pathophysiological and pharmacological implications. *Med Res Rev*. 2021 Jul;41(4):1890-1926.

Pomerantz BJ, Reznikov LL, Harken AH, Dinarello CA. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2871–2876, 2001.

Pontillo A, Catamo E, Arosio B, Mari D, Crovella S. NALP1/NLRP1 genetic variants are associated with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2012a ;26(3):277–81.

Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JAT, Donadi EA, Crovella S, et al. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012b Jun;45(4):271–8.

Ren Z, Yang K, Zhao M, Liu W, Zhang X, Chi J, Shi Z, Zhang X, Fu Y, Liu Y, Yin X. Calcium-Sensing Receptor on Neutrophil Promotes Myocardial Apoptosis and Fibrosis After Acute Myocardial Infarction via NLRP3 Inflammasome Activation. *Can J Cardiol*. 2020 Jun;36(6):893-905.

Sager HB, Heidt T, Hulsmans M, Dutta P, Courties G, Sebas M, Wojtkiewicz GR, Tricot B, Iwamoto Y, Sun Y, et al. Targeting interleukin-1 β reduces leukocyte production after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2015;132:1880–1890.

Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, et al. The NLRP3 Inflammasome is Up-Regulated in Cardiac Fibroblasts and Mediates Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury. *Cardiovasc Res* (2013) 99:164–74.

Shi H, Gao Y, Dong Z, Yang J, Gao R, Li X, Zhang S, Ma L, Sun X, Wang Z, Zhang F, Hu K, Sun A, Ge J. GSDMD-Mediated Cardiomyocyte Pyroptosis Promotes Myocardial I/R Injury. *Circ Res*. 2021 Jul 23;129(3):383-396

Toldo S, Mezzaroma E, McGeough MD, et al. Independent roles of the priming and the triggering of the NLRP3 inflammasome in the heart. *Cardiovasc Res*. 2015;105:203–212.

Toldo S, Marchetti C, Mauro AG, Chojnacki J, Mezzaroma E, Carbone S, Zhang S, Van Tassell B, Salloum FN, Abbate A. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol*. 2016;209:215–

220.

Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, Avery CL, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2023 Feb 21;147(8):e93–621.

Yang Y, Li J, Rao T, Fang Z, Zhang J. The Role and Mechanism of Hyperoside Against Myocardial Infarction in Mice by Regulating Autophagy via NLRP1 Inflammation Pathway. *J Ethnopharmacol* (2021) 276:114187.

Yue R, Zheng Z, Luo Y, Wang X, Lv M, Qin D, et al. NLRP3-Mediated Pyroptosis Aggravates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Dysfunction in Mice: Cardioprotective Role of Irisin. *Cell Death Discov* (2021) 7:50.

Yao C, Veleva T, Scott L Jr, Cao S, Li L, Chen G, et al. Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2018 Nov 13;138(20):2227-2242.

Zhang L, Liu P, Wen W, Bai X, Zhang Y, Liu M, Wang L, Wu Y, Yuan Z, Zhou J. IL-17A contributes to myocardial ischemic injury by activating NLRP3 inflammasome in macrophages through AMPK α /p38MAPK/ERK1/2 signal pathway in mice. *Mol Immunol*. 2019 Jan;105:240-250.

Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong Y-N, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*. 2011 Sep 14;477(7366):596–600.

Wang W, Wang C, Gong Y, Zhang X. Inhibition of NLRP1 Inflammasome Might be a Novel Therapeutic Target in the Treatment of Peripheral Arterial Disease. *Int J Cardiol* (2018) 256:29.