



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Analí Galluce Torina

Ação da Diacereína no Remodelamento Ventricular Esquerdo Após Infarto Agudo do Miocárdio: Estudo Experimental.

The Diacerein Properties on the Left Ventricle Remodeling After Acute Myocardial Infarction: Experimental Study.

CAMPINAS

2015

Analí Galluce Torina

**Ação da Diacereína no Remodelamento Ventricular Esquerdo Após
Infarto Agudo do Miocárdio: Estudo Experimental.**

***The Diacerein Properties on the Left Ventricle Remodeling After
Acute Myocardial Infarction: Experimental Study.***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

*Thesis presented to the Medical Sciences Faculty of State
University of Campinas as part of the requirements for
obtainment of the Ph.D. degree in Sciences.*

Orientador : Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior

Este exemplar corresponde à versão
final da tese defendida pela aluna
Analí Galluce Torina e orientada pelo
Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior.

CAMPINAS

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-4354-15; FAPESP, 2011/14550-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T632a Torina, Anali Galluce, 1981-
Ação da diacereína no remodelamento ventricular esquerdo após infarto agudo do miocárdio : estudo experimental / Anali Galluce Torina. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Orlando Petrucci Junior.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infarto do miocárdio. 2. Remodelação ventricular. 3. Isquemia. 4. Citocinas. 5. Anti-inflamatórios. I. Petrucci Junior, Orlando, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The diacerein properties on the left ventricle remodeling after acute myocardial infarction : experimental study

Palavras-chave em inglês:

Myocardial infarction
Ventricular remodeling
Ischemia
Cytokines

Anti-inflammatory agents

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Orlando Petrucci Junior [Orientador]
Elaine Soraya Barbosa de Oliveira Severino
João Carlos Ferreira Leal
Otavio Rizzi Coelho Filho
Luciano Cabral Albuquerque

Data de defesa: 22-12-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ANALÍ GALLUCE TORINA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. ORLANDO PETRUCCI JUNIOR**
- 2. PROF(A). DR(A). ELAINE SORAYA BARBOSA DE OLIVEIRA**
- 3. PROF. DR. JOÃO CARLOS FERREIRA LEAL**
- 4. PROF. DR. OTAVIO RIZZI COELHO FILHO**
- 5. PROF. DR. LUCIANO CABRAL ALBUQUERQUE**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 22/12/2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais João Torina e Dalila Galluce Torina, com todo o meu amor, orgulho, respeito e admiração por vocês. Por todas as nossas árduas batalhas, por nossas vitórias e por sempre estarem comigo. Me ensinaram que o caminho da vida deve ser percorrido com honestidade, lealdade e muito trabalho. Amo-lhes infinitamente!

A minha irmã gêmea Aline Galluce Torina, minha melhor amiga e fiel escudeira, por estar comigo em todos os momentos me apoiando, incentivando e não me deixando desistir. Divido esta conquista também com o meu cunhado Eduardo Macatti, exemplo de pai e de pessoa, obrigado pelo seu apoio. Por fim, com minhas sobrinhas Beatrice e Marina, amores da minha vida!

Ao meu esposo José Alexandre Pio Magalhães, meu eterno companheiro, pela ajuda e por estar comigo nos momentos de ansiedade e estresse durante o período em que me dediquei ao doutorado. Dedico também este trabalho a toda sua família pelo incentivo e orações.

Ao meu tio Francisco Galluce (*in memoriam*) e Enedina Galluce pelo incentivo sempre oferecido a mim desde a graduação a pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela fé e caminhada árdua durante estes anos de doutorado, somente ele é a prova da minha dedicação que por muitas vezes pôde não ter dado o melhor resultado, mas nunca deixei de dar o melhor de mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando Petrucci Jr., médico cirurgião renomado e pesquisador respeitado. Sempre dedicado a Disciplina da Cirurgia Cardíaca e ao Laboratório LIRM que tanto se orgulha. Professor, formador e amigo a quem devo minha formação profissional como perfusionista e também meu ingresso na pesquisa. A você, tenho profunda admiração, respeito e carinho.

Aos amigos da Técnica Cirúrgica (Núcleo de Cirurgia Experimental), Srta. Ana Cristina, Sr. Willian, Sr. Miguel e Sr. Benedito, por todos os ensinamentos transmitidos a mim ao longo dos anos. Pelo carinho que me receberam e pelos dias de convívio marcados pela descontração e alegria de todos. Nunca deixando-me esquecer que experimental não é "certezal". Muito Obrigado!

Aos amigos de laboratório pelo convívio diário, pelos momentos de alegrias e frustrações vividos juntos no laboratório e na pós graduação.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Wilson Vieira, verdadeiro professor e formador da disciplina da Cirurgia Cardíaca. Amigo e com sorriso acolhedor esta sempre por perto nos aconselhando e orientado. Sinto profunda admiração e respeito pelo seu trabalho e pessoa.

Aos amigos da equipe de Cirurgia Cardíaca da Unicamp, muito obrigado pelo apoio e ensinamentos durante a minha formação como perfusionista e na pesquisa.

Aos meus amigos e familiares que diretamente ou indiretamente contribuíram por mais esta conquista, muito obrigado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

O remodelamento cardíaco é caracterizado por alterações do miocárdio em resposta a injúria ou sobrecarga de trabalho sofrida pelo coração durante determinadas situações. Após evento do infarto agudo do miocárdio, o RC é considerado um fenômeno deletério e sua gênese esta relacionada a diversos mecanismos inflamatórios. Estudamos a diacereína que é um composto antraquinona com propriedade anti-inflamatória que inibe a síntese e a atividade de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral e interleucinas 1 e 6. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da diacereína no remodelamento ventricular in vivo após isquemia. A ligadura da artéria interventricular anterior foi feita para induzir infarto do miocárdio em ratos em um modelo experimental. Os ratos foram divididos em quatro grupos: grupo Controle (n=16) e grupo Sham (n=8) que receberam solução salina (n=16) e grupo Diacereína (n=10) e SHAM com Diacereína (n=10) que receberam a diacereína (80 mg/kg/dia). Após 4 semanas, análises moleculares, atividade de caspase 3 e análises hemodinâmicas foram comparados entre os grupos. Os resultados demonstram redução dos volumes sistólico e diastólico final do VE no grupo tratado comparado com o grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente). Em comparação com ratos do grupo controle, os ratos tratados com diacereína exibiram menos fibrose no VE ($14,65\% \pm 7,27\%$ vs $22,57\% \pm 8,94\%$, $p < 0,01$), menor atividade caspase 3 e baixos níveis de transcrição NF-kB p65. Concluímos que o tratamento com diacereína uma vez ao dia durante 4 semanas após o IAM promoveu diminuição do remodelamento ventricular, com menor volume diastólico e sistólico final do VE. A diacereína também promoveu uma redução de fibrose no VE. Acreditamos que tais efeitos podem estar associados com obstrução parcial da via NF-kB.

Palavras-chave: Infarto do miocárdio, Remodelamento ventricular, Isquemia, Citocinas, Agentes anti-inflamatório.

The diacerein properties on the left ventricle remodeling after acute myocardial infarction: experimental study.

ABSTRACT

Cardiac remodeling is characterized by myocardial changes in response to injury or work overload suffered by the heart during certain situations. After the acute myocardial infarction event, the RC is considered a deleterious phenomenon and its genesis is related to several inflammatory mechanisms. We studied the diacerein that is an anthraquinone compound with anti-inflammatory properties which inhibit the synthesis and activity of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor and interleukin 1 and 6. The aim of this study was to investigate the effects of diacerein on remodeling ventricular in vivo after ischemia. The ligation of the left anterior descending artery was made to induce myocardial infarction in rats in an experimental model. The rats were divided into four groups: control group (n = 16) and Sham group (n = 8) that received saline (n = 16) and Diacerein group (n = 10) and SHAM with Diacerein (n = 10) received diacerein (80 mg / kg / day). After 4 weeks, molecular analysis, caspase 3 activity and hemodynamic tests were compared between groups. The results show reduction in systolic and end-diastolic LV volumes in the treated group compared with the control group (p <0.01 and p <0.01, respectively). In comparison with control rats, rats treated with diacerein exhibited less fibrosis in the left ventricle (14.65% vs. 22.57% ± 7.27% ± 8.94%, p <0.01), lower caspase 3 activity and low transcript levels of NF-kB p65. We conclude that treatment with diacerein once a day for 4 weeks after myocardial infarction promotes a decrease in ventricular remodeling, with lower end systolic and diastolic volume of the left ventricle. Diacerein also promoted a reduction of fibrosis in the left ventricle. We believe that such effects may be associated with partial blockage of the NF-kB pathway.

Key words: Myocardial infarction, Remodeling ventricular, Ischemia, Cytokines, Anti-inflammatory agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama da via de sinalização de NF-kB.....pg 21

Figura 2 - Foto ilustrativa de uma das plantas do gênero *Cassia*.....pg 23

Figura 3 - Estrutura química da diacereína.....pg 23

Figura 4 - Estrutura química do composto rhein.....pg 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BW: *Body Weight*

CCD: *Cross-Sectional Area*

CSA: *Cross-Sectional Area*

dP/dt max: derivada pressão/derivada tempo máximo

dP/dt mín: derivada pressão/derivada tempo mínimo

dP/dt max: *derived from pressure / derived maximum time*

dP/dt min: *derived from pressure / derived minimum time*

EDV: *End-Diastolic Volume*

EF: *Ejection Fraction*

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ESV: *End-Systolic Volume*

FCM: Faculdades de Ciências Médicas

HR: *Heart Rate*

IM: Infarto do Miocárdio

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

IC: Insuficiência Cardíaca

ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva

I/R: Isquemia e Reperfusão

IL-1: Interleucina -1

IL-1: *Interleukin -1*

IL-1 β : Interleucina -1beta/

IL-6: Interleucina -6

IL-6: *Interleukin -6*

LV: *Left Ventricular*

LIRM: Laboratório de Isquemia e Reperfusão do Miocárdio

LCA: *Left Coronary Artery*

MI: *Myocardial Infarction*

NF- κ B: Fator kappa B Nuclear

NF- κ B: *Nuclear Factor Kappa B F-kB*

NIH: *National Institute of Health*

PCR-Real Time: Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

RC: Remodelamento Cardíaco

SDS-Page: *Polyacrilamida Dodecyl Sulfate*

TAU: Tempo de Relaxamento Isovolumétrico

TRADD: TNFR1-Associated Death Domain

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α

TNF- α : Tumor necrosis factor - α

TNFR1: Receptor 1 de TNF

TNFR2: Receptor 2 de TNF

VE: Ventrículo Esquerdo

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE SÍMBOLOS

α – alpha

κ – kappa

β - beta

ug – micrograma

mm- milímetro

mmHg- milímetro de mercurio

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	15
2- OBJETIVO.....	25
3- METODOLOGIA.....	26
4- RESULTADOS.....	32
<i>Artigo: Diacerein Improves Left Ventricular Remodeling and Cardiac Function by Reducing the Inflammatory Response after Myocardial Infarction. PLoS ONE. 2015; 10(3): e0121842. doi:10.1371/journal.pone.0121842</i>	
5- DISCUSSÃO GERAL.....	46
6- CONCLUSÃO.....	51
7- REFERÊNCIAS.....	52
8- ANEXOS.....	60

1- INTRODUÇÃO

O remodelamento cardíaco (RC) foi descrito em 1982 por Hockman e Buckey, onde eles discutiam sobre a substituição do tecido necrótico na área infartada por um tecido cicatricial (1, 2). Atualmente, sabemos que o RC é um processo complexo que engloba além da substituição tecidual um conjunto de alterações no coração decorrentes de injúria ou sobrecarga de trabalho durante determinadas situações (3).

Vários estudos demonstram que essas alterações são genéticas, moleculares, celulares e intersticiais (características microscópicas) (3-8). Como consequências de tais alterações, observamos clinicamente o coração menos elíptico e mais esférico devido as variações anatômicas no tamanho, massa, forma, geometria e função do coração (características macroscópicas) (3-5, 9). Esses eventos permitem que o coração se adapte às novas condições de funcionamento inicialmente benéficas e necessárias, mas para isso ativam mediadores (por exemplo: neuro hormônios, citocinas e estresse oxidativo) que se potencializam e se correlacionam entre si (3). Como consequência, ao passar do tempo e com as modificações moleculares, ocorre a hipertrofia das células cardíacas (miócitos) e aumento da massa ventricular, reduzindo o estresse parietal (lei de Laplace) para compensar e estabilizar o coração para manter suas funções (3, 9). Porém, essas alterações promovem uma sobrecarga de trabalho ocasionando dilatação do coração, alterações na geometria, de contratilidade/relaxamento e aumento do volume sistólico e diastólico. A progressão deste conjunto de alterações são prejudiciais ao coração, pois promovem ao longo do tempo a disfunção progressiva do ventrículo esquerdo (VE), insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ou morte súbita (1, 9). Estas alterações possuem mecanismos complexos, como alterações da via de cálcio, beta-adrenérgica e alterações das proteínas contráteis (1, 9).

O processo de RC tem como fator principal a sobrecarga de volume, embora múltiplos fatores como a ingestão excessiva de sal, atividade simpática, níveis de neuro-hormônios, etilismo, diabetes mellitus, exercícios físicos, estresse oxidativo, doenças de origem isquêmicas ou valvares, hipertensão arterial sistêmica e processos inflamatórios são descritos na literatura (9, 10).

Neste contexto, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma das principais causas de RC devido a perda aguda de miocárdio lesado durante a isquemia e necrose. Durante este processo ocorre a substituição do tecido lesado pelo tecido cicatricial, promovendo o mecanismo reparador do RC. O RC está acompanhado da deposição de fibrose e colágeno na área acometida pelo IAM (9, 11). O processo de fibrose cardíaca ocorre com acúmulo de tecido fibroso associado com a reação inflamatória, que resulta na cicatrização da área infartada e da área de risco (não infartada), permitindo desta maneira momentaneamente a reestruturação do miocárdio (8, 12). A necrose celular na região acometida é caracterizada por ruptura de membrana devido ao edema celular, lise celular e fragmentação, com uma resposta inflamatória aguda sempre associada (4, 13). Esses dois processos podem levar à disfunção sistólica, diastólica e arritmias (12, 14).

A associação do IAM com a resposta inflamatória e a lesão promovida pela isquemia e reperfusão (I/R) é a causa principal entre as doenças cardiovasculares que leva ao RC (15).

Após o IAM, o processo de RC é caracterizado e considerado um fator importante de mortalidade, pois influencia diretamente a função ventricular (6). Para manter preservada a função ventricular, o RC leva ao aumento dos diâmetros do ventrículo esquerdo e da espessura da parede ventricular (4, 16). Além disso, devido a uma perda de tecido muscular, ocorre uma queda do volume ejetado e aumento do volume sistólico e diastólico final do VE. Isso faz com que as células musculares cardíacas saudáveis sofram sobrecarga de trabalho promovendo aumento da tensão, dilatação do VE e disfunção ventricular associando-se a um pior prognóstico (1, 6, 8, 17).

O IAM é um problema de saúde mundial crescente nas últimas décadas. Os indivíduos acometidos pelo IAM apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade na prática clínica de acordo com a Organização Mundial da Saúde (14, 18-20). O IAM apresenta origem multifatorial destacando-se a hereditariedade, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, hipertriglicerídicos e tabagismo. Estes fatores promovem disfunção cardíaca, endotelial, vascular e muitas outras complicações (21).

A doença que precede o IAM é conhecida como Aterosclerose,

caracterizada por inflamação crônica na parede vascular com acúmulo de lipídios no espaço subendotelial, fazendo que ocorra a formação de um trombo ocluindo o vaso coronariano (22, 23). Com a oclusão, a irrigação sanguínea (oxigênio e nutrientes) não ocorre adequadamente no coração deixando as células em estado de hipóxia, levando ao infarto na região afetada (14, 23). Após IAM o coração sofre mudanças na sua estrutura quanto a sua flexibilidade, capacidade de energia e de adaptação (16). Porém, o principal efeito biológico que ocorre no coração após IAM é o que conhecemos como I/R do miocárdio (24).

A I/R é uma condição inflamatória caracterizada por respostas imunes inatas, definida como o restabelecimento da circulação com objetivo de levar nutrientes e oxigênio as células previamente isquêmicas, necessário para o salvamento celular (16, 18, 25). Este restabelecimento promove lesões de reperfusão no período inicial pela formação de espécies reativas de oxigênio, stress oxidativo, disfunção mitocondrial e sobrecarga de cálcio (26, 27). Segundo autor Ke He e colaboradores, a I/R é uma lesão contínua, sendo um desafio nos dias atuais para os médicos (20). Entretanto, a ausência da reperfusão é um evento devastador associado a um pior prognóstico (28, 29). A quantidade de células que morrem durante e após a isquemia é o determinante primário do resultado tardio do IAM. Neste contexto, a redução do número de células lesadas na I/R através do restabelecimento sanguíneo na região afetada, apresenta-se como uma estratégia de suma importância nesta doença (30).

A importância de encontrar estratégias e drogas que possam minimizar a lesão de I/R é fundamental durante as síndromes coronárias agudas, bem como, no intra-operatório de cirurgias cardíacas onde também ocorre a I/R do miocárdio (30, 31).

Nas últimas duas décadas tem sido descrito diversas técnicas visando a cardioproteção durante a reperfusão com a conseqüente redução da área de infarto e melhor remodelamento ventricular (32, 33). O conceito de que a lesão de I/R pode ser limitada por manipulações farmacológicas é conhecido há quase 40 anos. Maroko e colaboradores introduziram a nova idéia de que a extensão e gravidade do dano miocárdico talvez não possa ser pré-determinado, mas pode ser modificado por manipulações durante a I/R (34).

A reperfusão está associada com a cascata inflamatória, ocasionando danos às células cardíacas após o período de isquemia devido a lesões oxidativas (16, 35). Neste processo, estudos revelam aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, moléculas de adesão e também de interleucinas (5, 35-37). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias contribuem para a ICC, entretanto, são necessários mais estudos para compreensão fisiológica dos benefícios e dos danos causados pelas citocinas no coração (36, 38).

Em especial, as citocinas são proteínas secretadas por células da imunidade inata e adaptativa, sendo produzidas como resposta à microorganismos e outros antígenos. Diferentes citocinas estimulam respostas diversas nas células envolvidas na imunidade e inflamação. Quando estimuladas por um agente, são liberadas e agem por meio de receptores de membrana específicos, modulando a produção e atividade de outras citocinas (39). As citocinas são moléculas de sinalização que atuam atraindo células inflamatórias através de seus efeitos biológicos, para diferentes sítios que são atacados. Esses efeitos, são considerados de ação direta ou de ação indireta, onde é necessário primeiramente a ativação dos fatores de transcrição (4).

As citocinas são mediadores pleiotrópicos e possuem uma gama de ações em todos os tipos de células envolvidas no reparo cardíaco (40). Em geral, estudos demonstram que a liberação de pequenas quantidades de citocinas nos tecidos estão associados ao efeito benéfico, determinando uma ativação dos mecanismos de defesa do organismo contra um agente agressor. Em contrapartida, quantidades excessivas desses mediadores provocam efeitos deletérios ao organismo (36, 38). Níveis de citocinas pró-inflamatórias elevados na circulação sistêmica estão associados a diversos fatores, entre eles a falência do miocárdio (41).

Algumas citocinas pró-inflamatórias são mais estudadas no coração por serem expressas pelo estresse causado pelo IAM, I/R e também pela fisiopatologia da hipertrofia, entre elas: Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1) e a Interleucina-6 (IL 6). No entanto, os mecanismos e o papel preciso da inflamação não são totalmente conhecidos (42).

A IL-1 está envolvida com o IAM devido sua produção excessiva na presença do colesterol. Macrófagos ativados dentro da placa de ateroma, expressam IL-1, resultando na inflamação da parede endotelial (43). Estudos genéticos sugerem que IL-1 desempenha papel crucial no remodelamento do coração infartado envolvendo ações e tipos de células distintas (40). A interrupção na cascata de sinalização da IL-1 demonstra melhora do remodelamento após o infarto do miocárdio e seus benefícios estão ligados a atenuação da sinalização pró-inflamatória (40).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida em vários tecidos, sua estimulação no fígado produz proteínas de fase aguda durante lesão ou infecção (44). Os níveis aumentados de IL-6 estão correlacionados com risco futuros de problemas vasculares e oclusão coronariana (43).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma glicoproteína imunoglobulina reguladora de diversas funções celulares (45). Descoberto em 1975, o TNF- α ficou conhecido como fator de circulação causador de necrose de tumores, posteriormente identificado como resposta do sistema inato a diferentes processos de estresse (46). O TNF- α é produzido por macrófagos, adipócitos e cardiomiócitos nos tecidos cardíacos em resposta a lesão causadas pela I/R através do sistema inato (11, 36, 47, 48). O TNF- α apresenta efeito protetor quando encontrado em doses baixas a curto prazo. Entretanto, em doses elevadas e a longo prazo, esse efeito passa ser deletério promovendo a diminuição da força contrátil e apoptose (11, 48, 49). Em relação ao coração, o TNF- α apresenta resultados divergentes na literatura, onde são observados estudos com melhora da função contrátil e da função ventricular e em contra ponto, outros estudos relatam perda da proteção relacionadas com o TNF- α e um aumento da mortalidade (23).

O mecanismo de ação do TNF- α consiste na liberação de células sintetizadoras (macrófagos, fibroblastos, células de músculo liso, etc.) na forma solúvel para sua conversão e ativação (50). O TNF- α induz efeitos pleiotrópicos através de dois receptores ativos, descritos como receptor tipo 1 de TNF (TNFR1) e receptor tipo 2 de TNF (TNFR2) (51). Estes dois receptores são constituídos por glicoproteínas e atuam em diferentes regiões intracelulares. Porém, cada receptor apresenta características funcionais e sinalizações celulares distintas (11, 50). O

TNFR1 é responsável pelo efeito deletério e citotóxico, como a necrose ou apoptose, é expresso em quase todos os tipos de células, inclusive do miocárdio (11, 46). O TNFR2 é responsável pelo efeito cardioprotetor, expresso nas células cardíacas e também apresenta importante papel no sistema linfóide (11, 46). Entretanto, na literatura o papel TNFR 1 e 2 permanece incerto (52).

O TNF é responsável também pela síntese do fator kappa B nuclear (NF- κ B) considerado fator de transcrição de genes inflamatórios que promovem apoptose (4, 50).

Neste trabalho, estudamos também o fator- κ B nuclear (NF- κ B) que é uma proteína de transcrição expressa no miocárdio que regula a expressão de mediadores no processo inflamatório (35, 47). O NF- κ B está envolvido na regulação do processo celular de maturação, sobrevivência e proliferação, além de processos inflamatórios (10). A família do NF- κ B é subdividida em: p50-P105 (NF- κ B1), p52-P100 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB e RelC, que formam diversos dímeros que vão determinar a sua ação (4, 10, 53). Essas subunidades p50 (essencial para a proteção cardíaca contra I/R) e p65 (responsável pela expressão cerca de 25% dos genes responsivos do NF- κ B) são as formas mais encontradas e responsáveis principalmente pela atividade de transcrição do NF- κ B (10).

A ativação do NF- κ B é descrita na literatura em macrófagos, células musculares lisas e em células endoteliais associadas com placas ateroscleróticas (54). Os dímeros de NF- κ B se associam com um grupo de proteínas inibitória conhecidas como I κ B, que tem a função de manter os dímeros de NF- κ B no citoplasma na forma inativa (10). Porém, na isquemia e depois da lesão de reperfusão, a via do NF- κ B é estimulada e o I κ B é fosforilado por diferentes quinases (IKK1 / IKK- α e IKK2 / IKK- β), degradando e liberando o NF- κ B para ser translocado para o núcleo, proporcionando a transcrição dos genes inflamatórios (Figura 1) (4, 35, 37, 55).

O NF- κ B também está envolvido na regulação dos processos celulares, maturação celular e processos inflamatórios (10). A transcrição NF- κ B é vista como um moderador celular da imunidade inata e adaptativa do processo apoptótico e anti-apoptótico, além dos processos fisiopatológicos cardíacos (41, 55). Podemos destacar, que a atividade do NF- κ B está associada com aterosclerose, ruptura da

placa aterosclerótica, rejeição de transplantes cardíacos, angina e entre muitos outros, a lesão por I/R (54). Por estar envolvidos em todos esses processos, o NF- κ B induz, regula e codifica as proteínas envolvidas nos eventos inflamatórios e também nos considerados cardioprotetores (37, 55).

Existe controvérsias na literatura em relação ao papel do NF- κ B. Estudos mostram efeitos prejudiciais no remodelamento pós-IAM quando o NF- κ B é translocado para o núcleo, iniciando as transcrições de citocinas, agentes pro-coagulantes e genes vasoativos. Porém, o NF- κ B promove a expressão de proteínas com efeitos cardioprotetores que bloqueiam a apoptose ou inibem a inflamação (53, 55).

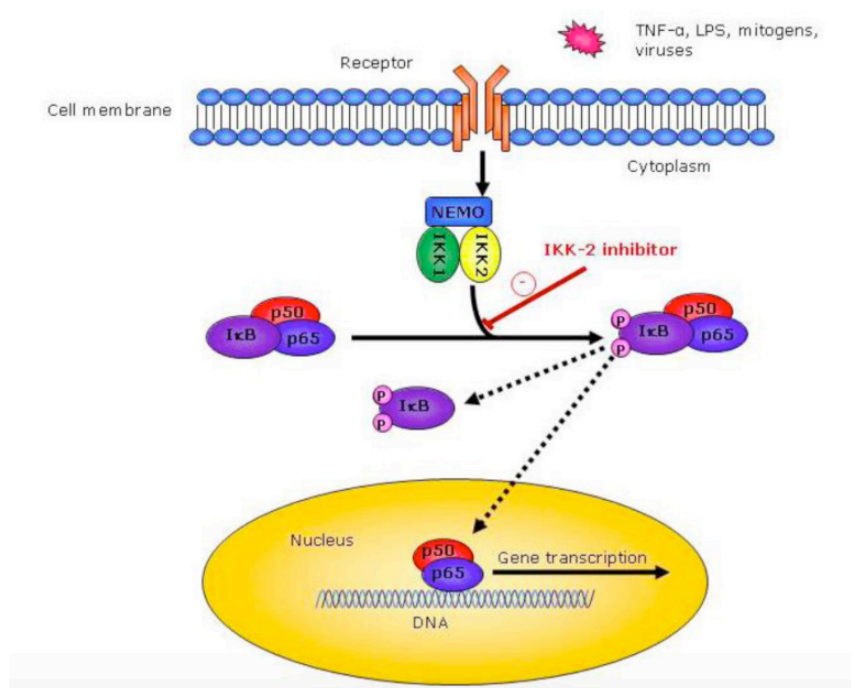


Figura 1: Diagrama da via de sinalização de NF- κ B que resulta na transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório. A ativação do complexo IKK leva à fosforilação de I κ B que permite a translocação do NF- κ B para o núcleo.

Referência: (<http://www1.imperial.ac.uk/resources/AA786A60-3352-41E7-BE2797D3F1315DB9/figure5nfkbpathway.jpg>).

Buscando minimizar os danos ao coração, estudamos neste trabalho a

ação da diacereína, cujos benefícios (bem definidos na literatura), estão associados primeiramente a doenças reumáticas (56).

A diacereína é uma antroquinona encontrada em plantas do gênero *Cássia* (Figura 2) e seu metabólito ativo é 1,8-Diacetoxi-3-carboxiantraquinona (Figura 3). Em humanos, a diacereína é totalmente metabolizado em um composto chamado Rhein (ácido 4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxílico) (Figura 4), o qual é distribuído para os demais tecidos (56, 57). O rhein é um composto bioativo encontrado em plantas fitoterápica chinesa chamada Ruibarbo ou Rhubarb (*Rheum palmatum L. ou R. tanguticum Maxim*), conhecida por ação anti-inflamatória, pro-inflamatória, antipirética e analgésica (56, 58). A diacereína devido a sua atividade biológica vem sendo discutida por décadas, no entanto, seu efeito benéfico primeiramente foi encontrado no tratamento de osteoartrites e osteoartroses associados principalmente com tecidos articulares como condrócitos, fibroblastos sinoviais e osteoblastos (58).

Estudos em animais e humanos têm mostrado que o metabólito ativo da diacereína inibe a síntese e atividade de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6 e IL-1) e pode ter um efeito benéfico no remodelamento ventricular após a lesão em I/R do miocárdio (57, 59). O autor Gao 2014, relata que a diacereína é um inibidor potente de óxido nítrico induzido por IL-1 β e que os inibidores de IKK β podem ser drogas anti-inflamatórias eficazes (56). Além disso, a diacereína tem a capacidade de inibir a produção de IL-1 e metaloproteínases (59).

A cascata inflamatória que envolve o processo de IAM é um alvo terapêutico atrativo devido o efeito multifuncional que as drogas tem nas células. O desafio é desenvolver novas drogas que ativam preferencialmente a via reparadora em relação a prejudicial (60).



Figura 2: Foto ilustrativa de uma das plantas do gênero *Cassia*

Referência:

(http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.essentialoilspedia.com/wpcontent/uploads/2013/05/cassia.jpg&imgrefurl=http://www.essentialoilspedia.com/cassia/&h=1200&w=1600&tbnid=Z36K0_Gc9ArpOM:&tbnh=160&tbnw=213&usg=__BqJHYqRt7B-1gfRIMnxaKnplB8=&docid=yI02yCLz6n43yM&itg=1)

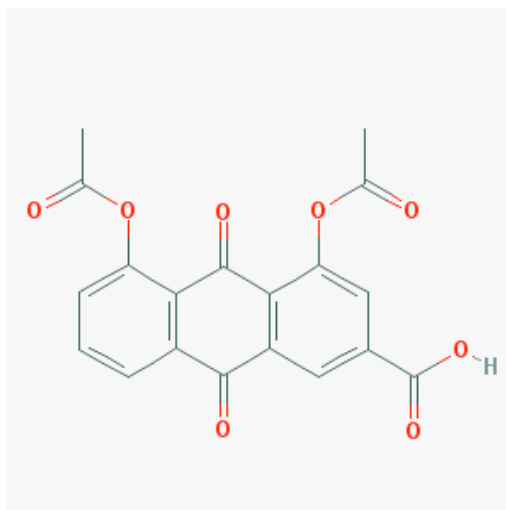


Figura 3: Estrutura química da diacereína, fórmula molecular C₁₉H₁₂O₈, peso molecular 368.293 g/mol.

Referência: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rhein#section=Top>

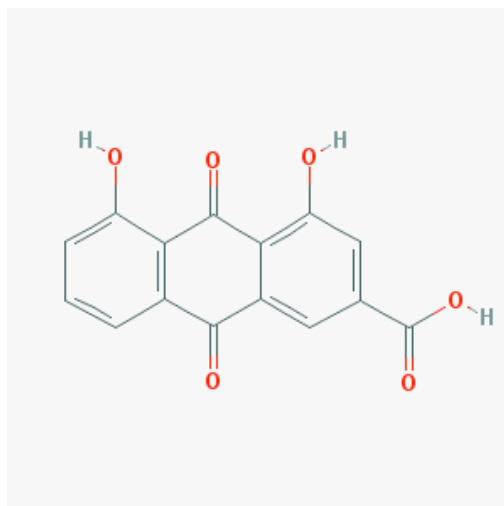


Figura 4 : Estrutura química do composto Rhein, fórmula molecular $C_{15}H_8O_6$, peso molecular 284.22042 g/mol.

Referência:

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rhein#section=Top>

2- OBJETIVO

Avaliar quais os efeitos da utilização da diacereína sobre o remodelamento ventricular na lesão de isquemia miocárdica em modelo experimental clinicamente relevante após IAM.

3- METODOLOGIA

Estudo realizado no período 2012 a 2015 no Laboratório de Isquemia e Reperusão do Miocárdio (LIRM), localizado Núcleo de Medicina Experimental na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas FCM-UNICAMP sob o número 2428-1. Todos os protocolos experimentais foram estabelecidos de acordo com as normas do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal, e do "Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório", publicado pelo US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revista em 1996). O trabalho recebeu suporte financeiro CAPES (número processo 11239-13-1) e FAPESP (número processo 2011/14550-7).

Ratos da linhagem Wistar, machos com peso médio de 180 gramas e com 4 semanas de vida foram estudados neste trabalho. Os animais tiveram livre acesso à água e uma dieta para ratos padrão oferecida pelo Centro de Criação Central da Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP. As salas onde os animais foram alojados mantinham a temperatura de 21 °C com um ciclo claro / escuro de 12 horas cada.

3.1- Indução do IAM

Animais com 4 semanas de vida foram submetidos a toracotomia sob anestesia inalatória com Isoflurano 2%, não sendo necessário intubação. Em seguida, foi realizado uma pequena incisão na pele do animal na região torácica à esquerda para disseção da musculatura. O tórax foi aberto e cuidadosamente o coração exposto através da incisão torácica. Um fio de polipropileno foi passado ao redor da artéria interventricular anterior e a mesma ocluída. O coração foi inserido no tórax e realizado sutura. O procedimento durou em média dois minutos. Esta técnica foi descrita por Gao e colaboradores sendo realizada em nosso laboratório, com 15% mortalidade operatória em virtude do infarto (61).

Os animais randomizados envolvidos no estudo foram divididos em quatro grupos, sendo:

- **Grupo Controle** (n=16) : submetidos a toracotomia com ligadura da artéria interventricular anterior. Tratados com placebo (solução fisiológica) iniciando o tratamento no dia do infarto e mantido por 4 semanas até o estudo hemodinâmico e eutanásia.
- **Grupo Diacereína** (n=10) : submetidos a toracotomia com a ligadura da artéria interventricular anterior. Tratados com diacereína 80mg/kg/dia, iniciando o tratamento no dia do infarto e mantido por 4 semanas até o estudo hemodinâmico e eutanásia.
- **Grupo SHAM** (n=8) : submetidos a toracotomia sem ligadura da artéria interventricular anterior e mantidos por 4 semanas até o estudo hemodinâmico e eutanásia, sendo tratados com placebo (solução fisiológica)
- **Grupo SHAM com Diacereína** (n=10) : submetidos a toracotomia sem ligadura da artéria interventricular anterior, sendo tratados com diacereína 80 mg/kg/dia, iniciando o tratamento no dia do infarto e mantido por 4 semanas até o estudo hemodinâmico e eutanásia.

A dose de diacereína é baseada em estudos que avaliaram a droga em ratos submetidos ao modelo de inflamação (62, 63). Os animais pertencentes ao grupo diacereína e Sham com diacereína, receberam a droga diluída em água através de gavagem uma vez ao dia. E os animais pertencentes ao grupo controle e ao Sham receberam solução salina através de gavagem uma vez ao dia.

3.2- Avaliação Hemodinâmica

Após 4 semanas de procedimento de IAM, os animais foram anestesiados com Xilazina (5 mg / kg) e Cetamina (75 mg / kg) por injeção intraperitoneal. Um cateter de medida de pressão e volume (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX, EUA) foi introduzido na artéria carótida direita até o ventrículo esquerdo. O cateter foi ligado a um PowerLab 8/30 conversor A / D (ADInstruments, Mountain View, CA, EUA) e um computador pessoal. O posicionamento deste cateter de pressão gerou curvas de volume e pressão com índices de contratilidade derivados destas

medidas. Solução salina a 30% foi injetada (20 microlitros) em bolus para verificação da condutância do eletrodo e calibração do mesmo. Com esta metodologia mensuramos índices de contratilidade, como: elastância máxima, trabalho sistólico pré recrutável, relação da pressão diastólica final e volume diastólico final do ventrículo esquerdo e tempo de relaxamento isovolumétrico (TAU).

Ao final das medidas os animais foram eutanasiados e realizado a remoção do coração para estudos laboratoriais. Primeiramente o coração e os pulmões foram removidos e pesados, assim como o animal. Em seguida, excluímos do estudo a porção correspondente ao ventrículo direito e o coração foi colocado em nitrogênio líquido, armazenado a temperatura de -80°C para posterior análises moleculares.

3.3- Extração de Proteínas para Western Blot

O material estudado foi removido do freezer -80°C e colocado imediatamente em banho de gelo para ser processado sem que ocorra o seu descongelamento. Em seguida, adicionamos o tampão de extração RIPA (1% de NP40, 1% de Deoxycholate de Sódio, 0.1% de SDS a 10%, 150mmol/L de NaCl, 50mmol/L de HEPES pH 7.0, 2mmol/L de EDTA pH 8.0, 100mmol/L de NaF, 10% de glicerol, 1.5mmol/L de MgCl_2 , 100mmol/L PMFS em ETOH, 200mmol/L Ortovanadato de Sódio, 1 $\mu\text{g/ml}$ de Aprotinina) em cada tubo de ensaio contendo o coração para ser homogeneizado com o politron promovendo a lise dos tecidos. Realizamos a centrifugação das amostras a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C , onde obtivemos a separação das frações solúveis das insolúveis. Alíquotas foram realizadas e em seguida a quantificação de proteína pelo método do Biureto (Laborlab, de Guarulhos, SP, Brasil) no leitor de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa).

3.4- Western Blot

Aplicamos 125 μg de proteína no gel de SDS-PAGE 1,0 mm (Sodium Dodecyl Sulfate-poly-acrylamide) de 8% ou 10% de acordo com o peso molecular da proteína

estudada. Após aplicação das amostras em gel SDS-PAGE a eletroforese foi realizada no aparelho Minigel Cuba ® Mini-PROTEAN II, BioRad, com solução tampão de eletroforese diluída previamente. Depois de executar a corrida em gel de SDS, imediatamente transferimos as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) utilizando o equipamento Trans-Blot® Turmo TM Transfer System (BioRad, USA). A coloração Ponceau S ou “house keeping genes” foi realizada após transferência para confirmação da eficiência da transferência e da sobretaxa de proteína equivalente contida na membrana.

Em seguida, a membrana foi incubada com solução de bloqueio durante duas horas e logo após, adicionada a solução de anticorpo primário por uma noite. Os anticorpos utilizados para a detecção das proteínas respectivas foram:

- I κ B- α (sc: 371, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)
- p-I κ B- α (sc: 8404, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)
- TNF-R1 (sc: 80376, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)
- TNF-R2 (sc: 1074, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)
- Pro-COL 1 A 2 (sc: 8787, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)

As membranas foram incubadas novamente com os anticorpos secundários, respeitando a origem animal (espécie) do anticorpo primário, sendo:

- Anti-mouse (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA)
- Anti-rabbit (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA)
- Anti- goat (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA)

Os complexos imunes formados foram visualizados com o sistema de detecção de quimiluminescência Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) Os segmentos foram quantificados por densitometria das imagens digitalizadas.

3.5- Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR- Real Time)

Amostras de tecidos da área de infarto e área remota do VE foram submetidos a extração de RNA usando reagente Trizol (Ambion, EUA). O RNA foi quantificado utilizando a relação de absorbância 260/280 nm. Utilizando um kit de cDNA de alta capacidade de Transcrição Reversa (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), o RNA total (1ug) foi utilizado para reações de transcrição reversa. Para detectar os níveis de expressão de genes, PCR em tempo real foi realizado utilizando os iniciadores Taqman™ disponíveis comercialmente para a IL-1, IL-6, TNF, NF-kB p50, NF-kB p65 e actina (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Utilizamos a actina como controle interno.

3.6- Análise Histopatológica

Após a avaliação hemodinâmica, o VE de cada animal foi dissecado, e uma fatia do ventrículo (~ 3 mm) foi preservado em paraformaldeído a 4% e embebidos em parafina. As secções de tecido (4 mm) foram corados com Tricrômico de Masson e Picrosirius Red para avaliar fibrose e deposição de colágeno. Imagens histológicas foram adquiridos usando um microscópio óptico com uma lente de 2,5 × (Imager A2 Axio Carl Zeiss, Alemanha). Cerca de 12 imagens foram necessários para cobrir a fatia a extensão do tecido. As imagens foram reconstruídas posteriormente em uma única fatia panorâmica usando software PTGui (versão 9.1.3, Rotterdam, Holanda).

Fibrose e deposição de colágeno foram quantificados utilizando software ProPlus Imagem (versão 6.0, Warrendale, PA, EUA). Os dados foram expressos como percentagem de tecido total por fatia do VE panorâmico. Analisamos também a fibrose e deposição de colágeno na área não infartada do VE (área remota).

3.7- Área de Secção Transversal da Cardiomiócitos

As áreas das seções transversas dos cardiomiócitos do VE (4 µm) foram utilizadas para avaliação de hipertrofia cardíaca. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. Aproximadamente de 10 a 15 campos da área remota foram analisados com a lente objetiva 40 X e a luz transmitida. Um total de 70 células foram medidas para cada animal utilizando o software Image ProPlus (versão 6.0, Warrendale, PA, EUA) para a avaliação das áreas das seções transversas dos cardiomiócitos.

3.8- Transcrição de NF-kB Subunidades p50 e p65

Estudamos a ativação do NF-kB subunidades p50 e p65 nos tecidos de VE a partir de extratos nucleares. Utilizamos um método de detecção quimioluminescente de acordo com as instruções do fabricante disponíveis no kit comercial (Transcription Factor Kits for NF-kB p50 e p65 number 89858 89859, Pierce Biotechnology, Rockford, IL- USA) .

3.9- Caspase 3/7 Atividade

A atividade da Caspase 3/7 foi analisada a partir de extrato de proteína do VE (200 mg) de acordo com as instruções do fabricante (Caspase 3/7 Glo, Promega, Fitchburg, WI, EUA). Os dados foram analisados utilizando um luminómetro Glomax 20/20 (Promega, Fitchburg, WI, EUA).

4- RESULTADOS

Os resultados da presente tese estão apresentados no artigo:

Torina AG, Reichert K, Lima F, de Souza Vilarinho KA, de Oliveira PP, do Carmo HR, de Carvalho DD, Saad MJ, Sposito AC, Petrucci O. *Diacerein Improves Left Ventricular Remodeling and Cardiac Function by Reducing the Inflammatory Response after Myocardial Infarction*. PLoS ONE. 2015; 10(3): e0121842. doi:10.1371/journal.pone.0121842

RESEARCH ARTICLE

Diacerein Improves Left Ventricular Remodeling and Cardiac Function by Reducing the Inflammatory Response after Myocardial Infarction

Anali Galluce Torina¹, Karla Reichert¹, Fany Lima¹, Karlos Alexandre de Souza Vilarinho¹, Pedro Paulo Martins de Oliveira², Helison Rafael Pereira do Carmo¹, Daniela Diógenes de Carvalho¹, Mário José Abdalla Saad³, Andrei Carvalho Sposito³, Orlando Petrucci^{1,2*}

1 Laboratory of Myocardial Ischemia/Reperfusion, Faculty of Medical Science, State University of Campinas—UNICAMP, Campinas, SP, Brazil, **2** Department of Surgery, Discipline of Cardiac Surgery, Faculty of Medical Science, State University of Campinas—UNICAMP, Campinas, SP, Brazil, **3** Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Science, State University of Campinas—UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

* orlando@fcm.unicamp.br



OPEN ACCESS

Citation: Torina AG, Reichert K, Lima F, de Souza Vilarinho KA, de Oliveira PPM, do Carmo HRP, et al. (2015) Diacerein Improves Left Ventricular Remodeling and Cardiac Function by Reducing the Inflammatory Response after Myocardial Infarction. PLoS ONE 10(3): e0121842. doi:10.1371/journal.pone.0121842

Academic Editor: Partha Mukhopadhyay, National Institutes of Health, UNITED STATES

Received: July 20, 2014

Accepted: February 19, 2015

Published: March 27, 2015

Copyright: © 2015 Torina et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant number 2011/14550-7.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

The inflammatory response has been implicated in the pathogenesis of left ventricular (LV) remodeling after myocardial infarction (MI). An anthraquinone compound with anti-inflammatory properties, diacerein inhibits the synthesis and activity of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor and interleukins 1 and 6. The purpose of this study was to investigate the effects of diacerein on ventricular remodeling *in vivo*.

Methods and Results

Ligation of the left anterior descending artery was used to induce MI in an experimental rat model. Rats were divided into two groups: a control group that received saline solution ($n = 16$) and a group that received diacerein (80 mg/kg) daily ($n = 10$). After 4 weeks, the LV volume, cellular signaling, caspase 3 activity, and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription were compared between the two groups. After 4 weeks, end-diastolic and end-systolic LV volumes were reduced in the treatment group compared to the control group ($p < .01$ and $p < .01$, respectively). Compared to control rats, diacerein-treated rats exhibited less fibrosis in the LV ($14.65\% \pm 7.27\%$ vs. $22.57\% \pm 8.94\%$; $p < .01$), lower levels of caspase-3 activity, and lower levels of NF- κ B p65 transcription.

Conclusions

Treatment with diacerein once a day for 4 weeks after MI improved ventricular remodeling by promoting lower end-systolic and end-diastolic LV volumes. Diacerein also reduced fibrosis in the LV. These effects might be associated with partial blockage of the NF- κ B pathway.

Introduction

Myocardial infarction (MI) is a devastating event, especially when reperfusion does not occur [1, 2]. Left ventricular (LV) remodeling after MI involves enlargement of the LV and thinning of the ventricular wall to maintain cardiac function [3]. The inflammatory response plays an important role in LV remodeling [4]. For example, reperfusion injury can trigger a cascade of signaling events that lead to inflammatory tissue damage. These signaling factors can include pro-inflammatory cytokines, such as tumor-necrosis factor α (TNF- α), anti-inflammatory molecules, adhesion molecules, and interleukins [5, 6].

TNF- α is a pro-inflammatory cytokine that participates in the innate immune system and is expressed by cardiac tissues. At low levels, TNF- α exhibits a cardioprotective effect, whereas at high levels, TNF- α has been shown to mediate detrimental effects [6, 7]. TNF- α has been implicated in the pathogenesis of ventricular remodeling after MI [5, 8]. In clinical trials, blocking or decreasing the bioavailability of TNF- α produced disappointing results in patients with congestive heart failure [8, 9]. However, these patients had already undergone remodeling and dilation of the LV, and the results may have been affected by the dichotomous effects of TNF- α .

To our knowledge, no clinical trial to date has evaluated the effects of anti-inflammatory intervention on LV remodeling immediately after MI. However, there is some evidence that inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B) improves LV remodeling and contributes to a decrease in cardiac dysfunction after MI. Moreover, NF- κ B is regulated, in part, by TNF- α [8, 10, 11].

Diacerein is an anthraquinone compound with anti-inflammatory properties that inhibit the synthesis and activity of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and interleukins 1 and 6 (IL-1 and IL-6, respectively) [12–14]. The active metabolite for diacerein is rhein (1,8-dihydroxy-3-carboxyanthraquinone), which is found in plants of the genus *Cassia* and has exhibited anti-inflammatory effects by inhibiting cytokine synthesis [14]. In the present study, LV remodeling was evaluated in the presence of diacerein 4 weeks after MI was induced in a rat model.

Methods

Animals and Ethics Statement

Wistar rats had free access to water and a standard rat diet (State University of Campinas Central Breeding Center, Campinas, Brazil), and were housed in a room maintained at 21°C with a 12-hour light/12-hour dark cycle. All experimental protocols were established in accordance with the standards of the Brazilian Council in Animal Experimentation, and the “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). The protocol was approved by the Institutional Committee on the Ethics of Animal Experiments of the State University of Campinas under the permit number 2428–1.

Induction of MI and Study Protocol

Male Wistar rats (120–150g) were subjected to an MI event according to the method of Gao et al. [15]. Briefly, rats were anesthetized with inhalation of 2% isoflurane with no endotracheal tube placement. A thoracic incision was made over the left region of the chest, and a purse string suture was made in the skin for incision closure at the end of the procedure. The thorax was accessed through the fourth intercostal space, and the heart was gently popped out through the incision.

MI was induced by performing a left coronary artery (LCA) ligation approximately 3 mm from its origin using a 6–0 polypropylene suture. After ligation, the heart was immediately

placed back into the chest, manual evacuation of air was performed, and the suture was closed by snaring the previously placed purse string suture in the skin. If necessary, a needle was inserted into the eighth intercostal space to remove any residual pneumothorax. Rats were subsequently provided 40% oxygen and were monitored during recovery. All animals received acetaminophen $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ per os for 3 days.

After induction of MI and total recovery from anesthesia, animals were treated daily for 4 weeks with either 80 mg/kg diacerein diluted with 2 ml of saline solution (Diacerein group; $n = 10$) or a gavage of 2 ml of saline solution every day (Control group; $n = 16$). The diacerein dose applied was selected based on previous studies [14, 16, 17] and unpublished data from our laboratory. Two Sham groups were performed in the same way as described above with exception of no MI was induced by LCA ligation. One group was treated daily for 4 weeks with a gavage of 2 ml of saline solution (Sham Group; $n = 8$) and the second group was treated daily for 4 weeks with 80 mg/kg diacerein diluted with 2 ml of saline solution (Sham group with Diacerein; $n = 10$). Body weights were recorded each week, and the diacerein dose administered was corrected for changes in weight. After 4 weeks, animals were submitted to a hemodynamic study and euthanasia for tissue harvesting. The euthanasia was induced with pentobarbital $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and confirmed by the LV catheter inserted during the hemodynamic assessment.

Hemodynamic Assessment

Four weeks after the MI procedure, rats were anesthetized with xylazine (5 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg) by intraperitoneal injection and were allowed to breathe spontaneously. A hemodynamic invasive assay was performed by using a pressure-volume catheter (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX, USA) that was inserted into the LV cavity through the right carotid artery. The pressure and volume of the LV were continuously monitored for correct positioning of the catheter. The catheter was coupled to a PowerLab 8/30 A/D converter (AD Instruments; Mountain View, CA, USA) and a personal computer. Parallel conductance correction volumes were determined after injection of 30% hypertonic saline solution ($20 \mu\text{L}$). Upon completing the hemodynamic measurements, LV volume correction was determined by using heparinized blood that was obtained from each animal. The blood was calibrated by cuvette, according to the method of Parcher and colleagues [18].

Histopathological Analysis

After the invasive hemodynamic assessment was completed, the rats were euthanized, and their heart and lung tissues were harvested and weighed. The LV from each rat was dissected, and a mid-ventricle slice ($\sim 3 \text{ mm}$) from each was preserved in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Tissue sections ($4 \mu\text{m}$) were stained with Masson's trichrome and Picrosirius Red to assess fibrosis and collagen deposition, respectively. Histological images were acquired using an optical light microscope with a $2.5\times$ lens (Imager A2 Axio Carl Zeiss, Germany). On average, 12 images were needed to cover the entire LV slice. Images were reconstructed to create a single panoramic slice using PTGui software (version 9.1.3, Rotterdam, The Netherlands).

Fibrosis and collagen deposition were quantified using Image Pro Plus software (version 6.0, Warrendale, PA, USA). Data were expressed as a percentage of total tissue per LV panoramic slice. Fibrosis and collagen deposition were also analyzed for the opposite LV wall (remote area).

Cross-sectional Area of Cardiomyocytes

To assess cardiac hypertrophy, the cross-sectional area (CSA) of the cardiomyocytes was calculated. Briefly, sections of the LV (4 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) according to Stefanon and collaborators [19]. Typically, 10 to 15 fields of the remote area were analyzed using a40 \times objective lens and transmitted light. A total of 70 cells were measured for each animal using Image Pro Plus software (version 6.0, Warrendale, PA, USA) for CSA assessment.

Protein Quantification by Western Blot

Samples of the LV tissue were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total protein extraction was performed using RIPA buffer (1% (w/w) Nonidet P40, 1% (w/w) sodiumdeoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 150mmol/L NaCl, 50mmol/L HEPES pH 7.0, 2mmol/L EDTA pH 8.0, 100mmol/L NaF, 10% glycerol, 1.5mmol/L MgCl₂, 100mmol/L PMSF in ETOH, 200mmol/L sodium orthovanadate, 1 μ g/ml aprotin), and samples were homogenized and centrifuged prior to the determination of protein concentration in supernatants as previously described [20]. Protein extracts (125 μ g) were separated using 8% or 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes. These membranes were incubated with primary antibodies for I κ B- α , pI κ B- α , TNFR1, TNFR2, and Pro-COL 1A2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies were used (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA). Bound antibodies were visualized using a biochemiluminescent detection system according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). All immunoblotting signals were normalized to densitometric data obtained for the corresponding membranes stained with Ponceau, as previously described [21, 22]. Blots were imaged using a charge-coupled device (CCD) camera (Gel Logic Imaging System, Rochester, NY, USA).

Transcription activity assay of NF- κ B-Subunits p50 and p65

Activation of NF- κ B p50 and p65 in nuclear extracts prepared from LV tissues was assayed using a commercially available kit and a chemiluminescent detection method according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific).

Caspase 3/7 Activity

Caspase 3/7 activity was assayed for each LV protein extract (200 mg) according to the manufacturer's instructions (Caspase/Glo 3/7, Promega, Fitchburg, WI, USA). Data were recorded using a Glomax 20/20 luminometer (Promega).

Gene Expression

Infarct samples and remote tissues from the LV were subjected to RNA extraction using Trizol reagent (Ambion, USA). RNA was quantified using 260/280 nm absorbance ratio data. Using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), total RNA (1 g) was used for reverse transcription reactions. To detect levels of gene expression, real-time PCR was performed using commercially available Taqman primers for IL-1, IL-6, TNF, NF- κ B p50, NF- κ B p65, and actin (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Detection of actin was used as an internal control.

Statistical Analysis

All data are reported as the mean \pm standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk test for normality was performed. Statistical significance was analyzed by using an unpaired *t*-test or Mann-

Whitney test when appropriate. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (for Mac, version 6, San Diego, CA, USA).

Results

Animal Weight, LV Weight, LV/Body Weight Index, and LV Fibrosis

Four weeks after MI, the mean body weight of the Control group was greater than that of the Diacerein group, although both groups exhibited a similar mean weight at the beginning of the study. The Sham group treated with diacerein also exhibited a lower mean body weight compared with the Sham only group. The LV/body weight index values were also higher for the Control and Diacerein groups compared with the Sham and Sham plus diacerein groups 4 weeks post-MI. Using Masson's trichrome staining, less fibrosis was detected for the Diacerein group compared to the Control group (Fig. 1A) and lower collagen content was observed with Picrosirius Red staining (Table 1). Morphometric analysis further revealed that the Diacerein group had a lower cardiomyocyte CSA compared to the Control group in the remote LV area (Fig. 1B).

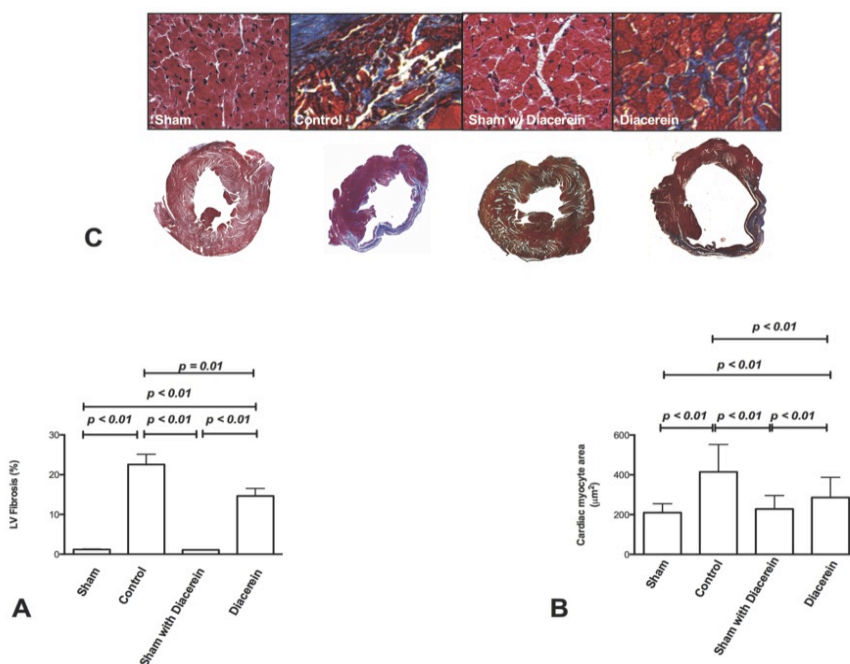


Fig 1. Cardiomyocyte CSA in the remote myocardial region indicated less hypertrophy in the Diacerein group compared to the Control group (A). Fibrosis of the LV was reduced for the Diacerein group (B). Differences between groups were tested by ANOVA test and multiple comparison between groups were tested using Tukey's test. All values represent the mean \pm SE of twelve experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0121842.g001

Table 1. Body weight, lung weight, LV weight, and fibrosis.

Parameter	Sham Group (n = 8)	Control group (n = 16)	Sham Group with Diacerein (n = 10)	Diacerein group (n = 10)	P-value
Initial BW (\pm g)	132.23 \pm 25.10	144.67 \pm 30.10	130.83 \pm 7.90	128.73 \pm 23.89	.11
BW after 4 wk (\pm g)	340.30 \pm 24.31	282.78 \pm 24.48*	272.59 \pm 15.25*	257.40 \pm 18.38*. [#]	<.01
LV (\pm g)	0.60 \pm 0.04	0.68 \pm 0.10	0.59 \pm 0.09	0.64 \pm 0.05	.05
LV/BW \times 1000	1.79 \pm 0.14	2.38 \pm 0.20*	1.88 \pm 0.15 [#]	2.51 \pm 0.24*. [§]	<.01
LW/BW \times 1000	3.93 \pm 0.84	6.91 \pm 2.28*	4.1 \pm 0.33 [#]	6.80 \pm 1.93*. [§]	<.01
LV fibrosis, %	1.79 \pm 0.36	22.57 \pm 8.94*. [§]	1.10 \pm 0.35 [#]	14.65 \pm 7.27*. ^{#, §}	<.01
LV collagen, %	0.81 \pm 0.32	12.35 \pm 6.38*	0.87 \pm 0.29 [#]	9.08 \pm 6.77*. [§]	<.01
Lateral wall fibrosis, %	0.68 \pm 0.48	3.99 \pm 2.88*	0.60 \pm 0.46 [#]	3.61 \pm 2.48*. [§]	<.01

BW indicates body weight; LW, lung weight. Data are expressed as mean \pm SD. Differences between groups were tested by ANOVA test.

* P < .05 vs. Sham group.

P < .05 vs. Control group.

§ P < .05 vs. Sham group with Diacerein using Tukey's test for multiple comparisons.

doi:10.1371/journal.pone.0121842.t001

Diacerein Promotes Better Hemodynamics 4 Weeks after MI

When lower end-diastolic and end-systolic volumes were monitored, improved LV remodeling was observed for the Diacerein group compared to the Control group. The ejection fraction was also higher for the Diacerein group compared to the Control group. The Control group showed higher dP/dt max and heart rate values compared to the Diacerein group. However, when dP/dt max was normalized to the end-diastolic volume (EDV), the latter of which is a more reliable contractility index [23, 24], higher contractility index values were observed compared to the Control group. In contrast, the Sham group treated with diacerein exhibited lower contractility index values compared with the Sham group, and higher values compared with the Control group. These data are summarized in Table 2.

Table 2. Hemodynamic data.

Parameter	Sham Group (n = 8)	Control group (n = 16)	Sham Group with Diacerein (n = 10)	Diacerein group (n = 10)	P-value
TAU, ms	10.56 \pm 1.73	16.60 \pm 6.36*	11.36 \pm 1.83 [#]	17.43 \pm 4.86*	<.01
dP/dt max, mmHg/s	7835 \pm 1172	6288 \pm 1678	4408 \pm 799*. [#]	4714 \pm 2072*. [#]	<.01
dP/dt min, mmHg/s	-8360 \pm 1606	-4550 \pm 1288*	-3450 \pm 635*	-3698 \pm 1653*	<.01
dP/dt max/EDV, mmHg/ μ L ⁻¹	170.20 \pm 25.47	50.17 \pm 13.39*	93.42 \pm 16.93*. [#]	75.08 \pm 33.00*. [#]	<.01
HR, bpm	277 \pm 53	311 \pm 86	244 \pm 37 [#]	247 \pm 20 [#]	.02
Stroke volume, μ L	16.03 \pm 4.28	41.51 \pm 26.61*	16.12 \pm 4.02 [#]	42.28 \pm 21.22*. [§]	<.01
EDV, μ L	46.02 \pm 26.69	125.3 \pm 69.83*	47.18 \pm 25.82 [#]	62.78 \pm 52.64 [#]	<.01
ESV, μ L	35.55 \pm 26.66	110.6 \pm 66.52*	40.22 \pm 25.50 [#]	46.83 \pm 66.03 [#]	<.01
EF, %	51.07 \pm 33.71	23.21 \pm 17.93*	46.85 \pm 28.69 [#]	50.86 \pm 20.39 [#]	.03

TAU indicates time constant of isovolumic relaxation; HR, heart rate; bpm, beats per minute; EDV: end-diastolic LV volume; ESV: end-systolic LV volume; EF: ejection fraction of LV. Data are expressed as mean \pm SD. Differences between groups were tested by ANOVA test.

* P < .05 vs. Sham group.

P < .05 vs. Control group.

§ P < .05 vs. Sham group with Diacerein using Tukey's test for multiple comparisons.

doi:10.1371/journal.pone.0121842.t002

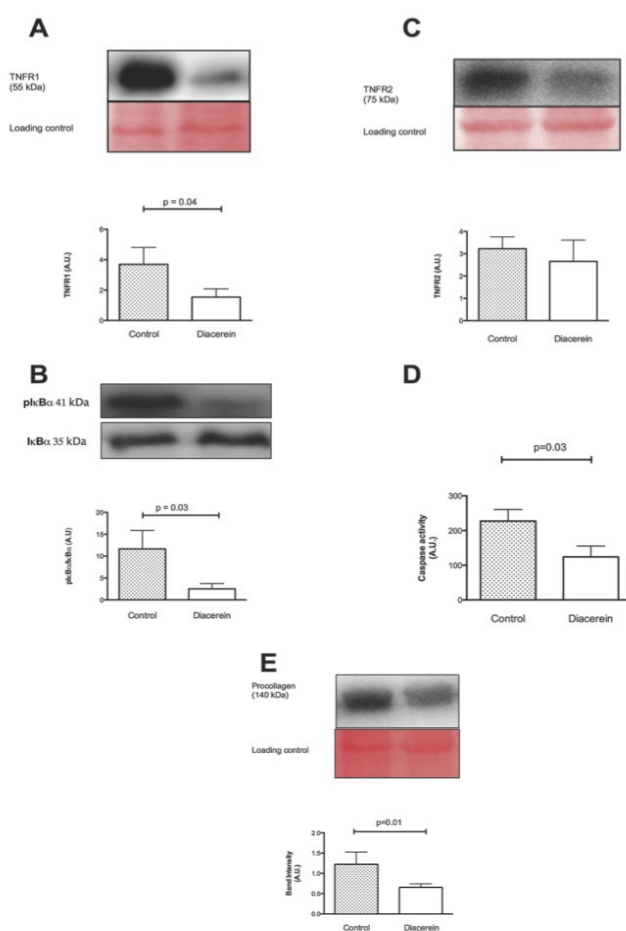


Fig 2. Representative Western blot results that show inhibition of TNFR1 (A) and IκBα (B), no effect on TNFR2 (C), lower caspase 3/7 activity (D), and lower procollagen deposition (E) in the Diacerein group. All values represent means \pm SE of five independent experiments. A.U.: arbitrary units.

doi:10.1371/journal.pone.0121842.g002

Diacerein Inhibits IκBα and TNF Receptor 1, Modulates NF-κB p65 Transcription, and Promotes Lower Levels of Caspase 3/7 Activity

Lower levels of TNF receptor 1 (TNFR1) expression (Fig. 2A) and IκBα activation (Fig. 2B) were detected for the Diacerein group compared to the Control group 4 weeks after MI. The latter result corresponded to lower levels of NF-κB p65 transcription for the Diacerein group (Fig. 3B). The levels of caspase 3/7 activity (Fig. 2D) and procollagen 1 and 2 deposition

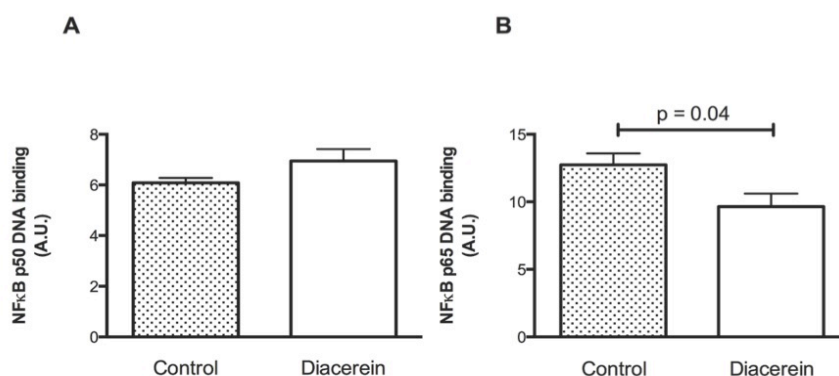


Fig 3. NF-κB transcriptional activity assay of p50 and p65 detected in nuclear extracts collected from tissues in the remote area. All values represent the mean \pm SE of five independent experiments. A.U.: arbitrary units.

doi:10.1371/journal.pone.0121842.g003

(Fig. 2E) were also lower for the Diacerein group compared to the Control group. In contrast, expression levels of NF-κBp50 were similar between the two groups (Fig. 3A).

Diacerein Promotes Lower *TNF* Gene Expression in Infarcted and Remote Areas of the LV

After administration of diacerein for 4 weeks, levels of *TNF* gene expression were lower in both remote and infarcted areas of the LV (Fig. 4A). In contrast, levels of *IL-1* gene expression did not significantly differ between the two groups, although lower levels of *IL-1* expression were detected for the Diacerein group (Fig. 4B). In the remote ventricle regions, lower levels of NF-κB p65 gene expression were detected in the Diacerein group compared to the Control group. The NF-κB p50 and *IL-6* gene expression were not significantly different in the Diacerein group compared to the Control group (Fig. 4C).

Discussion

This study demonstrates the beneficial effects of an anti-inflammatory drug, diacerein, on LV remodeling in a rat experimental model of MI. Lower end-systolic and end-diastolic LV volumes, higher LV ejection fractions, less hypertrophy of cardiomyocytes in remote areas, and lower heart rates were detected in rats 4 weeks after an MI event and treatment with diacerein.

Lower dP/dt max values were observed in the treatment group compared to the control and sham groups, and these data suggest that diacerein mediates a detrimental effect on myocardial contractility. However, there were no differences observed after the dP/dt max values were normalized to the EDVs. Lower dP/dt max values were also observed following normalization to EDV values for the Sham group treated with diacerein compared with the Sham group. The latter data may indicate that greater modulation of the parasympathetic system occurred [25]. However, further studies are needed to examine this possibility.

The linearity between dP/dtmax and EDV reported in the literature suggest this index might be a more reliable to assess the contractility state in vivo [23, 26]. Of note, most of the studies that have used dP/dt max as a contractility index had similar heart rate between the groups, which makes the Treppe effect less likely to occur [27, 28]. Ishikawa and colleagues have demonstrated that the ejection fraction is more sensitive at detecting systolic dysfunction

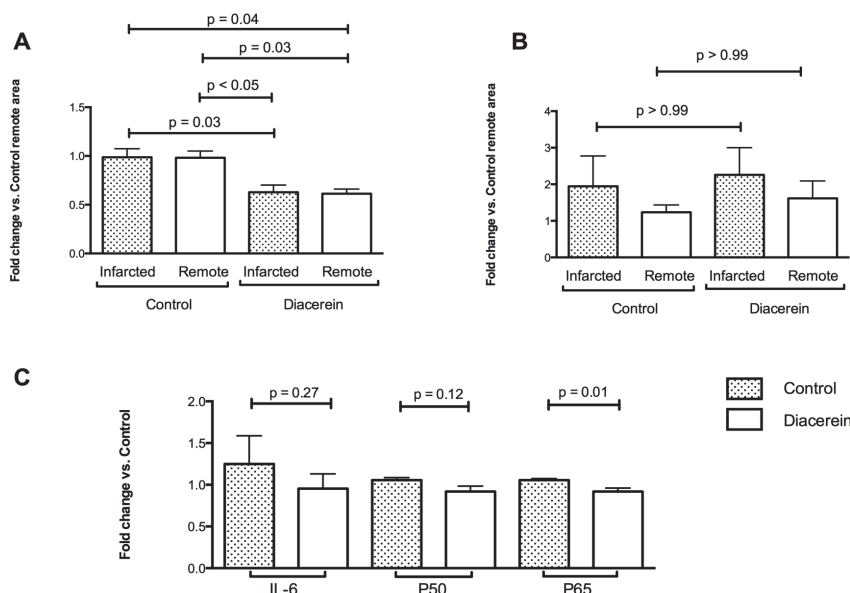


Fig 4. Gene expression detected for TNF (A) and IL-1 (B) in remote and infarcted areas. Gene expression detected for IL-6, NF- κ B p50, and NF- κ B p65 (C) in the remote areas of both groups. All values represent the mean \pm SE of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0121842.g004

over the dp/dt max in an elegant model of myocardial infarction in swine. They suggest the ejection fraction is more suited for inter animal comparisons and dp/dt max is more useful tool to assess contractility within the same animal [24]. Therefore, the present findings demonstrate the diacerein interfere positively on the LV remodeling after MI, but it was unable to provide any beneficial effect on myocardial contractility state compared to the control group.

These beneficial effects of LV remodeling after MI may have been due to inhibition of TNFR1, which can lead to lower levels of $I\kappa B\alpha$ activation and reduced transcription of NF- κ B p65. No significant changes in TNF receptor 2 (TNFR2) were observed during the same experimental period. LV remodeling was also associated with lower levels of caspase 3/7 activity, less fibrosis, less collagen, and reduced procollagen deposition. To our knowledge, the effects of diacerein on LV remodeling after MI have not previously been investigated. The present findings suggest that modulation of the inflammatory response is a key factor in the healing process, in accordance with several reports in the literature [3, 4, 11, 29], supporting the potential clinical utility of a drug with anti-inflammatory effects after MI.

Remodeling of the LV after MI is a complex process that includes several pathways that mediate biochemical, molecular, and morphological alterations in remote and infarcted myocardial regions [19]. The role of innate immunity in this process is not completely understood. However, it appears that TNF mediates bimodal effects, ranging from tissue injury to tissue repair, during the acute and chronic stages after MI [3, 30]. In the present study, selective inhibition of TNFR1 was identified as a potential mechanism by which inhibition of $I\kappa B\alpha$ could regulate the NF- κ B p65/p50 heterodimer [31]. This hypothesis is supported by the results of other studies involving TNFR1 [30, 32, 33]. For example, Hamid and colleagues subjected

TNFR1^{-/-} and TNFR2^{-/-} mice to MI. They observed disparate and opposing effects on LV remodeling, hypertrophy, and NF- κ B activation, with TNFR1 exacerbating the effects of MI and TNFR2 improving the response to MI. In the present study, lower levels of TNFR1 expression were observed with diacerein administration, accompanied by lower levels of fibrosis, caspase 3/7 activity, and NF- κ Bp65. These results are consistent with those of the TNFR1^{-/-} model [30].

Onai and colleagues previously demonstrated that non-selective blockage of NF- κ B improves LV remodeling after MI in their studies of IMD-0354 and IKK- β phosphorylation [8]. In the present study, selective blockage of TNFR1 resulted in an attenuation of NF- κ B p65 transcription, lower levels of caspase 3/7 activity, and improved remodeling of the LV 4 weeks after treatment with diacerein. TNFR1 has previously been shown to activate TNFR1-associated death domain (TRADD), which is involved in mediating apoptosis via recruitment of caspase 8 and cleavage and activation of caspase 3, and also contributes to the activation of NF- κ B [34]. Onai et al. did not evaluate the effects of IMD-0354 on the NF- κ B subunits. However, Hamid and colleagues reported that persistent inhibition of NF- κ B p65, coupled with negligible NF- κ B p50 activation/inhibition, resulted in improved survival and cardiac remodeling. Decreased pro-inflammatory, pro-fibrotic, and anti-apoptotic effects were observed in transgenic mice that over expressed a mutation for phosphorylation-resistant I κ B- α and were subjected to coronary ligation [31]. The latter results are consistent with those of the present study, although lower levels of TNF expression were also accompanied by an absence of changes in *IL-1* and *IL-6* gene expression in the present study.

Several reports have shown that NF- κ B plays an important role in cardiac remodeling after MI in animal models and humans [19, 35, 36]. Furthermore, it has been demonstrated that the NF- κ B subunits p50 and p65 translocate to the nucleus up to 24 hours after infarction, yet only the p65 subunit is consistently stimulated in animals that experience poor LV remodeling and heart failure [35]. The relationship between innate immunity and LV remodeling after MI remains unclear, although it appears that chronic activation of NF- κ B is detrimental to remodeling of the LV [3]. Three genetic programs have been identified as being controlled by the NF- κ B pathway, with the timing and type of NF- κ B activation being key events [37]. These programs include hypertrophy, acute cardiomyocyte protection from ischemia/reperfusion, and chronic cardiomyocyte injury due to a prolonged inflammatory response [30, 31, 37]. In all three programs, chronic activation of NF- κ B appears to represent a maladaptive process that perpetuates the inflammatory process and compromises repair of LV function due to the presence of increased fibrosis, reduced myocardial contractility, increased hypertrophy in remote areas, and deterioration of diastolic function [37].

Recently, Gao and colleagues showed a decrease in I κ B α phosphorylation in RAW 264.7 cells pretreated with diacerein and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) [38]. The decrease in I κ B α phosphorylation was also accompanied by a marked decrease in nuclear levels of NF- κ B p65 compared to the cells that were not pretreated with diacerein [38]. These observations in an *in vitro* model are very similar to those described here in an animal model.

In the present study, diacerein partially blocked the inflammatory process after MI by inhibiting the NF- κ B p65 subunit. This effect was associated with improved remodeling of the LV over a period of 4 weeks post-MI. However, different doses of diacerein were not evaluated to investigate a potential dose-dependent effect. The dose administered was used in a previous study [17].

There were limitations associated with the present study. First, it is possible that the observed decrease in contractility in the diacerein group was due to greater modulation of the parasympathetic system. The current data do not address this and further studies are needed. Second, a clear beneficial effect of diacerein on left ventricle remodeling was observed in the

present study in the Western blot assays performed. Lower levels of p-I κ B α and nuclear NF- κ B p65 were detected in the diacerein group, and similar findings have been reported by Gao and colleagues [38]. Third, all of the Western blots were performed using total tissue extracts instead of cytosolic fraction extracts, and this may explain the similar observations made regarding I κ B α expression levels.

Conclusions and Clinical Implications

In the presence of diacerein, a certain degree of inflammatory blockage, although not complete, was observed in the rat MI model investigated. This blockade may have contributed to the beneficial effects that were associated with LV remodeling. Given that there are several factors involved in cardiac remodeling, it is encouraging to find that inhibition of NF- κ B is capable of influencing many aspects of this process. Thus, administration of an NF- κ B inhibitor may represent a reasonable therapeutic approach for the treatment of MI.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AGT MJAS OP. Performed the experiments: AGT KR FL KASV HRPC DDC OP. Analyzed the data: ACS MJAS PPMO KASV OP. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJAS OP. Wrote the paper: AGT KASV MJAS ACS OP.

References

1. Tang XL, Sanganalmath SK, Sato H, Bi Q, Hunt G, Vincent RJ, et al. Atorvastatin therapy during the peri-infarct period attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *PloS one*. 2011; 6(9):e25320. doi: 10.1371/journal.pone.0025320 PMID: 21980426
2. Sogaard P, Gotsche CO, Ravkilde J, Thygesen K. Effects of captopril on ischemia and dysfunction of the left ventricle after myocardial infarction. *Circulation*. 1993; 87(4):1093–9. PMID: 8462137
3. Valen G. Innate immunity and remodelling. *Heart Fail Rev*. 2011; 16(1):71–8. doi: 10.1007/s10741-010-9187-1 PMID: 20694832
4. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2013.
5. Moss NC, Stansfield WE, Willis MS, Tang RH, Selzman CH. IKKbeta inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007; 293(4):H2248–53. PMID: 17675566
6. Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *European heart journal*. 2011; 32(6):680–5. doi: 10.1093/eurheartj/ehq484 PMID: 21303780
7. Hall G, Hasday JD, Rogers TB. Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41(4):580–91. PMID: 16949095
8. Onai Y, Suzuki J, Maejima Y, Haraguchi G, Muto S, Itai A, et al. Inhibition of NF-(kappa)B improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007; 292(1):H530–8. PMID: 16920808
9. Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *European heart journal*. 2011.
10. Berthonneche C, Sulpice T, Boucher F, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor SE, et al. New insights into the pathological role of TNF-alpha in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004; 287(1):H340–50. PMID: 15210453
11. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012; 110(1):159–73. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243162 PMID: 22223212
12. Gigant-Huselstein C, Dumas D, Payan E, Muller S, Bensoussan D, Netter P, et al. In vitro study of intracellular IL-1beta production and beta1 integrins expression in stimulated chondrocytes—effect of rhein. *Biorheology*. 2002; 39(1–2):277–85. PMID: 12454437
13. de Isla NG, Mainard D, Muller S, Stoltz JF. In vitro effects of diacerein on NO production by chondrocytes in response to proinflammatory mediators. *Biomed Mater Eng*. 2008; 18(1 Suppl):S99–104. PMID: 18334727

14. Pasin JS, Ferreira AP, Saraiva AL, Ratzlaff V, Andrighetto R, Tomazetti J, et al. Diacerein decreases TNF-alpha and IL-1beta levels in peritoneal fluid and prevents Baker's yeast-induced fever in young rats. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2010; 59(3):189–96. doi: 10.1007/s00011-009-0085-8 PMID: 19730987
15. Gao E, Lei YH, Shang X, Huang ZM, Zuo L, Boucher M, et al. A Novel and Efficient Model of Coronary Artery Ligation and Myocardial Infarction in the Mouse. *Circulation Research*. 2010; 107(12):1445–53. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223925 PMID: 20966393
16. Jatwa R, Kar A. Anti-inflammatory and anti-peroxidative roles of diacerein are possibly mediated through an alteration in thyroid functions in animal model of inflammation. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009; 23(4):465–71. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00685.x PMID: 19500155
17. Tobar N, Oliveira AG, Guadagnini D, Bagarolli RA, Rocha GZ, Araujo TG, et al. Diacerein improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice on a high-fat diet. *Endocrinology*. 2011; 152(11):4080–93. doi: 10.1210/en.2011-0249 PMID: 21896669
18. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc*. 2008; 3(9):1422–34. doi: 10.1038/nprot.2008.138 PMID: 18772869
19. Stefanon I, Valero-Munoz M, Fernandes AA, Ribeiro RF Jr., Rodriguez C, Miana M, et al. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. *PLoS one*. 2013; 8(5):e64986. doi: 10.1371/journal.pone.0064986 PMID: 23741440
20. Vilarinho KA, de Oliveira PP, Saad MJ, Eghtesady P, Filho LM, Vieira RW, et al. Erythropoietin protects the systolic function of neonatal hearts against ischaemia/reperfusion injury. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2013; 43(1):156–62.
21. Stein AB, Bolli R, Dawn B, Sanganalath SK, Zhu Y, Wang OL, et al. Carbon monoxide induces a late preconditioning-mimetic cardioprotective and antiapoptotic milieu in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 52(1):228–36. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.11.005 PMID: 22119801
22. Kandam V, Basu R, Moore L, Fan D, Wang X, Jaworski DM, et al. Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 leads to exacerbated left ventricular dysfunction and adverse extracellular matrix remodeling in response to biomechanical stress. *Circulation*. 2011; 124(19):2094–105. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030338 PMID: 21986284
23. Kass DA, Beyar R, Lankford E, Heard M, Maughan WL, Sagawa K. Influence of contractile state on curvilinearity of in situ end-systolic pressure-volume relations. *Circulation*. 1989; 79(1):167–78. PMID: 2910541
24. Ishikawa K, Chemaly ER, Tilemann L, Fish K, Ladage D, Agüero J, et al. Assessing left ventricular systolic dysfunction after myocardial infarction: are ejection fraction and dP/dt(max) complementary or redundant? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302(7):H1423–8. doi: 10.1152/ajpheart.01211.2011 PMID: 22307667
25. Routledge FS, Campbell TS, McFetridge-Durdle JA, Bacon SL. Improvements in heart rate variability with exercise therapy. *Canadian Journal of Cardiology*. 2010; 26(6):303–12. PMID: 20548976
26. Zhou W, Benharash P, Ho J, Ko Y, Patel NA, Mahajan A. Left ventricular twist and untwist rate provide reliable measures of ventricular function in myocardial ischemia and a wide range of hemodynamic states. *Physiological reports*. 2013; 1(5):e00110. doi: 10.1002/phy2.110 PMID: 24303181
27. Wallace AG, Skinner NS Jr., Mitchell JH. Hemodynamic determinants of the maximal rate of rise of left ventricular pressure. *Am J Physiol*. 1963; 205:30–6. PMID: 13998539
28. Bolognesi R, Tsialtas D, Zeppellini R, Barilli AL, Cucchini F, Manca C. Early and subtle abnormalities of left ventricular function in clinically stable coronary artery disease patients with normal ejection fraction. *Journal of Cardiac Failure*. 2004; 10(4):304–9. PMID: 15309696
29. Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, et al. Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfusion myocardial infarction. *J Histochem Cytochem*. 2013; 61(8):555–70. doi: 10.1369/0022155413493912 PMID: 23714783
30. Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan YT, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation. *Circulation*. 2009; 119(10):1386–97. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.802918 PMID: 19255345
31. Hamid T, Guo SZ, Kingery JR, Xiang X, Dawn B, Prabhu SD. Cardiomyocyte NF-kappaB p65 promotes adverse remodeling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2011; 89(1):129–38. doi: 10.1093/cvr/cvq274 PMID: 20797985
32. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008; 132(3):344–62. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020 PMID: 18267068

33. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009; 47(1):32–40. doi: [10.1016/j.yjmcc.2009.03.019](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.019) PMID: [19344728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19344728/)
34. Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Failure Reviews*. 2011; 16(1):49–69. doi: [10.1007/s10741-010-9180-8](https://doi.org/10.1007/s10741-010-9180-8) PMID: [20571888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20571888/)
35. Kumar R, Yong QC, Thomas CM. Do multiple nuclear factor kappa B activation mechanisms explain its varied effects in the heart? *Ochsner J*. 2013; 13(1):157–65. PMID: [23532211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23532211/)
36. Yoshiyama M, Omura T, Takeuchi K, Kim S, Shimada K, Yamagishi H, et al. Angiotensin blockade inhibits increased JNKs, AP-1 and NF- κ B DNA-binding activities in myocardial infarcted rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33(4):799–810. PMID: [11273732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11273732/)
37. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B. *Circ Res*. 2011; 108(9):1122–32. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.110.226928](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226928) PMID: [21527742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21527742/)
38. Gao Y, Chen X, Fang L, Liu F, Cai R, Peng C, et al. Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting IKK β inhibition in LPS-activated macrophages. *Free radical biology & medicine*. 2014; 72:104–12.

5- DISCUSSÃO GERAL

A doença cardiovascular no geral, inclui uma variedade de doenças com múltiplas causas, sendo o RC o resultado comum entre elas (10). O RC está associado com estresse oxidativo, citocinas, produção de óxido nítrico e ativação de sistemas hormonais, que contribuem com o RC inicialmente de forma positiva, porém a progressão da doença é prejudicial ao coração (10, 64). Especificamente, dentre as doenças cardiovasculares, o IAM é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (8, 14). Após o IAM, ocorre mudanças fisiopatológicas com aumento da sobrecarga de volume que induz ao RC e sua progressão promove a disfunção ventricular (1, 8).

Este trabalho avaliou os efeitos benéficos da droga diacereína em modelo experimental em ratos após evento de IAM. A diacereína é uma droga importante e cujo os benefícios estão primeiramente associados a doenças reumáticas devido a sua ação anti-inflamatória que inibe a síntese e atividade de citocinas pró-inflamatórias (56).

Nossos resultados demonstram que os animais submetidos ao IAM e tratados com diacereína durante 4 semanas obtiveram uma diminuição dos volumes sistólicos e diastólicos finais do VE e menos hipertrofia dos cardiomiócitos em áreas remotas (não infartadas).

Normalizamos os valores dP/dt max para o volume diastólico final, por ser um índice de contratilidade confiável segundo a literatura (65). Os resultados observados foram que o grupo controle apresentou diminuição dos valores dP/dt max normalizados quando comparados ao grupo diacereína. Estes dados podem indicar que houve uma modulação do sistema parassimpático (66). No entanto, mais estudos são necessários para analisar esta possibilidade.

Os resultados demonstram que a frequência cardíaca dos animais do grupo controle foi maior em comparação ao grupo diacereína.

A fração de ejeção neste trabalho foi maior para o grupo diacereína quando comparado ao grupo controle. Ishikawa e colegas demonstraram no modelo de IAM em suínos, que a fração de ejeção é mais sensível na detecção da dP/dt

max sendo a ferramenta mais útil para avaliar a contratilidade dentro do mesmo animal (53, 65). Estudo recente revelou que diminuição da força contrátil se dá porque o TNF desempenha importante função na patogênese e na progressão de aterosclerose, na lesão de I/R do miocárdio e na IC (49).

Demonstramos que a diacereína atua benéficamente no remodelamento do VE após IAM, mas, não encontramos qualquer efeito benéfico sobre o estado de contratilidade miocárdica no grupo diacereína em comparação com o grupo controle.

Estes efeitos benéficos do remodelamento do VE após IAM pode ter sido devido à inibição do TNFR1, que levam a diminuição dos níveis de ativação I κ B α e com isso uma diminuição da transcrição do NF-kB p65. Importante lembrar que o TNF tem como receptor o TNFR1 que é uma citocina pró-inflamatória ativada e regulada pelo NF-kB (10). Não foram observadas mudanças significativas no TNFR2 durante o mesmo período experimental.

Os níveis de expressão do gene de TNF diminuíram em ambas as áreas remotas e infartadas do VE. Apesar de terem sido detectados diminuição na expressão do gene IL-1 no grupo diacereína, os resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos controle e diacereína. Nas regiões remotas do VE, foram detectados no grupo de diacereína em comparação com o grupo controle diminuição dos níveis de expressão do gene NF-kB p65. A expressão dos genes NF-kB p50 e IL-6, não foram significativamente diferentes no grupo de diacereína em comparação com o grupo controle.

Estudo recente mostrou que a diacereína diminui a ativação de caspase-3 levando a inibição da apoptose de cartilagem, mediadores inflamatórios, óxido nítrico e IL-1 β (67). Semelhantes a estes resultados, demonstramos que remodelamento do VE também foi associado com baixos níveis de caspase 3/7 atividade, menos fibrose, menos colágeno e redução da deposição de pró-colágeno. Huang e colaboradores em um de seus estudos relata que a diacereína reduz a associação de receptores IL-1, diminuindo a expressão de eventos relacionados a síntese de óxido nítrico, atividades de colagenase e metaloproteinases através da inibição de NF-kB (27). Para o nosso conhecimento, os efeitos da diacereína no remodelamento do VE após IAM não foram previamente investigados.

Remodelamento do VE após IAM é um processo complexo que inclui

alterações bioquímicas, moleculares e morfológicas. Apesar do TNF- α contribuir em diversas situações onde ocorre a lesão de I/R (38), alguns estudos demonstram efeito paradoxal do TNF- α sugerindo que a ativação desta citocina contribui para a adaptação do miocárdio após insulto de I/R (23, 68). O papel da imunidade inata, neste processo não é completamente compreendido. No entanto, verifica-se que o TNF- α promove efeitos variando de lesão de tecido para tecido, durante as fases aguda e crônica após infarto do miocárdio (69). O fato é que a liberação de TNF- α após lesão miocárdica ativa vias de sinalização, sendo benéfica ao coração devido a possível indução de genes cardioprotetores e também a redução do tamanho do infarto (23, 51). Contudo, O TNF- α pode ser prejudicial promovendo aumento da síntese de óxido nítrico, piora da função endotelial, aumento de apoptose em miócitos, indução de remodelamento e disfunção miocárdica (52).

No presente estudo, a inibição seletiva de TNFR1 foi identificada como um potencial mecanismo pelo qual a inibição de I κ B α poderia regular o NF- κ B p65 / p50. Estudos indicam que I κ B α inibi a ativação NF- κ B e os seus genes alvo, reduzindo a hipertrofia e melhorando a função sistólica do VE (4). Recentemente, Gao e colaboradores mostraram uma diminuição na I κ B α fosforilação em células RAW 264.7 de pré-tratados com diacereína e estimuladas com lipopolissacárideos (LPS) (56). A diminuição da fosforilação I κ B α foi também acompanhado por uma redução acentuada nos níveis nuclear de NF- κ B p65 em comparação com as células que não foram pré-tratados com diacereína (56). Estas observações em um modelo in vitro são muito semelhantes aos descritos aqui em modelo animal.

O NF- κ B é uma proteína de transcrição, considerada o mediador principal da inflamação. Embora na literatura os resultados não são claros, a ativação de NF- κ B a curto prazo demonstram efeitos benéficos, mas uma ativação prolongada promove a inflamação crônica e pode ser prejudicial (10, 53). Sabe-se também, que o acúmulo de várias proteínas cardioprotetoras resulta na ativação do NF- κ B que protege as células cardíacas dos danos causados pelo processo de I/R (55). Estudo com ratos knockout TLR4 são protegidos da lesão por I/R durante o tempo de 2h a 24h após a reperfusão pela inibição do NF- κ B. Após a reperfusão, neste estudo os níveis de citocinas pró-inflamatórias e células inflamatórias foram reduzidos (22). Onai e colaboradores, anteriormente demonstraram que o bloqueio não-seletivo de

NF- κ B melhora o remodelamento do VE após o IAM em seus estudos de IMD-0354 e fosforilação IKK- β . No presente estudo, o bloqueio seletivo de TNFR1 resultou numa atenuação de transcrição NF- κ B p65, níveis mais baixos de atividade da caspase 3/7 e melhora do remodelamento do VE 4 semanas após o tratamento com diacereína. A diminuição de efeitos pró-inflamatórios, pró-fibrótica e anti-apoptótica foram observadas em ratos transgênicos com mais de uma mutação expressas para a fosforilação de I κ B- α (70). Os últimos resultados são consistentes com os do presente estudo, apesar de níveis mais baixos de expressão de TNF também foram acompanhados por uma ausência de alterações nos níveis expressão do gene no presente estudo de IL-1 e IL-6.

Vários estudos têm mostrado que o NF- κ B desempenha um papel importante no RC após IAM em modelos animais e seres humanos (10, 71, 72). Os resultados evidenciam os efeitos cardioprotetores do NF- κ B e a cardioproteção através do bloqueio da atividade do NF- κ B (10). O acúmulo de várias proteínas cardioprotetoras resulta na ativação do NF- κ B que protegem as células cardíacas dos danos causados pelo processo de I/R (55). Estudos experimentais em modelos de ratos com insuficiência cardíaca (IC) revelam que o bloqueio do NF- κ B age reduzindo a lesão de isquemia e reperfusão, o tamanho do infarto e preservando a função cardíaca (19, 35, 55). Além disso, o NF- κ B subunidades p50 e p65 demonstraram sua translocação para o núcleo até 24 horas após o IAM, mas apenas a subunidade p65 é estimulado de forma consistente em animais que sofrem remodelamento do VE e IC (10).

A relação entre a imunidade inata e remodelamento do VE após IAM permanece pouco clara, embora pareça que a ativação crônica de NF- κ B é prejudicial para a remodelamento dos programas genéticos VE (69). Valen G. e colaboradores destacam que o NF- κ B é ativado por diversas condições, porém, os resultados dos estudos para a função cardíaca e viabilidade celular não estão totalmente esclarecidos (4).

No presente estudo, a diacereína parcialmente bloqueou o processo inflamatório após IAM inibindo a subunidade NF- κ B p65. Este efeito foi associado com melhora do remodelamento do VE ao longo de um período de 4 semanas pós IAM. De início, sabemos que o RC é necessário para adaptação cardíaca após IAM

e que devido aos seus complexos mecanismos e alterações, levam a progressão da doença e piora do prognóstico. Acreditamos que intervenção terapêutica com a diacereína pode minimizar os danos e proporcionar um melhor prognóstico devido a sua ação anti-inflamatória e melhora no remodelamento do VE observados neste estudo.

Limitações do Estudo

Encontramos algumas limitações associadas com o presente estudo, sendo:

1- Todos os ensaios de Western Blot foram realizados utilizando extrato de tecido total ao invés de extrato de fração citosólica, e isso pode explicar as observações similares entre os níveis de expressão I κ B α no estudo de Gao e colaboradores (56).

2- Não foram realizadas análises moleculares para as vias de sinalização da apoptose e fibrose, apenas análises histológicas, sendo necessário futura complementação com esses dados.

3- Doses de diacereína não foram avaliadas para investigar um efeito potencial dependente da dose.

6- CONCLUSÃO

Concluimos que a utilização da diacereína na fase aguda da indução da isquemia miocárdica e administrada de forma contínua pelo período de 4 semanas após infarto agudo do miocárdio proporcionou um bloqueio inflamatório associado com uma diminuição do remodelamento ventricular.

Acreditamos que a diacereína pode ter ação inibitória na via parcial do NF-kB capaz de influenciar vários fatores envolvidos no RC.

Desta forma, a inibição do NF-kB pode representar uma abordagem terapêutica favorável ao IAM, porém há a necessidade de estudos complementares.

7- REFERÊNCIAS

1. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92(2):150-64.
2. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation.* 1982;65(7):1446-50.
3. Mendes Ode C, Campos DH, Damatto RL, Sugizaki MM, Padovani CR, Okoshi K, et al. [Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(1):62-70.
4. Valen G. Innate immunity and remodelling. *Heart Fail Rev.* 2011;16(1):71-8.
5. Gorressen S, Stern M, van de Sandt AM, Cortese-Krott MM, Ohlig J, Rassaf T, et al. Circulating NOS3 Modulates Left Ventricular Remodeling following Reperfused Myocardial Infarction. *PloS one.* 2015;10(4):e0120961.
6. Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, et al. Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(8):555-70.
7. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012;110(1):159-73.
8. Garza MA, Wason EA, Zhang JQ. Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction. *World journal of cardiology.* 2015;7(2):52-64.
9. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.
10. Kumar R, Yong QC, Thomas CM. Do multiple nuclear factor kappa B activation mechanisms explain its varied effects in the heart? *Ochsner J.* 2013;13(1):157-65.
11. Duerrschmid C, Crawford JR, Reineke E, Taffet GE, Trial J, Entman ML, et al. TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating

angiotensin-II-induced cardiac fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;57:59-67.

12. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):549-74.

13. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):448-60.

14. Mnafigui K, Hajji R, Derbali F, Khlif I, Kraiem F, Ellefi H, et al. Protective Effect of Hydroxytyrosol Against Cardiac Remodeling After Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rat. *Cardiovasc Toxicol*. 2015.

15. Roy S, Khanna S, Kuhn DE, Rink C, Williams WT, Zweier JL, et al. Transcriptome analysis of the ischemia-reperfused remodeling myocardium: temporal changes in inflammation and extracellular matrix. *Physiological genomics*. 2006;25(3):364-74.

16. Jin HB, Yang YB, Song YL, Zhang YC, Li YR. Protective roles of quercetin in acute myocardial ischemia and reperfusion injury in rats. *Molecular biology reports*. 2012;39(12):11005-9.

17. Remme WJ. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003;17(4):349-60.

18. La Bonte LR, Davis-Gorman G, Stahl GL, McDonagh PF. Complement inhibition reduces injury in the type 2 diabetic heart following ischemia and reperfusion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294(3):H1282-90.

19. Tranter M, Ren X, Forde T, Wilhide ME, Chen J, Sartor MA, et al. NF-kappaB driven cardioprotective gene programs; Hsp70.3 and cardioprotection after late ischemic preconditioning. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;49(4):664-72.

20. He K, Yan L, Pan CS, Liu YY, Cui YC, Hu BH, et al. ROCK-dependent ATP5D modulation contributes to the protection of notoginsenoside NR1 against ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;307(12):H1764-76.

21. Wang Y, Tian Z, Zang W, Jiang H, Li Y, Wang S, et al. Exercise training reduces insulin resistance in postmyocardial infarction rats. *Physiol Rep*. 2015;3(4).
22. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(8):444-54.
23. Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, et al. Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res*. 2007;100(1):140-6.
24. Hashmi S, Al-Salam S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):8786-96.
25. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovascular research*. 2012;94(2):276-83.
26. Bogren LK, Olson JM, Carpluk J, Moore JM, Drew KL. Resistance to systemic inflammation and multi organ damage after global ischemia/reperfusion in the arctic ground squirrel. *PloS one*. 2014;9(4):e94225.
27. Pei H, Song X, Peng C, Tan Y, Li Y, Li X, et al. TNF-alpha inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress. *Free radical biology & medicine*. 2015.
28. Tang XL, Sanganalmath SK, Sato H, Bi Q, Hunt G, Vincent RJ, et al. Atorvastatin therapy during the peri-infarct period attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *PloS one*. 2011;6(9):e25320.
29. Sogaard P, Gotzsche CO, Ravkilde J, Thygesen K. Effects of captopril on ischemia and dysfunction of the left ventricle after myocardial infarction. *Circulation*. 1993;87(4):1093-9.
30. Peart JN, Headrick JP. Clinical cardioprotection and the value of conditioning responses. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;296(6):H1705-20.

31. Venardos KM, Perkins A, Headrick J, Kaye DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem*. 2007;14(14):1539-49.
32. Andreadou I, Iliodromitis EK, Koufaki M, Farmakis D, Tsotinis A, Kremastinos DT. Alternative pharmacological interventions that limit myocardial infarction. *Curr Med Chem*. 2008;15(30):3204-13.
33. Kharbanda RK. Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury. *Heart*. 2010;96(15):1179-86.
34. Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J, Jr., et al. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation*. 1971;43(1):67-82.
35. Moss NC, Stansfield WE, Willis MS, Tang RH, Selzman CH. IKKbeta inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293(4):H2248-53.
36. Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *European heart journal*. 2011;32(6):680-5.
37. Frantz S, Stoerk S, Ok S, Wagner H, Angermann CE, Ertl G, et al. Effect of chronic heart failure on nuclear factor kappa B in peripheral leukocytes. *Am J Cardiol*. 2004;94(5):671-3.
38. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annual review of physiology*. 2003;65:81-101.
39. BRASIL LA, GOMES WJ, SALOMÃO R, FONSECA JHP, BRANCO JNR, BUFFOLO E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 1999;14:254-68.
40. Frangogiannis NG. Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts. *Discoveries (Craiova)*. 2015;3(1).
41. Siednienko J, Jankowska EA, Banasiak W, Gorczyca WA, Ponikowski P. Nuclear factor-kappaB activity in peripheral blood mononuclear cells in

cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2007;122(2):111-6.

42. Higashikuni Y, Tanaka K, Kato M, Nureki O, Hirata Y, Nagai R, et al. Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1beta upregulation via nuclear factor kappaB activation. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(6):e000267.

43. Ridker PM, Luscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *European heart journal.* 2014;35(27):1782-91.

44. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med.* 2008;5(4):e78.

45. Mahmoud AB, Burhani MS, Hannef AA, Jamjoom AA, Al-Githmi IS, Baslaim GM. Effect of modified ultrafiltration on pulmonary function after cardiopulmonary bypass. *Chest.* 2005;128(5):3447-53.

46. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther.* 2010;127(3):295-314.

47. Hall G, Hasday JD, Rogers TB. Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2006;41(4):580-91.

48. Pinz I, Wax SD, Anderson P, Ingwall JS. Low over-expression of TNFalpha in the mouse heart increases contractile performance via TNFR1. *J Cell Biochem.* 2008;105(1):99-107.

49. Asgeri M, Pourafkari L, Kundra A, Javadzadegan H, Negargar S, Nader ND. Dual effects of tumor necrosis factor alpha on myocardial injury following prolonged hypoperfusion of the heart. *Immunol Invest.* 2015;44(1):23-35.

50. Lima Ede A, Lima Mde A. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol.* 2011;86(6):1151-8.

51. Fauconnier J, Meli AC, Thireau J, Roberge S, Shan J, Sassi Y, et al. Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular

injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(32):13258-63.

52. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004;90(4):464-70.

53. Hamid T, Guo SZ, Kingery JR, Xiang X, Dawn B, Prabhu SD. Cardiomyocyte NF-kappaB p65 promotes adverse remodeling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovascular research*. 2011;89(1):129-38.

54. Jones WK, Brown M, Ren X, He S, McGuinness M. NF-kappaB as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? *Cardiovasc Toxicol*. 2003;3(3):229-54.

55. Morgan EN, Boyle EM, Jr., Yun W, Griscavage-Ennis JM, Farr AL, Canty TG, Jr., et al. An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann Thorac Surg*. 1999;68(2):377-82.

56. Gao Y, Chen X, Fang L, Liu F, Cai R, Peng C, et al. Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting IKKbeta inhibition in LPS-activated macrophages. *Free radical biology & medicine*. 2014;72:104-12.

57. Domagala F, Martin G, Bogdanowicz P, Ficheux H, Pujol JP. Inhibition of interleukin-1beta-induced activation of MEK/ERK pathway and DNA binding of NF-kappaB and AP-1: potential mechanism for Diacerein effects in osteoarthritis. *Biorheology*. 2006;43(3-4):577-87.

58. Huang RY, Lu SH, Su KW, Chen JK, Fang WH, Liao WN, et al. Diacerein: a potential therapeutic drug for periodontal disease. *Medical hypotheses*. 2012;79(2):165-7.

59. Pelletier JP, Lajeunesse D, Reboul P, Mineau F, Fernandes JC, Sabouret P, et al. Diacerein reduces the excess synthesis of bone remodeling factors by human osteoblast cells from osteoarthritic subchondral bone. *J Rheumatol*. 2001;28(4):814-24.

60. Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol*. 2015;30(3):240-5.

61. Gao E, Lei YH, Shang X, Huang ZM, Zuo L, Boucher M, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse. *Circ Res.* 2010;107(12):1445-53.
62. Pasin JS, Ferreira AP, Saraiva AL, Ratzlaff V, Andrighetto R, Tomazetti J, et al. Diacerein decreases TNF-alpha and IL-1beta levels in peritoneal fluid and prevents Baker's yeast-induced fever in young rats. *Inflamm Res.* 2010;59(3):189-96.
63. Jatwa R, Kar A. Anti-inflammatory and anti-peroxidative roles of diacerein are possibly mediated through an alteration in thyroid functions in animal model of inflammation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009;23(4):465-71.
64. Zhou X, Li C, Xu W, Chen J. Trimetazidine protects against smoking-induced left ventricular remodeling via attenuating oxidative stress, apoptosis, and inflammation. *PloS one.* 2012;7(7):e40424.
65. Ishikawa K, Chemaly ER, Tilemann L, Fish K, Ladage D, Aguero J, et al. Assessing left ventricular systolic dysfunction after myocardial infarction: are ejection fraction and dP/dt(max) complementary or redundant? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2012;302(7):H1423-8.
66. Routledge FS, Campbell TS, McFetridge-Durdle JA, Bacon SL. Improvements in heart rate variability with exercise therapy. *Can J Cardiol.* 2010;26(6):303-12.
67. Li Z, Meng D, Li G, Xu J, Tian K, Li Y. Celecoxib Combined with Diacerein Effectively Alleviates Osteoarthritis in Rats via Regulating JNK and p38MAPK Signaling Pathways. *Inflammation.* 2015.
68. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, et al. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation.* 2005;112(25):3911-8.
69. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB. *Circ Res.* 2011;108(9):1122-32.
70. Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2011;16(1):49-69.

71. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.

72. Yoshiyama M, Omura T, Takeuchi K, Kim S, Shimada K, Yamagishi H, et al. Angiotensin blockade inhibits increased JNKs, AP-1 and NF-kappa B DNA-binding activities in myocardial infarcted rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33(4):799-810.

8- ANEXOS

8.1- Liberação do uso do artigo na presente tese:

----- Original Message -----

From: Orlando Petrucci [orlandopetrucci@mac.com]

Sent: 24/10/2015 22:46

To: plosone@plos.org

Cc: analigtorina@gmail.com

Subject: copyright - Article: Dacerein Improves Left Ventricular Remodeling and Cardiac Function by Reducing the Inflammatory Response after Myocardial Infarction

Dear PLOS ONE JOURNAL OFFICE.

I am the senior author of manuscript on the email's subject. This manuscript was PhD a thesis of Torina (First Author). We are using the manuscript as a part of her PhD thesis document. Therefore, our institution asks for a statement from your journal granting the authors for its use.

Although, PLOS ONE Journal has distributed this article with unrestricted permission of use, our institution insists with a statement from your journal.

Could you help me with this issue?

Thank you for your time and attention.

Best regards

Orlando Petrucci MD, PhD

Professor of Surgery

Surgery Department

University of Campinas - School of Medical Science - UNICAMP

Campinas - SP - BRAZIL

CEP 13083-970

Phone: +1 314 267-6513

Fax: +55 19 32490051

Web page: <http://www.fcm.unicamp.br/fcm/>

ref_00DU0ifis_500U0Nyo75:ref

From: plosone <plosone@plos.org>
Date: October 25, 2015 at 12:35:47 AM CDT
To: "orlandopetrucci@mac.com" <orlandopetrucci@mac.com>
Subject: RE: copyright - 10.1371/journal.pone.0121842 [ref: _00DU0ffls_500U0Nyo75:ref]

Dear Dr. Petrucci,

Thank you for your message. PLOS ONE publishes all of the content in the articles under an open access license called "CC-BY." This license allows you to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles or images in PLOS journals, so long as the original creators are credited (e.g., including the article's citation and/or the image credit). Additional permissions are not required. You can read about our open access license here: <http://www.plos.org/about/open-access/>.

There are many ways to access our content, including HTML, XML, and PDF versions of each article. Higher resolution versions of figures can be downloaded directly from the article.

Please do let us know if this statement is acceptable for your institution.

Kind regards,

Amy

Amy Sutherland
Staff EO
PLOS ONE

8.2- Aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da UNICAMP/CEUA



UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Ação de agentes químicos na isquemia e reperfusão miocárdica" (protocolo nº 2428-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Orlando Petrucci Jr., está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de junho de 2011.

Campinas, 25 de julho de 2011.

2ª. VIA


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>