

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia

Alexandre Santos Bruno

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO DANO CARDÍACO
DESENCADEADO POR COCAÍNA

Belo Horizonte

2024

Alexandre Santos Bruno

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO DANO CARDÍACO
DESENCADEADO POR COCAÍNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia

Orientador: Professor Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau (Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG)

Belo Horizonte

2024

043

Bruno, Alexandre Santos.

Avaliação do papel do inflamassoma NLRP3 no dano cardíaco desencadeado por cocaína [manuscrito] / Alexandre Santos Bruno. – 2024. 114 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Professor Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Cocaína. 3. Coração. 4. Inflamassomos. 5. Glibureto. 6. Carvedilol. I. Cau, Stéfany Bruno de Assis. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 389 DE ALEXANDRE SANTOS BRUNO

Às 13:30 horas do dia 19 do mês de novembro de 2024, Transmitida através da Plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Alexandre Santos Bruno**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Thiago Bruder do Nascimento**, College of Medicine, University of South Alabama, US, **Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães**, Escola de Farmácia/UFOP, **Profa. Dra Cibele Rocha Resende**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais e a **Profa. Dra. Daniella Bonaventura**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**AValiação DO PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO DANO CARDÍACO DESENCADEADO POR COCAÍNA**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura**, Professora do Magistério Superior, em 27/11/2024, às 07:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Rocha Resende**, Professora do Magistério Superior, em 05/12/2024, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stéfany Bruno de Assis Cau**, Professor do Magistério Superior, em 09/12/2024, às 00:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Grabe Guimaraes**, Usuário Externo, em 19/12/2024, às 06:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Bruder**, Usuário Externo, em 24/12/2024, às 21:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3740488** e o código CRC **D783963D**.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese marca o ápice de uma jornada repleta de desafios, sacrifícios e crescimento pessoal e acadêmico. Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e a inspiração de muitas pessoas, às quais sou profundamente grato.

Primeiramente, gostaria de expressar minha mais sincera gratidão ao meu orientador, Stefany B. A. Cau. Suas orientações meticulosas, críticas construtivas e incentivo constante foram cruciais para a elaboração desta pesquisa. Cada conversa, cada revisão e cada conselho foram fundamentais para que eu pudesse amadurecer como pesquisador e alcançar a profundidade necessária para este trabalho. Estendo também meus agradecimentos aos colaboradores que tornaram esta jornada possível. Agradeço a Antônio Oliveira e Maria Carolina Silva; Carla Ceron e Alessandra Oliveira; Jader Cruz e Alexandre Costa; Silvia Guatimosim, Mário Silva e Bruno Sanches; Frederico Soriani e Karina; Fernanda Bello; e Lindsay, meu sincero agradecimento por seu apoio inestimável, conhecimento compartilhado e presença ao longo de cada etapa deste percurso. Sem a colaboração e o empenho de cada um de vocês, este trabalho não teria sido possível.

Um agradecimento especial e profundo à minha mãe, Laura. Desde muito cedo, você me incentivou a perseguir o sonho de ser doutor, acreditando em mim até nos momentos em que eu duvidava. Foi seu exemplo de determinação, força e amor que me guiou ao longo desta jornada. Cada conquista, cada superação, foi motivada pela sua confiança em meu potencial. Esta tese é, sem dúvida, tanto minha quanto sua, pois foi sua motivação e seu desejo de me ver alcançar este título que me impulsionaram a continuar, mesmo nos momentos mais difíceis. Faço isso por você, com toda certeza, e espero que este título seja um reflexo do seu imenso amor e dedicação ao longo de toda a minha vida.

Ao meu pai, Edmundo, e às minhas irmãs, Ana Luísa e Fernanda, meu sincero agradecimento pelo apoio incondicional e pelas palavras de encorajamento. Vocês sempre estiveram ao meu lado, oferecendo suporte emocional e acreditando no meu sucesso. A vocês, minha gratidão eterna.

À minha esposa, Livia, agradeço por ter sido minha companheira incansável em todos os momentos desta jornada. Seu amor, paciência e compreensão foram fundamentais para que eu pudesse me dedicar integralmente a este trabalho. A cada

passo dado, eu sabia que tinha em você o apoio necessário para seguir em frente. Seu suporte foi imprescindível para que eu pudesse transformar este sonho em realidade.

Também gostaria de agradecer às agências de fomento, cuja contribuição foi essencial para a realização deste trabalho. O apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) foi vital para que eu pudesse desenvolver este projeto com a dedicação e o rigor científico necessários.

Por fim, agradeço a todos os colegas, amigos e colaboradores que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese. As discussões, parcerias e o apoio mútuo foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. A todos, meu sincero obrigado.

RESUMO

A dependência de cocaína compromete a qualidade de vida e a capacidade de trabalho dos usuários, além de elevar os custos públicos com tratamento. Perifericamente, a cocaína bloqueia a recaptação de noradrenalina pelo transportador NET, aumentando sua disponibilidade na fenda sináptica e exacerbando seus efeitos sobre o coração. Além da ativação dos receptores adrenérgicos, a cocaína ativa NF- κ B, induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18, e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses eventos culminam na ativação do inflamassoma NLRP3, plataforma intracelular que culmina na ativação da caspase-1 e está envolvida na fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Contudo, a participação do inflamassoma NLRP3 nos danos cardíacos causados por cocaína ainda não foi demonstrada. Para isso, camundongos C57BL/6 receberam cocaína (15 mg/kg/dia; i.p) por 5 ou 15 dias para estudo morfométrico cardíaco e acompanhamento da pressão arterial sistólica (PAS) não invasiva. Foi observado que a cocaína induziu aumento de peso cardíaco, espessamento da parede septal e hipertrofia de cardiomiócitos em ambos os tempos. A PAS aumentou após 15 dias de cocaína. Assim, o estudo focou na caracterização das alterações cardíacas após 5 dias de cocaína. Neste tempo, apesar da cocaína não induzir fibrose e causar alterações sutis ao eletrocardiograma, observou-se elevada contratilidade basal de corações isolados, com menor capacidade de resposta ao estresse farmacológico por agonista β -adrenérgico. Observou-se, também, redução das barreiras antioxidantes, evidenciada pela redução da atividade de SOD e catalase, somada ao aumento de EROs, medido por sonda fluorescente (DHE) e ativação do inflamassoma NLRP3, determinada pela sonda fluorescente para caspase-1 ativa (FAM-FLICA). Assim, para determinar o papel do inflamassoma NLRP3, animais que receberam cocaína foram tratados com as drogas MCC950 (20 mg/kg/dia; i.p) e glibenclamida (20 mg/kg/dia; p.o). Além de prevenir a hipertrofia cardíaca, celular e o remodelamento septal, a inibição do inflamassoma NLRP3 preveniu as alterações de contratilidade, tanto *ex vivo*, como em cardiomiócitos isolados. Além disso, a inibição do inflamassoma preveniu a redução do transiente de cálcio, o aumento da expressão gênica de IL-1 β , e o aumento da concentração de EROs e da atividade de caspase-1 induzidos por cocaína. Parte desses dados foi confirmada em animais nocautes (KO) para NLRP3 e caspase-1 que receberam cocaína, nos quais se notou prevenção da hipertrofia cardíaca e da redução da capacidade antioxidante. Por fim, para confirmar o envolvimento de receptores adrenérgicos nos efeitos cardíacos da cocaína, um grupo foi tratado com carvedilol (20 mg/kg/dia; i.p), um antagonista misto dos receptores adrenérgicos. Observou-se que o carvedilol, além de mimetizar os efeitos dos inibidores do inflamassoma NLRP3, prevenindo

a hipertrofia cardíaca e celular, a hipercontratilidade basal e a menor resposta a estímulo adrenérgico *ex vivo*, inibiu a ativação do inflamassoma NLRP3 induzida por cocaína. Conclui-se que o inflamassoma NLRP3 participa do dano cardíaco causado por cocaína, e que inibidores desse inflamassoma previnem tais prejuízos. A ativação do inflamassoma NLRP3 pela cocaína é mediada pela estimulação dos receptores adrenérgicos, visto que o antagonista misto desses receptores inibiu sua atividade e preveniu os danos cardíacos induzidos pela droga.

Palavras-chave: cocaína; coração; inflamassoma NLRP3; MCC950; glibenclamida; carvedilol.

ABSTRACT

Cocaine dependence negatively affects the quality of life and working capacity of users and is associated with increased public costs for treating dependents. Peripherally, cocaine blocks the reuptake of noradrenaline through the norepinephrine transporter (NET), increasing its availability in the synaptic cleft and exacerbating its effects on the heart. In addition to increased activation of adrenergic receptors, cocaine activates NF- κ B and the expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and IL-18, as well as the production of reactive oxygen species (ROS). These are key events in the activation of the NLRP3 inflammasome, an intracellular platform that culminates in caspase-1 activation and is involved in the pathophysiology of several cardiovascular diseases. Despite this evidence, there has not yet been a demonstration of the involvement of the NLRP3 inflammasome in cocaine-induced cardiac damage. For this purpose, C57BL/6 mice were given cocaine (15 mg/kg/day; i.p) for either 5 days or 15 days to assess cardiac morphometry and non-invasive systolic blood pressure (SBP) monitoring. Cocaine was observed to induce an increase in heart weight, septal wall thickening, and cardiomyocyte hypertrophy at both time points. SBP increased only after 15 days of cocaine exposure. Thus, the study focused on characterizing cardiac changes after 5 days of cocaine exposure. At this time point, although cocaine did not induce fibrosis and caused only subtle changes in the electrocardiogram, elevated basal contractility was observed in isolated hearts, with a reduced response to pharmacological stress by β -adrenergic agonists. Additionally, there was a reduction in antioxidant barriers, evidenced by a decrease in SOD and catalase activities, combined with an increase in ROS, measured by fluorescent probe (DHE), and activation of the NLRP3 inflammasome, determined by a fluorescent probe for active caspase-1 (FAM-FLICA). Thus, to determine the role of the NLRP3 inflammasome, animals treated with cocaine were given the drugs MCC950 (20 mg/kg/day; i.p) and glibenclamide (20 mg/kg/day; p.o). In addition to preventing cardiac, cellular hypertrophy, and septal remodeling, NLRP3 inflammasome inhibition prevented contractility changes, both *ex vivo* and in isolated cardiomyocytes. Furthermore, inflammasome inhibition prevented the reduction in calcium transients, the increase in IL-1 β gene expression, and the increase in ROS concentration and caspase-1 activity induced by cocaine. Some of these findings were confirmed in NLRP3 and caspase-1 knockout (KO) mice treated with cocaine, in which prevention of cardiac hypertrophy and reduction in antioxidant capacity was observed. Finally, to confirm the involvement of adrenergic receptors in cocaine's cardiac effects, a group was treated with carvedilol (20 mg/kg/day; i.p), an α - and β dual receptor blocker. It was observed that carvedilol, in addition to mimicking the effects of NLRP3 inflammasome inhibitors by preventing cardiac and cellular hypertrophy, basal hypercontractility, and reduced

ex vivo adrenergic response, inhibited NLRP3 inflammasome activation induced by cocaine. In conclusion, NLRP3 inflammasome plays a role in cocaine-induced cardiac damage, and treatments with NLRP3 inflammasome inhibitors prevent this injury. NLRP3 inflammasome activation by cocaine is mediated by adrenergic receptor stimulation, as combined α - and β -receptor blockage inhibited NLRP3 inflammasome activity and prevented cocaine-induced cardiac damage.

Keywords: cocaine; heart; NLRP3 inflammasome; MCC950; glibenclamide; carvedilol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da cocaína na recaptação de neurotransmissores nas sinapses.	22
Figura 2: Principais causas de morte no mundo em 2016.	26
Figura 3: Padrões de remodelamento cardíaco de acordo com a espessura relativa da parede ventricular esquerda e o índice de massa ventricular esquerda.	27
Figura 4: Esquema ilustrativo da ativação do inflamassoma NLRP3.	31
Figura 5: Delineamentos experimentais, conforme o objetivo testado.	36
Figura 6: Representação esquemática do sistema de perfusão e parâmetros analisados durante a técnica de verificação da função cardíaca ex vivo.	39
Figura 7: Representação esquemática e cálculo da morfometria cardíaca.	42
Figura 8: Alterações de curto (5 dias) e médio (15 dias) prazos induzidas por cocaína sobre a estrutura cardíacas e a pressão arterial.	50
Figura 9: Determinação histológica da hipertrofia de cardiomiócitos após cocaína por 5 e 15 dias.	51
Figura 10: Balanço oxidativo renal após cocaína.	53
Figura 11: Superfície fibrótica cardíaca após cocaína.	54
Figura 12: Análise eletrocardiográfica dos efeitos da cocaína.	56
Figura 13: Função cardíaca basal ex vivo, utilizando a técnica de Langendorff.	57
Figura 14: Resposta inotrópica à isoprenalina (agonista β -adrenérgico) e ao deslanosídeo (inibidor de bomba de sódio/potássio).	59
Figura 15: Avaliação cardíaca da atividade da caspase-1 e do estresse oxidativo causados por cocaína.	61
Figura 16: Efeito dos tratamentos com MCC950 e glibenclamida nas alterações morfométricas causadas por cocaína.	63
Figura 17: Efeito do tratamento com MCC950 ou glibenclamida sobre a hipertrofia de cardiomiócitos da parede interventricular induzida por cocaína.	64
Figura 18: Efeito do tratamento com MCC950 ou glibenclamida sobre a alteração de função cardíaca ex vivo causada por cocaína.	65

Figura 19: Impacto da inibição do inflamassoma NLRP3 por MCC950 ou glibenclamida sobre o efeito inotrópico positivo da isoprenalina em corações isolados de camundongos que receberam cocaína.	67
Figura 20: Efeito da cocaína e dos tratamentos com MCC950 ou glibenclamida sobre a função contrátil na ausência ou presença de isoprenalina (10^{-7} M), agonista β -adrenérgico, ou fenilefrina (10^{-7} M), agonista α -adrenérgico, e sobre a expressão proteica dos receptores adrenérgicos em cardiomiócitos isolados.....	70
Figura 21: Efeito do tratamento com MCC950 ou glibenclamida sobre as alterações de transiente de cálcio e expressão de SERCA2a induzidas por cocaína em cardiomiócitos isolados.	72
Figura 22: Efeitos cardíacos da cocaína e dos tratamentos com MCC950 ou glibenclamida sobre a atividade da caspase-1, produção de EROs e expressão gênica de IL-1 β	73
Figura 23: Avaliação da deleção genética do receptor NLRP3 e da enzima caspase-1 sobre a redução da proteção oxidante e o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzidos por cocaína em machos e fêmeas.	75
Figura 24: Efeito do Carvedilol sobre o remodelamento cardíaco causado por cocaína.	77
Figura 25: Efeito do tratamento com carvedilol sobre a hipertrofia de cardiomiócitos da parede interventricular induzida por cocaína.....	78
Figura 26: Efeito do tratamento com carvedilol (Carv) sobre a as alterações basais de contratilidade ex vivo causadas por cocaína.	79
Figura 27: Efeito do tratamento com carvedilol sobre o prejuízo da resposta inotrópica à isoprenalina causado por cocaína.	80
Figura 28: Efeito do tratamento com carvedilol sobre o aumento da atividade da caspase-1 cardíaca.	81
Figura 29: Efeito do tratamento com carvedilol sobre os níveis séricos de creatinina.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting..... 45

Tabela 2: Alvo, sequência e concentração (nM) dos oligonucleotídeos utilizados 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S – Subunidade menor do RNA Ribossômico

A/D – Analógico para Digital (conversor)

Aivd – Área Interna do Ventrículo Direito

AIvD – Área Interna do Ventrículo Direito

Aive – Área Interna do Ventrículo Esquerdo

AIvE – Área Interna do Ventrículo Esquerdo

AM – Acetoximetil

ASC-1 – Proteína Adaptadora associada à apoptose contendo domínio CARD

At – Área Total

BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina de Soro Bovino)

Ca²⁺ – Íon Cálcio

Ca²⁺i – Cálcio Intracelular

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CaMKII – *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II* (Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo II)

CaSR – Receptor Sensitivo ao Cálcio

cDNA – *Complementary DNA* (DNA complementar)

Ce – Comprimento Externo

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

Ci – Comprimento

CK-MB – Creatina Quinase MB

CocaCarv – Grupo cocaína tratado com carvedilol

CocaGlib – Grupo cocaína tratado com glibenclamida

CocaMCC – Grupo cocaína tratado com MCC950

Ct – *Threshold Cycle* (Ciclo de Limiar)

DAT – Transportador de Dopamina

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos

$dP/dt_{\max}$ – Índice Máximo de Contratilidade

$dP/dt_{\min}$ – Índice Mínimo de Contratilidade

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DHE – Dihidroetidina

DTNB – 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoato), reagente usado para medir GSH

ECG – Eletrocardiograma

e.p.m. – Erro Padrão da Média

EPVe – Espessura da Parede Ventricular Esquerda

EPVd – Espessura da Parede Ventricular Direita

EPS – Espessura Média da Parede Septal

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

F/F_0 – Amplitude Relativa do Transiente de Cálcio

FAM – Fluoresceína Amidita (fluoróforo)

FC – Frequência Cardíaca

FLICA – *Fluorochrome-Labeled Inhibitor of Caspases*

F_0 – Fluorescência Basal Intracelular

GSH – Glutathione Reduzida

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio

HE – Hematoxilina e Eosina

HEPES – N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfonato)

Hz – Hertz

HSP90 – *Heat Shock Protein 90*

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IC – Insuficiência Cardíaca

IKr – Corrente Retificadora Tardia

IL-1 β – Interleucina-1 beta

IL-18 – Interleucina-18

i.p. – Intraperitoneal

KCl – Cloreto de Potássio

KH_2PO_4 – Fosfato Monopotássico

KO – Animais Nocautes

K-S – Kolmogorov-Smirnov (teste de normalidade)

MgCl_2 – Cloreto de Magnésio

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de Magnésio Hexahidratado

Na_3VO_4 – Orthovanadato de Sódio

Na^+/K^+ -ATPase – Bomba de Sódio e Potássio

NaCl – Cloreto de Sódio

NET – Transportador de Noradrenalina

NF- κ B – Fator Nuclear *kappa* B

NIH – *National Institute of Health*

NLRP3 – Nod-like Receptor Protein 3

OCT – *Optimal Cutting Temperature*

p.o. – *per os* (oral)

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

PDVE – Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo

PKA – Protein Kinase A

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PP – Pressão de Perfusão

QTc – Intervalo QT Corrigido

QTc(n)-B – Intervalo QT Corrigido pelo Método de Bazett

RHVE – Remodelamento Hipertrófico Ventricular Esquerdo

RIPA – *Radioimmunoprecipitation Assay* (tampão)

RPM – Rotações Por Minuto

RT-qPCR – *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcrição Reversa)

SERT – Transportador de Serotonina

SERCA2 – *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2* (cálcio-ATPase 2 do retículo sarcoplasmático)

SOD – Superóxido Dismutase

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)

TBS-T – *Tris-Buffered Saline with Tween*

VE – Ventrículo Esquerdo

Wt – *Wild-type* (tipo selvagem)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Uma breve história da cocaína	19
1.2. A cocaína como problema de saúde pública	20
1.3. Uma abordagem mais aprofundada sobre a farmacologia da cocaína	21
1.4. A cocaína e o sistema cardiovascular	25
1.5. A teoria do mecanismo inflamatório das doenças cardiovasculares e a cocaína	29
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Animais, delineamentos experimentais e tratamentos	34
3.2. Pressão arterial sistólica	37
3.3. Eletrocardiografia	37
3.4. Determinação dos níveis de creatinina para avaliação da função renal	38
3.5. Análise de função cardíaca <i>ex vivo</i>	38
3.6. Preparo do rim, coração e cardiomiócitos isolados	40
3.6.1. Preparação histopatológica cardíaca	40
3.6.2. Análise de espécies reativas de oxigênio em cardiomiócitos isolados e <i>in situ</i>	43
3.6.3. Análise de ativação do inflamassoma NLRP3 por atividade da caspase-1 em cardiomiócitos isolados e <i>in situ</i>	43
3.6.4. Análise de enzimas antioxidantes	43
3.6.5. Análise por Western Blotting de proteínas cardíacas	44
3.6.6. Análise da expressão gênica para marcadores do inflamassoma	45
3.6.7. Análise de função de cardiomiócitos	47
3.6.8. Análise de transiente de cálcio de cardiomiócitos	47
3.7. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1. A cocaína causa alterações morfofuncionais cardíacas de curto prazo associadas à produção de espécies reativas de oxigênio e à ativação do inflamassoma NLRP3	49
4.2. A inibição farmacológica do inflamassoma NLRP3 previne os efeitos negativos da cocaína sobre o coração	62
4.3. A deleção de genes do receptor NLRP3 e da caspase-1 confirma que o inflamassoma NLRP3 é essencial para os efeitos cardiodeletérios da cocaína	74
4.4. O antagonista misto dos receptores adrenérgicos, carvedilol, melhora os efeitos cardiodeletérios da cocaína, concomitantemente à inibição do inflamassoma NLRP3	76

5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	107
ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA.....	107
ANEXO 2 – Menção Honrosa apresentação oral 2022.....	108
ANEXO 3 – Trabalhos publicados (não relacionados à tese)	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uma breve história da cocaína

O uso de cocaína tem uma longa história que remonta às civilizações antigas da América do Sul. As folhas de coca (*Erythroxylum coca*) eram mastigadas pelos incas para obter energia e combater a fome e a fadiga, especialmente pelas classes sociais mais elevadas e em práticas ritualísticas (BIONDICH; JOSLIN, 2016). Essas práticas foram documentadas por exploradores espanhóis durante o século XVI (STOLBERG, 2011). No final do século XIX, a análise química das folhas de coca levou à identificação de diferentes alcaloides (NOVAK; SALEMINK *et al.*, 1984), sendo os dois mais importantes a cocaína e a cinamoilcocaína (RIVIER, 1981). A cocaína foi, então, isolada quimicamente e utilizada em várias preparações médicas e recreativas, inclusive em bebidas açucaradas, como a Coca-Cola.

No final do século XIX e início do século XX, a cocaína ganhou popularidade na medicina devido às suas propriedades estimulantes e anestésicas (GRZYBOWSKI, 2007). Foi amplamente utilizada por médicos e psiquiatras, incluindo Sigmund Freud, que a prescrevia para tratar depressão e outros transtornos psiquiátricos. A cocaína também foi usada como anestésico local em cirurgias odontológicas e oftalmológicas (CALATAYUD; GONZALEZ, 2003). Com o tempo, os efeitos adversos da cocaína, como a dependência e os problemas cardiovasculares, tornaram-se evidentes. Isso levou à implementação de regulamentações rigorosas no início do século XX. A Lei de Narcóticos de Harrison, promulgada nos Estados Unidos em 1914, foi uma das primeiras tentativas de controlar a distribuição e o uso de cocaína (MUSTO, 1991).

A cocaína atua bloqueando a recaptação de catecolaminas (como dopamina e noradrenalina) e serotonina nos sistemas nervoso periférico e central, resultando em acúmulo dessas substâncias nas fendas sinápticas (FERNANDEZ-CASTILLO; CABANA-DOMINGUEZ *et al.*, 2022). Este mecanismo proporciona os efeitos eufóricos e estimulantes da droga, mas também é responsável pelos seus efeitos adversos, como a potencial toxicidade cardíaca e cerebral. Embora a cocaína tenha sido utilizada inicialmente como anestésico local devido às suas propriedades vasoconstritoras e anestésicas, a descoberta de seu potencial de abuso e seus efeitos

adversos levou a cocaína ao grau de problema de saúde pública e à substituição por anestésicos mais seguros, como a procaína e a lidocaína.

1.2. A cocaína como problema de saúde pública

A dependência de cocaína compromete a qualidade de vida e a capacidade laboral dos usuários. Além disso, a cocaína pode gerar, por exemplo, aumento de violência doméstica, aumento dos custos governamentais para o tratamento da dependência química, caracterizando-se, desse modo, como um importante problema de saúde pública (DE BARROS; DIEHL *et al.*, 2022).

A cocaína afeta não apenas os usuários, mas também suas famílias e comunidades. De acordo com ABDALLA; MADRUGA *et al.* (2014), o consumo de cocaína no Brasil revela um expressivo viés de gênero, sendo o uso predominantemente associado ao sexo masculino. Os dados indicam que os homens apresentam consumo de cocaína de uma a três vezes maior em comparação às mulheres. Além disso, observa-se que a maioria dos usuários possui mais de nove anos de escolaridade e, em muitos casos, encontra-se empregado no início da dependência (ABDALLA; MADRUGA *et al.*, 2014). Contudo, à medida que a dependência progride, ela, invariavelmente, conduz ao desemprego, acarretando severas repercussões econômicas para o usuário e sua rede de apoio, evidenciando o impacto social devastador do uso crônico de cocaína (ABDALLA; MADRUGA *et al.*, 2014).

O uso crônico de cocaína também está associado a uma série de problemas de saúde física e mental, incluindo acidentes vasculares cerebrais (RENDON; MALTA *et al.*, 2023), transtornos psiquiátricos (OLIVA; MANGIAPANE *et al.*, 2021) e doenças cardiovasculares periféricas (KIM; PARK, 2019). Esses problemas de saúde exigem intervenções médicas complexas e prolongadas, aumentando a pressão sobre os sistemas de saúde pública. Os custos econômicos do uso de cocaína são substanciais (CARTWRIGHT, 2000). Incluem-se gastos com atendimento médico de emergência, tratamentos de reabilitação, intervenções policiais, processos judiciais e encarceramento de indivíduos envolvidos no tráfico de drogas. Esses custos representam uma carga significativa para os orçamentos governamentais, que poderiam ser destinados a outras áreas de necessidade pública, como educação e infraestrutura (IRIZAR; PUDDEPHATT *et al.*, 2021).

A questão da cocaína também tem uma dimensão de saúde mental que não pode ser ignorada (OLIVA; MANGIAPANE *et al.*, 2021). O uso de cocaína está associado a altas taxas de comorbidades psiquiátricas, incluindo depressão, ansiedade, transtorno bipolar e esquizofrenia (SERRANO-SERRANO; MARQUEZ-ARRICO *et al.*, 2021). O tratamento dessas condições requer uma abordagem integrada, que inclui intervenções farmacológicas, terapia comportamental e apoio social. No entanto, a disponibilidade e o acesso a esses serviços são frequentemente inadequados, especialmente em comunidades de baixa renda e marginalizadas, exacerbando as desigualdades em saúde.

Por fim, o acometimento do paciente usuário de cocaína, em especial que une morbididades cardiovasculares e de transtorno psiquiátrico, representa um enorme ônus econômico para os sistemas de saúde, devido aos custos elevados com tratamentos de emergência, hospitalizações prolongadas e reabilitação. A compreensão dos mecanismos envolvidos no acometimento psiquiátrico e cardiovascular faz-se, portanto, crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para tratar as complicações decorrentes do uso de cocaína e para orientar políticas de saúde pública visando a redução dos danos associados ao abuso dessa substância. A prevenção e o tratamento da dependência de cocaína exigem uma abordagem multifacetada, que inclua políticas públicas eficazes, programas de educação e prevenção, e acesso a serviços de saúde e reabilitação de alta qualidade (GUIDA; MAIA *et al.*, 2024). É crucial desenvolver estratégias de redução de danos e suporte comunitário para minimizar os impactos negativos do uso de cocaína (GUIDA; MAIA *et al.*, 2024; RENDON; MALTA *et al.*, 2023). A colaboração entre governos, organizações não-governamentais e a sociedade civil é essencial para abordar de maneira abrangente e sustentável os desafios impostos pela cocaína como problema de saúde pública.

1.3. Uma abordagem mais aprofundada sobre a farmacologia da cocaína

No nível molecular, a cocaína se liga aos transportadores de aminas biogênicas (**Figura 1**) (ROQUE BRAVO; FARIA *et al.*, 2022), bloqueando a recaptação desses neurotransmissores pelo neurônio pré-sináptico, aumentando os níveis de dopamina, serotonina e noradrenalina na fenda sináptica (FERNANDEZ-CASTILLO; CABANA-DOMINGUEZ *et al.*, 2022; HALL; SORA *et al.*, 2004). Além

disso, existe evidência de que a cocaína também possa agir diretamente sobre receptores pós-sinápticos e até mesmo atuar diretamente em receptores intracelulares periféricos (HENNING; CUEVAS, 2006; TOZZI; DE IURE *et al.*, 2012).

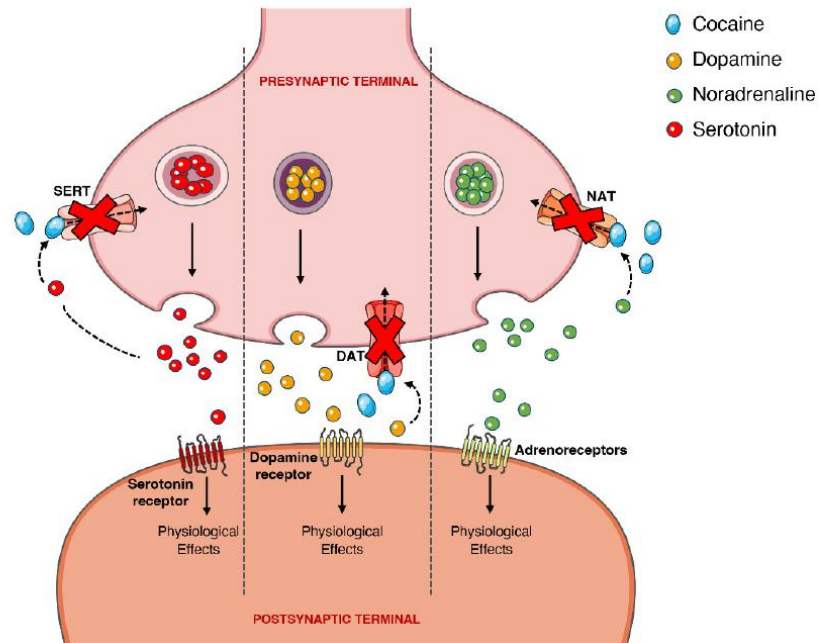


Figura 1: Efeito da cocaína na recaptação de neurotransmissores nas sinapses. Fonte: Adaptado de "Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern" (ROQUE BRAVO; FARIA *et al.*, 2022).

A ligação da cocaína aos transportadores de dopamina (DAT), de noradrenalina (NET) e de serotonina (SERT) ocorre em sítios de alta afinidade, diminuindo a função desses transportadores, que é captar os neurotransmissores da fenda sináptica de volta para o neurônio pré-sináptico (ROQUE BRAVO; FARIA *et al.*, 2022). A elevação dos níveis de dopamina é particularmente significativa no sistema mesolímbico, onde a dopamina desempenha um papel crucial na mediação dos efeitos de recompensa e prazer por uso da cocaína (OSTLUND; LEBLANC *et al.*, 2014). A ativação excessiva dos receptores de dopamina D1 e D2 contribui para os efeitos eufóricos, mas também está associada ao potencial de abuso e dependência da droga (OSTLUND; LEBLANC *et al.*, 2014). Além desses efeitos, o bloqueio do SERT eleva os níveis de serotonina que, por sua vez, está associada a alterações no humor e analgesia, podendo contribuir para efeitos ansiolíticos e analgésicos temporários (MATEO; BUDYGIN *et al.*, 2004). Por fim, o aumento da noradrenalina resultante do bloqueio do NET contribui para o efeito euforizante no sistema nervoso central, mas também leva à ativação do sistema nervoso simpático (XU; GAINETDINOV *et al.*, 2000),

manifestando-se em efeitos como aumento da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial sistêmica.

Para o sistema cardiovascular, a relação da cocaína com o NET parece ser de suma relevância e influência. Ao se ligar ao NET, a cocaína impede a recaptação de noradrenalina para o neurônio pré-sináptico, resultando em um aumento da disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica (XU; GAINETDINOV *et al.*, 2000). Esse bloqueio prolonga a ação da noradrenalina nos receptores adrenérgicos pós-sinápticos. Esta interação provoca uma série de respostas fisiológicas típicas da ativação simpática (BRODY; SLOVIS *et al.*, 1990), levando à hiperativação do sistema nervoso simpático e a um impacto periférico profundo, onde a noradrenalina atua como principal neurotransmissor (KIM; PARK, 2019; MARAJ; FIGUEREDO *et al.*, 2010; SCHWARTZ; REZKALLA *et al.*, 2010; ZHU; WANG *et al.*, 2018). Além disso, a cocaína também pode ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (ZULOAGA; JACOBSSKIND *et al.*, 2015), induzindo a liberação de adrenalina pela medula das glândulas suprarrenais. Esse aumento na circulação de adrenalina provoca uma estimulação adicional dos receptores adrenérgicos, β e α , contribuindo para o aumento da FC e da contratilidade (LIAUDET, 2014).

Um dos principais efeitos dessa hiperativação simpática é a vasoconstrição. A noradrenalina se liga aos receptores adrenérgicos α -1 localizados nos vasos sanguíneos, resultando na constrição das arteríolas (SHORTER; LINDSAY *et al.*, 2013). Isso aumenta a resistência vascular periférica e eleva a pressão arterial sistêmica (ZHU; WANG *et al.*, 2018), um fenômeno frequentemente observado em usuários de cocaína. A hipertensão resultante representa um risco significativo para eventos cardiovasculares adversos, como infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (REZKALLA; KLONER, 2007).

Além disso, a estimulação dos receptores β -1 adrenérgicos no coração aumenta a FC e a força de contração miocárdica, efeitos conhecidos como taquicardia e inotropismo positivo, respectivamente (KIM; PARK, 2019). Esses efeitos aumentam o débito cardíaco, mas também podem precipitar arritmias cardíacas e outros eventos cardiovasculares adversos. Estudos demonstram correlação direta entre o uso de cocaína e a ocorrência de IAM, mesmo em indivíduos jovens e sem doenças cardiovasculares preexistentes (QURESHI; SURI *et al.*, 2001). Nos pulmões, a ativação dos receptores β -2 adrenérgicos causa relaxamento do músculo liso

brônquico, levando à broncodilatação. Embora este efeito possa ser benéfico em situações de emergência, o uso crônico de cocaína pode ter implicações adversas para a saúde pulmonar (WINHUSEN; THEOBALD *et al.*, 2020).

O aumento sustentado da atividade adrenérgica devido ao uso de cocaína tem várias implicações clínicas e toxicológicas (BRODY; SLOVIS *et al.*, 1990). A combinação de hipertensão, taquicardia e aumento da contratilidade cardíaca eleva o risco de IAM, dissecação aórtica e acidente vascular cerebral em usuários de cocaína (MCCORD; JNEID *et al.*, 2008). Além disso, o desequilíbrio prolongado na atividade do sistema nervoso simpático pode levar a disfunções autonômicas (LUCYK, 2022), incluindo crises hipertensivas e arritmias fatais (KIM; PARK, 2019).

A cocaína exerce, também, uma influência significativa sobre os canais iônicos no coração, afetando de maneira crítica a condução elétrica e a função cardíaca (DU; PARK *et al.*, 2021; MCCOY; JAYANTHI *et al.*, 2021; TELLA; GOLDBERG, 1998). Ao bloquear os canais para sódio (Na^+), a cocaína retarda a despolarização das células cardíacas, prolongando o potencial de ação e aumentando o intervalo QT ao eletrocardiograma (ECG), o que eleva o risco de arritmias graves, como a fibrilação ventricular (PRZYWARA; DAMBACH, 1989; SCHWARTZ; REZKALLA *et al.*, 2010). Além disso, a cocaína também bloqueia canais para potássio (K^+), especialmente os canais retificadores tardios (IKr) no coração, que são essenciais para a repolarização celular. A inibição desses canais resulta em repolarização prolongada, aumentando a heterogeneidade elétrica e o risco de arritmias (MCCOY; JAYANTHI *et al.*, 2021). A cocaína também bloqueia parcialmente os canais de cálcio (Ca^{2+}) tipo L, modulando negativamente o influxo de cálcio e vias que dependam deste canal, como a do receptor β -1 adrenérgico, contribuindo diretamente para a ocorrência de espasmos coronarianos, isquemia e, em casos extremos, morte súbita cardíaca (HALE; ALKER *et al.*, 1991; SCHWARTZ; REZKALLA *et al.*, 2010). Essa ação direta sobre os canais de sódio, potássio e cálcio explica grande parte dos efeitos cardiotoxicos agudos e crônicos observados em usuários de cocaína.

Assim, a interação da cocaína com os transportadores de aminas biogênicas, bem como com os receptores pós-sinápticos e canais iônicos, explica tanto seus efeitos terapêuticos iniciais quanto os riscos associados ao seu uso sustentado sobre o sistema nervoso central e periférico, bem como as repercussões sobre órgãos e

sistemas. Por sua vez, os efeitos da cocaína sobre o coração serão discutidos nessa tese, bem como sua relação com o sistema inflamatório.

1.4. A cocaína e o sistema cardiovascular

Uma das principais consequências da cocaína para a saúde humana está relacionada aos seus impactos sobre o sistema cardiovascular. Doenças cardiovasculares ainda são a principal causa de morte no Brasil e no mundo (NOWBAR; GITTO *et al.*, 2019). Um estudo publicado na revista LANCET, realizado em 21 países, mostrou que uma a cada três mortes no mundo ocorre devido à doenças cardiovasculares (DAGENAIS; LEONG *et al.*, 2020). Mais especificamente, a doença arterial coronariana e o acidente vascular encefálico são a primeira e a segunda, respectivamente, doenças que mais causam mortes no mundo (**Figura 2**) (WHO, 2018). Não obstante, doença arterial coronariana pode ser uma das consequências do uso agudo e crônico da cocaína (MARAJ; FIGUEREDO *et al.*, 2010; SCHWARTZ; REZKALLA *et al.*, 2010; TALARICO; CROSTA *et al.*, 2017).

Top 10 principais causas globais de morte, 2016

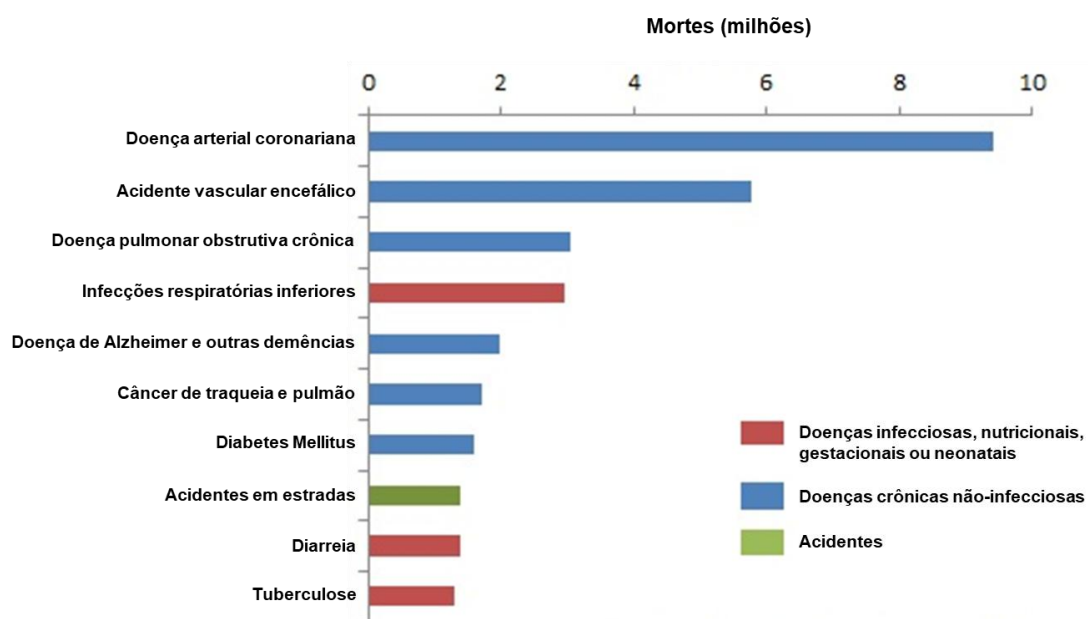


Figura 2: Principais causas de morte no mundo em 2016. Fonte: Adaptado de “Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016” (WHO, 2018).

No longo prazo, a cocaína aumenta a probabilidade de IAM, espasmos coronarianos, alterações no ECG e elevação de marcadores sorológicos de dano cardíaco, como a CK-MB, mesmo em pacientes sem registro de IAM (REZKALLA; KLONER, 2007; SCHWARTZ; REZKALLA *et al.*, 2010). Também, promove um significativo remodelamento elétrico cardíaco. Este remodelamento envolve mudanças na condução elétrica, resultando em uma maior predisposição a arritmias cardíacas potencialmente fatais, como fibrilação ventricular e taquicardia ventricular. A cocaína interfere com os canais iônicos, especialmente os canais para sódio e potássio, prolongando o intervalo QT e exacerbando a heterogeneidade da repolarização ventricular (PRZYWARA; DAMBACH, 1989). Essas alterações podem levar a distúrbios elétricos que comprometem a sincronização da contração cardíaca, aumentando o risco de morte súbita. Além disso, a exposição crônica à cocaína pode levar à fibrose miocárdica (KIM; PARK, 2019; VERMA; ORME MERVE *et al.*, 2021), o que contribui ainda mais para as irregularidades na condução elétrica, reforçando o perigo de arritmias em usuários crônicos da droga. Portanto, o uso prolongado de cocaína é particularmente prejudicial ao sistema cardiovascular pelas profundas

alterações elétricas que impõe ao coração. Outro ponto preocupante está correlacionado com os efeitos morfológicos e funcionais.

Dentro dos padrões de remodelamento morfológico cardíaco, dois tipos de remodelamento hipertrófico ventricular esquerdo (RHVE) patológico se destacam: o RHVE excêntrico e o concêntrico (SEFEROVIC; PAULUS, 2015), como descrito na **Figura 3**. O RHVE excêntrico caracteriza-se pelo aumento da massa ventricular esquerda, acompanhada por diminuição da espessura média relativa da parede ventricular esquerda (GANAU; DEVEREUX *et al.*, 1992). Por outro lado, o RHVE concêntrico caracteriza-se pelo aumento da massa ventricular esquerda, acompanhada por aumento da espessura média relativa da parede ventricular esquerda (GANAU; DEVEREUX *et al.*, 1992). Em termos microscópicos, os fenótipos concêntrico e excêntrico se diferenciam quanto ao padrão de hipertrofia de cardiomiócitos. Enquanto a hipertrofia concêntrica é tipicamente caracterizada pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, com adição sobreposta de sarcômeros, a hipertrofia excêntrica caracteriza-se pelo alongamento celular, com a adição de sarcômeros em série (KEHAT; DAVIS *et al.*, 2011; KEHAT; MOKKENTIN, 2010).

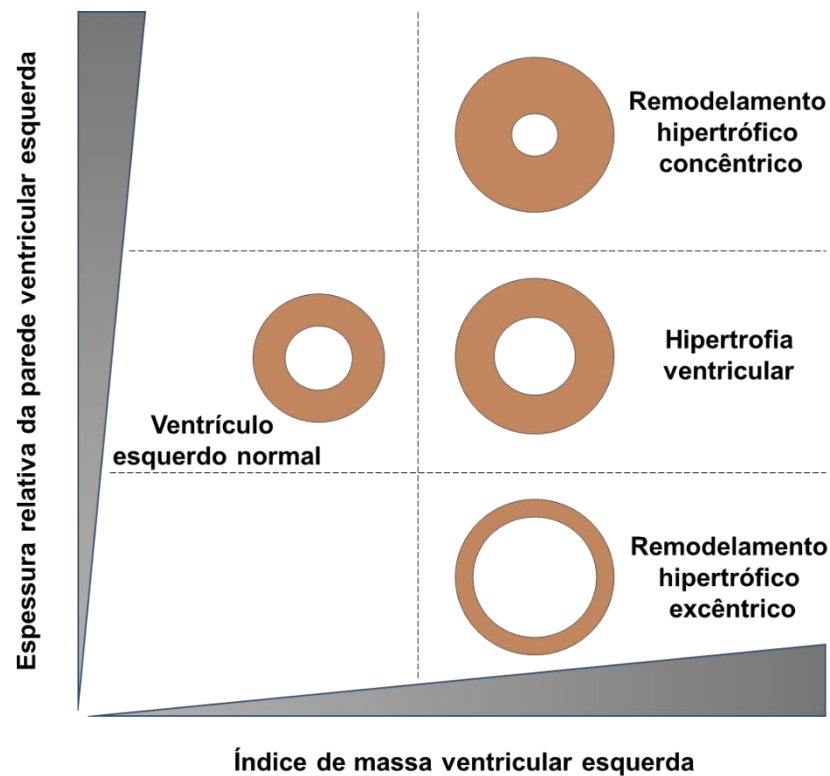


Figura 3: Padrões de remodelamento cardíaco de acordo com a espessura relativa da parede ventricular esquerda e o índice de massa ventricular esquerda.

Os efeitos hemodinâmicos induzidos pela cocaína, como a vasoconstrição coronariana e o aumento da pressão arterial, geram uma sobrecarga significativa ao coração, conduzindo à disfunção e remodelamento cardíacos. Esse processo, especialmente prevalente em usuários crônicos de cocaína, resulta predominantemente em RHVE concêntrico (MACEIRA; RIPOLL *et al.*, 2014). O RHVE excêntrico, embora menos comum, pode ocorrer em situações de cardiomiopatia dilatada associada ao uso de cocaína (MACEIRA; RIPOLL *et al.*, 2014), onde há dilatação ventricular concomitante com hipertrofia. Um estudo com americanos demonstrou clara relação entre RHVE excêntrico com disfunção sistólica, enquanto o RHVE concêntrico estava fortemente conectado à disfunção diastólica (FOX; TAYLOR *et al.*, 2007). Além disso, o estudo de Framingham apontou que a hipertrofia ventricular esquerda, por si, é um importante preditor de insuficiência cardíaca (IC) (LEVY; ANDERSON *et al.*, 1987). É reforçada, portanto, a conexão entre morfologia e função cardíaca, realçando que as alterações estruturais explicam, em partes, a disfunção cardíaca por abuso de cocaína.

Em termos de função cardiovascular e hemodinâmica, já foi demonstrado o aumento da resistência vascular periférica e da probabilidade de hipertensão arterial aguda e crônica secundária à cocaína (SCHWARTZ; REZKALLA *et al.*, 2010). Além disso, o remodelamento arterial (KOZOR; GRIEVE *et al.*, 2014) também é observado, especialmente nas artérias coronarianas, nas quais a cocaína causa ativação de caspases, leva à apoptose e contribui para a isquemia miocárdica e, eventualmente, para o IAM (HE; XIAO *et al.*, 2000). Em termos hemodinâmicos, a cocaína atua predominantemente por meio da hiper estimulação do sistema nervoso simpático, promovendo uma liberação exacerbada de catecolaminas, especialmente noradrenalina e adrenalina. Essa descarga catecolaminérgica massiva resulta em uma vasoconstrição periférica intensa (KAUFMAN; LEVIN *et al.*, 1998), elevando drasticamente a resistência vascular sistêmica e, conseqüentemente, a pressão arterial. Este aumento na pós-carga cardíaca impõe um estresse ao miocárdio, que é forçado a operar sob condições de elevada demanda energética, potencializando o risco de isquemia, particularmente em indivíduos com aterosclerose preexistente (PITTS; VONGPATANASIN *et al.*, 1998).

A cocaína também induz uma resposta cronotrópica positiva pronunciada, acelerando a frequência e aumentando o débito cardíaco, o que aumenta o consumo

de oxigênio pelo miocárdio (MEHTA; JAIN *et al.*, 2003). Esse estado de hiper dinamismo pode descompensar rapidamente o balanço entre a oferta e a demanda de oxigênio, precipitando episódios de isquemia miocárdica ou arritmias, mesmo na ausência de lesões coronarianas obstrutivas significativas (HOFFMAN, 2010). A droga também provoca vasoconstrição das artérias coronárias (KAUFMAN; LEVIN *et al.*, 1998), contribuindo para o desenvolvimento de angina, IAM, e morte cardíaca súbita. A exposição crônica à cocaína promove um remodelamento adverso da vasculatura coronariana (SU; LI *et al.*, 2004), com dissecção espontânea da artéria coronária (STEINHAUER; CAULFIELD, 2001), enfraquecimento da parede ocasionado por apoptose (SU; LI *et al.*, 2004), resultando em microangiopatia e comprometimento da perfusão miocárdica. Esse quadro hemodinâmico alterado, associado às complexas alterações eletrofisiológicas induzidas pela cocaína, configura um cenário de alto risco para a ocorrência de eventos cardiovasculares catastróficos, refletindo o impacto devastador e multifacetado da droga sobre o sistema cardiovascular.

1.5. A teoria do mecanismo inflamatório das doenças cardiovasculares e a cocaína

Segundo a teoria do mecanismo inflamatório, as células, citocinas e outros fatores inflamatórios contribuem para desencadeamento e progressão de doenças cardiovasculares (BOMFIM; CAU *et al.*, 2019). A ativação do inflamassoma NLRP3 participa do dano cardíaco e vascular (CAU; BRUDER-NASCIMENTO *et al.*, 2021; SOKOLOVA; SJAASTAD *et al.*, 2019), sendo essencial para a ativação de citocinas pró-inflamatórias, amplificação da resposta imune inata e para desencadear morte celular programada por meio de piroptose (DE MIGUEL; PELEGRIN *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, a ativação do inflamassoma NLRP3 depende de dois sinais associados a Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) ou Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) (SHARMA; TATE *et al.*, 2018), como evidenciado na **Figura 4**. O sinal 1 ativa o fator nuclear κB , NF- κB , e a transcrição de pró-citocinas, como a pró-IL1- β e a pró-IL-18, bem como a transcrição de novos receptores NLRP3. A cocaína, por sua vez, ativa NF- κB e desencadeia sua cascata intracelular a jusante (LEPSCH; MUNHOZ *et al.*, 2009). O sinal 2, por outro lado, ativa o receptor NLRP3 por diferentes agentes, como cristais de ácido úrico, efluxo de potássio ou por espécies reativas de oxigênio (EROs) e tem, por consequência, a junção do complexo multiproteico formado pela proteína receptora (NLRP3), uma

proteína ancoradora (ASC-1) e uma proteína com atividade enzimática (pró-caspase-1), formando o inflamassoma. A cocaína, também, aumenta a produção de EROs (FAN; SAWBRIDGE *et al.*, 2009). A junção de tais proteínas, com formação do inflamassoma NLRP3, por sua vez, desencadeia a ativação de caspase-1, que cliva as pró-citocinas e a pró-gasdermina-D, tornando-as proteínas ativas (TOLDO; MEZZAROMA *et al.*, 2022). A gasdermina-D cria poros na membrana celular, aumentando sua permeabilidade e, por consequência, levando ao processo de morte celular programada conhecida como piroptose. Estes poros também permitem a liberação das citocinas pró-inflamatórias ativas, IL-1- β e IL-18, possibilitando a ação destas de forma autócrina ou parácrina, amplificando a ação pró-inflamatória (JI; QI *et al.*, 2021).

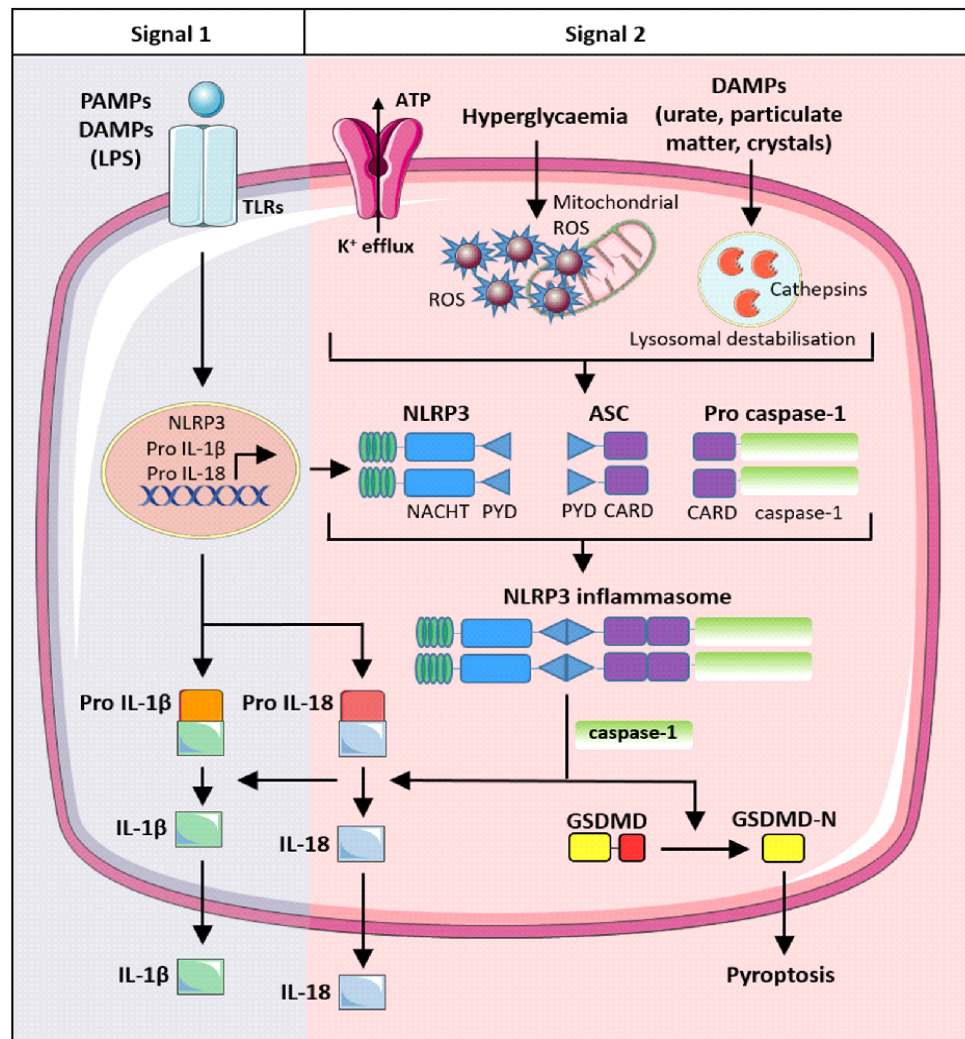


Figura 4: Esquema ilustrativo da ativação do inflamassoma NLRP3. O sinal 1 é gerado pela interação de PAMPs e DAMPs com os TLRs, resultando na ativação da via NF- κ B, que induz a transcrição de genes como NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18. O sinal 2, desencadeado por diversos estímulos, como efluxo de K⁺, hiperglicemia, ROS mitocondriais, e desestabilização lisossômica, promove a montagem do inflamassoma NLRP3. Há formação do complexo inflamassoma a partir do recrutamento de ASC e pró-caspase-1. A caspase-1 ativa faz clivagem e ativação de IL-1 β e IL-18, além da formação de GSDMD-N, que induz a piroptose celular. Fonte: Adaptado de SHARMA; TATE et al. (2018).

Embora a maioria dos estudos sobre o impacto da cocaína sobre o sistema cardiovascular se concentre nos efeitos de usos prolongados em pacientes adictos à droga, a maior parte das pesquisas sobre os mecanismos subjacentes privilegia o efeito agudo ou imediato do abuso da droga. DU; PARK *et al.* (2021), demonstraram que o bloqueio prévio dos canais de Ca²⁺ do tipo L pode prevenir os efeitos vasoconstritores e neurotóxicos imediatos da cocaína no córtex pré-frontal. A administração aguda de cocaína provoca a geração de EROs e a ativação do fator de transcrição NF- κ B em células cardíacas (HARGRAVE; TIANGCO *et al.*, 2003). Por fim, DUYSEN; LI *et al.* (2008) observaram que, 12 horas após a administração de uma

única dose alta de cocaína por via intraperitoneal, o débito cardíaco e a FC estavam reduzidos, evidenciando os efeitos agudos da cocaína sobre a sinalização celular e seu impacto direto na função cardíaca.

Contudo, poucos estudos integram mecanismos e modelos de curta exposição à cocaína. Entre os modelos existentes, destacam-se os que envolvem a administração crônica de cocaína em roedores, permitindo a observação dos efeitos hemodinâmicos, elétricos e estruturais no coração. No entanto, a maioria desses modelos foca em estágios avançados do impacto da cocaína sobre o coração, com 12 a 15 dias de tratamento com doses elevadas (~30mg/kg), refletindo os danos decorrentes do uso crônico da droga (KRUEGER; HOWELL *et al.*, 2009; LADRON DE GUEVARA-MIRANDA; MILLON *et al.*, 2017; WANG; REN *et al.*, 2001). WANG; REN *et al.* (2001), por exemplo, demonstraram que 15 dias de cocaína (10 mg/kg, 30 mg/kg ou 60 mg/kg) são suficientes para causar insuficiência cardíaca em camundongos BALB/c. Poucos modelos, de fato, investigam o início dos eventos cardiodeletérios, especialmente aqueles associados à ativação do sistema imune inato e à inflamação. CHIVERO; THANGARAJ *et al.* (2021) demonstraram que existe intensa ativação microglial e neuroinflamação em apenas sete dias de cocaína e que a prevenção dos efeitos negativos da cocaína sobre o sistema nervoso central é possível via inibição do inflamassoma NLRP3 com MCC950 (CHIVERO; THANGARAJ *et al.*, 2021). A compreensão dos mecanismos iniciais, particularmente os que envolvem o inflamassoma NLRP3 e outras respostas inflamatórias, permanece limitada, sublinhando a necessidade de modelos que explorem esses aspectos precocemente no curso da doença cardíaca induzida pela cocaína.

Em termos de mecanismo, foi demonstrado que a cocaína ativa NF- κ B (LEPSCH; MUNHOZ *et al.*, 2009) e aumenta a formação de EROs em vasos (ZHU; WANG *et al.*, 2018) e em cardiomiócitos (FAN; SAWBRIDGE *et al.*, 2009), sendo estes potenciais ativadores do sinal 1 e do sinal 2, respectivamente, do inflamassoma NLRP3. Assim, nossa hipótese é que a exposição à cocaína ativa o inflamassoma NLRP3 no coração, por consequência, causa danos cardíacos significativos, mesmo em dose moderada e em período relativamente curto de administração.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral é verificar se o inflamassoma NLRP3 participa das alterações morfológicas e funcionais cardíacas causadas pela cocaína em dose moderada.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Verificar as ações de curto e médio prazo da cocaína, caracterizando os efeitos sobre hipertrofia, remodelamento cardíaco e pressão arterial sistólica;
- 2) Caracterizar as alterações cardiorrenais causadas por dose moderada de cocaína;
- 3) Verificar se a inibição farmacológica do inflamassoma NLRP3 previne as alterações cardíacas provocadas pela cocaína;
- 4) Confirmar, por meio da deleção genética, a participação do complexo proteico inflamassoma NLRP3 nos danos cardíacos e pró-oxidativos causados pela cocaína;
- 5) Verificar se ações da cocaína são mediadas pelos receptores adrenérgicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais, delineamentos experimentais e tratamentos

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, CEUA, por meio do protocolo 205/2021. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e sob regime claro/escuro de 12 horas cada, recebendo água e ração *ad libitum*. Para avaliar o papel do inflamassoma NLRP3 no dano cardíaco induzido pela cocaína, camundongos C57BL/6 machos foram divididos em cinco protocolos e tratados, assim como descrito adiante, uma vez ao dia com cada droga, durante o período de vigília (noite). Todos os tratamentos farmacológicos foram realizados 3 horas antes do desafio com cocaína e os experimentos realizados 12 horas após a administração final de cada tratamento. A dose de 15 mg/kg de cocaína foi escolhida por ser a maior dose abaixo da quantidade mínima conhecida para elevar a pressão arterial sistêmica (ZHU; WANG *et al.*, 2018), apresentando efeitos negativos para o coração, como a redução aguda da função (KLONER; HALE *et al.*, 1992) e da FC (RUTH; ULLMAN *et al.*, 1988), além de pior recuperação em casos de isquemia e reperfusão (BAE; GILBERT *et al.*, 2005).

Foram definidos, portanto, cinco protocolos experimentais (**Figura 5**). No **Protocolo 1**, foi realizada a comparação dos efeitos de curto prazo (5 dias) e médio prazo (15 dias) da exposição à cocaína, dividindo os camundongos em quatro grupos: Controle 5 dias (salina 0,9%, i.p.), Cocaína 5 dias (15 mg/kg, i.p.), Controle 15 dias (salina 0,9%, i.p.) e Cocaína 15 dias (15 mg/kg, i.p.).

O **Protocolo 2** consistiu na caracterização dos impactos da cocaína no coração após 5 dias de administração, dividindo os animais em dois grupos: Controle (salina 0,9%, i.p.) e Cocaína (15 mg/kg, i.p.).

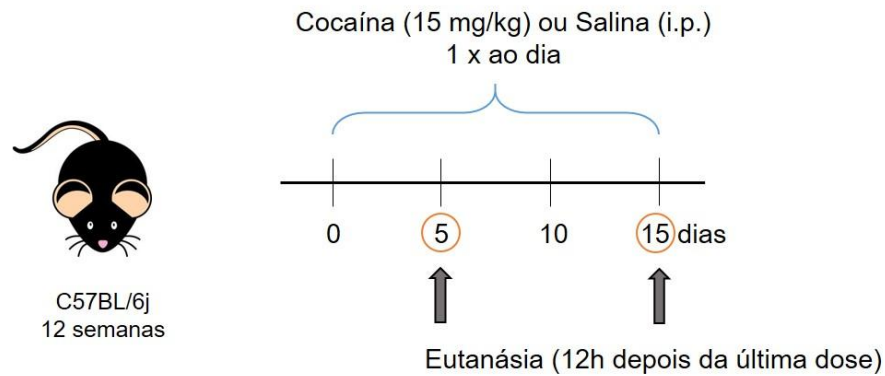
No **Protocolo 3**, foi investigada a inibição farmacológica do inflamassoma NLRP3 por 5 dias de administração de cocaína. Para isso, foram constituídos os grupos: Controle (salina 0,9%, i.p.), Cocaína (15 mg/kg, i.p.), CocaMCC (MCC950 20 mg/kg, i.p.; cocaína 15 mg/kg, i.p.) e CocaGlib (glibenclamida 20 mg/kg, p.o.; cocaína 15 mg/kg, i.p.). As drogas MCC950 e glibenclamida foram escolhidas como estratégia farmacológica de inibição do inflamassoma NLRP3 por serem sulfonilureias classicamente capazes de diminuir a ativação do inflamassoma NLRP3, sendo o MCC950 um composto derivado da glibenclamida e um antagonista seletivo do

receptor NLRP3 (DUAN; SUN *et al.*, 2023). O MCC950 se liga diretamente ao domínio NACHT do NLRP3 por meio de uma interação não covalente de alta afinidade e bloqueia a hidrólise de ATP mediada pelo NLRP3 (COLL; HILL *et al.*, 2019).

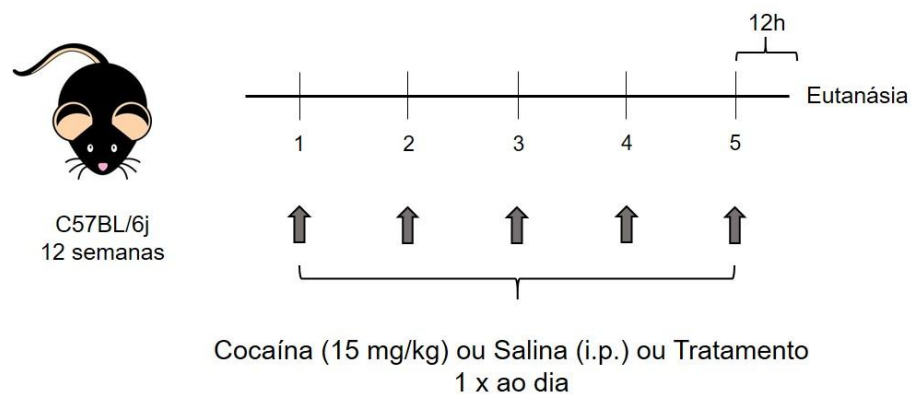
O **Protocolo 4** avaliou o papel das proteínas NLRP3 e caspase-1 na resposta ao tratamento com cocaína, utilizando camundongos *Wild-type* (Wt) e nocautes (KO) para os genes relacionados às proteínas NLRP3 (NLRP3 KO) e caspase-1 (Casp-1 KO), tratados com solução salina ou cocaína por 5 dias. Os grupos incluíram: Wt Salina (0,9%, i.p.), Wt Cocaína (15 mg/kg, i.p.), Casp-1 KO Salina (0,9%, i.p.), Casp-1 KO Cocaína (15 mg/kg, i.p.), NLRP3 KO Salina (0,9%, i.p.) e NLRP3 KO Cocaína (15 mg/kg, i.p.). Animais fêmeas também foram avaliadas quanto à hipertrofia cardíaca.

Por fim, o **Protocolo 5** investigou o envolvimento dos receptores adrenérgicos no dano cardíaco causado pela cocaína e foi constituído dos seguintes grupos: Controle (Salina 0,9%, i.p.), Cocaína (15 mg/kg, i.p.) e CocaCarv (Carvedilol 20 mg/kg, i.p.; cocaína 15 mg/kg, i.p.). Como conceito, o Carvedilol foi escolhido por ser um antagonista misto dos receptores β_1 , β_2 e α_1 -adrenérgicos.

CEUA: 205/2021

**Protocolo 1 - grupos:**

1. Controle 05 dias (Salina 0,9%, i.p.)
2. Cocaína 05 dias (15 mg/kg, i.p.)
3. Controle 15 dias (Salina 0,9%, i.p.)
4. Cocaína 15 dias (15 mg/kg, i.p.)

**Protocolo 2 - grupos:**

1. Controle (Salina 0,9%, i.p.)
2. Cocaína (15 mg/kg, i.p.)

Protocolo 3 - grupos:

1. Controle (Salina 0,9%, i.p.)
2. Cocaína (15 mg/kg, i.p.)
3. CocaMCC (MCC950 20 mg/kg, i.p.; cocaína 15 mg/kg, i.p.)
4. CocaGlib (Glibenclamida 20 mg/kg, p.o.; cocaína 15 mg/kg, i.p.)

Protocolo 4 - grupos:

1. Wt Salina (0,9%, i.p.)
2. Wt Cocaína (15 mg/kg, i.p.)
3. CASP-1 KO Salina (0,9%, i.p.)
4. CASP-1 KO Cocaína (15 mg/kg, i.p.)
5. NLRP3 KO Salina (0,9%, i.p.)
6. NLRP3 KO Cocaína (15 mg/kg, i.p.)

Protocolo 5 - grupos:

1. Controle (Salina 0,9%, i.p.)
2. Cocaína (15 mg/kg, i.p.)
3. CocaCarv (Carvedilol 20 mg/kg, i.p.; cocaína 15 mg/kg, i.p.)

Figura 5: Delineamentos experimentais, conforme o objetivo testado.

3.2. Pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) não-invasiva foi aferida por pletismografia de cauda com sistema CODA, "Software" versão 4.1. O sistema CODA afere a pressão arterial através da variação de volume da cauda do animal, reduzindo artefatos provenientes de pigmentação e movimentação do animal. As medidas foram realizadas 24 horas antes da primeira dose de cocaína (Inicial) e a cada 5 dias, por 15 dias. No mínimo três medidas foram feitas para cada animal por seção e os resultados foram expressos pela média aritmética destas três medidas.

3.3. Eletrocardiografia

O procedimento foi realizado assim como descrito por Santos-Miranda et al. (2021) (SANTOS-MIRANDA; COSTA *et al.*, 2021). Brevemente, a análise de eletrocardiograma (ECG) *in vivo* foi realizada usando um aparelho de eletrocardiografia não-invasiva (ECG-PC versão 2,07, TEB, Brasil), por 5 minutos, com camundongos sedados com 1,5% isoflurana. Dados foram coletados em derivação DII, a 50 mm/s e 2N de amplificação e os valores de FC, duração da onda P, intervalo PR (PRi), tempo de QRS, tempo de QT e QT corrigido [QTc(n)-B], segundo fórmula de Bazett, foram analisados.

Fórmula de Bazett:

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

Valor calculado:

$$QTc(n) - B = 1/n \sum_{i=1}^n \frac{QT_i}{\sqrt{RR_i}}$$

Onde "QT" é o intervalo QT medido no ECG, que representa o tempo entre o início da despolarização ventricular (começo do complexo QRS) e o final da repolarização

ventricular (final da onda T), e "RR" é o intervalo de tempo entre dois batimentos cardíacos consecutivos, ou seja, o tempo entre dois complexos QRS sucessivos (normalmente medido de um pico R ao próximo pico R).

3.4. Determinação dos níveis de creatinina para avaliação da função renal

A dosagem de creatinina foi realizada em amostras de soro obtidas a partir do sangue total coletado dos camundongos. O aumento de creatinina sérica foi usado como marcador da função renal. O ensaio bioquímico tradicional foi adaptado para placas de 96 poços. Após a coleta, o sangue foi centrifugado para obtenção do soro, sendo 10 µL/amostra utilizados para o ensaio. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos e, posteriormente, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 510 nm. As concentrações de creatinina foram determinadas a partir de uma curva padrão gerada com os padrões fornecidos pelo fabricante, sendo os resultados expressos em mg/dL.

3.5. Análise de função cardíaca *ex vivo*

Para avaliar a função cardíaca *ex vivo*, foi utilizada a técnica de perfusão retrógrada, com fluxo constante, assim como descrito por BRUNO; CASTOR *et al.* (2023) e representado no esquema da **Figura 6**. O coração foi retirado do organismo e conectado a um sistema de perfusão com uma solução nutritora : NaCl 113,00 mmol/L, KCl 4,70 mmol/L, KH₂PO₄ 1,10 mmol/L, MgCl₂.6H₂O 1,10 mmol/L, NaHCO₃ 22,00 mmol/L, glicose 11,00 mmol/L, CaCl₂ 1,35 mmol/L). Para isso, os animais foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após aplicação de heparina (1000 UI/kg; i.p.) (NOLY; NAIK *et al.*, 2022). Após a abertura da cavidade torácica, os corações foram retirados e colocados em uma placa de Petri contendo solução nutritora em temperatura de aproximadamente 4 °C. Os outros tecidos que acompanhavam o coração durante a remoção foram removidos e, posteriormente, descartados. Em seguida, a aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão que leva a solução nutritora às artérias coronarianas. O tempo dessa preparação foi cerca de 5 minutos. Os corações que excederam esse tempo na preparação foram descartados. Os corações foram perfundidos com solução

nutritiva, gaseificada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), com fluxo constante de 2,5 mL/min, pressão de perfusão aproximada de 90mmHg e temperatura de 36,5°C. Para analisar os parâmetros de contratilidade, o átrio esquerdo foi retirado e um balão de látex conectado a um transdutor de pressão foi introduzido até a câmara do ventrículo esquerdo. Após introduzido, o balão foi inflado até atingir uma pressão de 5-10 mmHg para captar a contratilidade do miocárdio. Cerca de 30 minutos de estabilização foram esperados e, então, os valores basais de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), FC e os índices de contratilidade máximos (dP/dt_{max}) e mínimos (dP/dt_{min}) registrados pelo transdutor de pressão acoplado ao balão inserido na câmara ventricular esquerda. Em seguida, desafios com doses crescentes de isoprenalina (10⁻¹⁰ a 10⁻⁵ mol/L) ou com deslanosídeo (10⁻¹⁰ mol/L) foram realizados e os valores registrados. Os registros foram realizados através do software AQCAD 2.2.4 e interpretados através do software ANCAD.

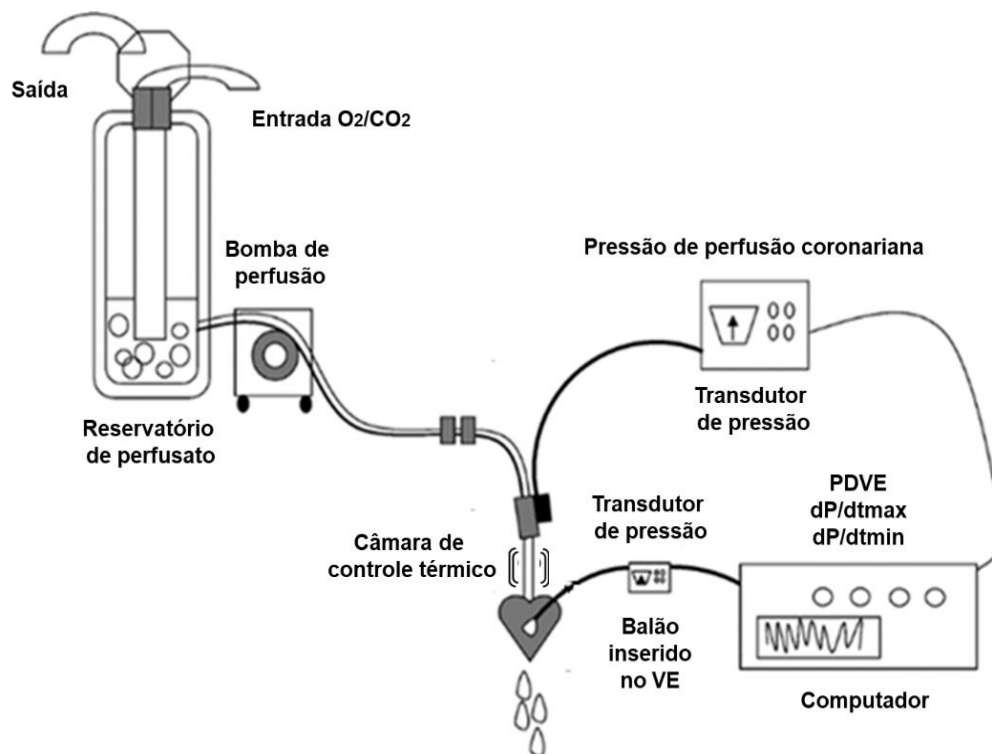


Figura 6: Representação esquemática do sistema de perfusão e parâmetros analisados durante a técnica de verificação da função cardíaca ex vivo. dP/dt_{max}, derivada máxima da pressão pela derivada do tempo; dP/dt_{min}, derivada mínima da pressão pela derivada; PDVE, pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo; VE, ventrículo esquerdo. Imagem adaptada de SKRZYPIEC-SPRING; GROTHUS *et al.* (2007).

3.6. Preparo do rim, coração e cardiomiócitos isolados

Animais que não passaram pela análise de função cardíaca *ex vivo*, tiveram seus rins, corações e cardiomiócitos coletados, para análises subsequentes. Após eutanásia por decapitação, uma toracotomia foi realizada e o coração retirado imediatamente antes que este parasse de bater. O rim direito foi imediatamente retirado, cortado longitudinalmente e armazenado em reagente conservante criogênico (*Optimum compound temperature reagent* – OCT), em freezer -70 °C, para posterior análise. Para os testes histológicos, bioquímicos e moleculares, o coração, ao ser retirado, foi rapidamente colocado em uma solução hipercalêmica (KCl 150 mmol/L) para que ele parasse em diástole. O coração foi pesado e um corte transversal foi feito, separando o coração em duas partes: base e ápice. O ápice do ventrículo direito foi descartado. O ápice do ventrículo esquerdo foi guardado diretamente em freezer (-70 °C) ou armazenado em OCT, para análises de fluorescência. Por fim, a base dos corações foi submersa em paraformaldeído (4% em tampão fosfato-salina - PBS) por 24h em temperatura ambiente e, então, transferidos para etanol (70%), até que ela fosse emblocada em parafina e processada para subsequente produção de lâminas histológicas, assim como descrito em próxima seção.

Para análise bioquímica e funcional de cardiomiócitos, corações foram isolados pela técnica de perfusão retrógrada e rapidamente retirados, assim como descrito no módulo anterior. Entretanto, foram perfundidos, por 15 minutos, com uma solução Tyrode [(em mmol/L) 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glicose (pH 7,4)] livre de Ca²⁺ contendo collagenase do tipo 2 (1 mg/mL). Em seguida, os métodos de digestão mecânica e filtração foram aplicados diretamente sobre a câmara ventricular esquerda, para análise direcionada. O Ca²⁺ extracelular foi gradualmente repostado, até atingir a concentração de 500 µM. Ao final do procedimento, cardiomiócitos foram mantidos em solução do tipo Tyrode.

3.6.1. Preparação histopatológica cardíaca

Para a confecção das lâminas, as bases dos corações passaram por desidratação, realizada através de passagens subsequentes em diferentes concentrações de etanol (80%, 90%, absoluto 1, 2 e 3 – 30 minutos cada);

diafanização com xilol (1, 2 e 3 – 20 minutos cada) e embebidos em parafina líquida (Paraplast Sigma) 1, 2 e 3 – 20 minutos cada. Os corações foram, então, incluídos em formas contendo a parafina líquida, onde permaneceram por 3 horas a temperatura ambiente. Para a análise histológica, cortes transversais dos tecidos emblocados (espessura de 5 μ m) foram feitos em micrótomo exatamente na região central do coração, e apenas os 5 primeiros cortes foram utilizados para análise morfométrica. Por fim, as lâminas foram desparafinizadas (xilol 1, 2 e 3 – 20 minutos e álcool absoluto 1, 2 e 3, 90%, 80% e 70% - 2 minutos cada) e coradas com hematoxilina (40 segundos) e eosina (1 minuto) (HE) ou Picrosirius. Seções transversais do ventrículo esquerdo coradas com H&E foram escaneadas para medidas morfométricas da área e espessura das paredes, e da área da câmara utilizando o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD, EUA) (BRUNO; CASTOR *et al.*, 2023). As seções coradas com Picrosirius foram observadas e analisadas sob a luz branca, em que 10 imagens foram retiradas com aumento de 400X e analisadas com ImageProPlus.

3.6.1.1. Análise morfométrica cardíaca

A partir da análise do comprimento interno (Ci), comprimento externo (Ce) e área total da estrutura (At), calculou-se a espessura média da parede septal (EPS), ventricular esquerda (EPVe) e direita (EPVd) utilizando-se as fórmulas previamente descritas (BRUNO; CASTOR *et al.*, 2023; CAU; GUIMARAES *et al.*, 2015) e evidenciadas na **Figura 7**. Além disso, a área interna das câmaras ventriculares esquerda (Aive) e direita (Aivd) também foi analisada ao utilizar o programa de imagens ImageJ (NIH – National Institute of Health). Todas as medidas foram retiradas de cortes da porção média do coração.

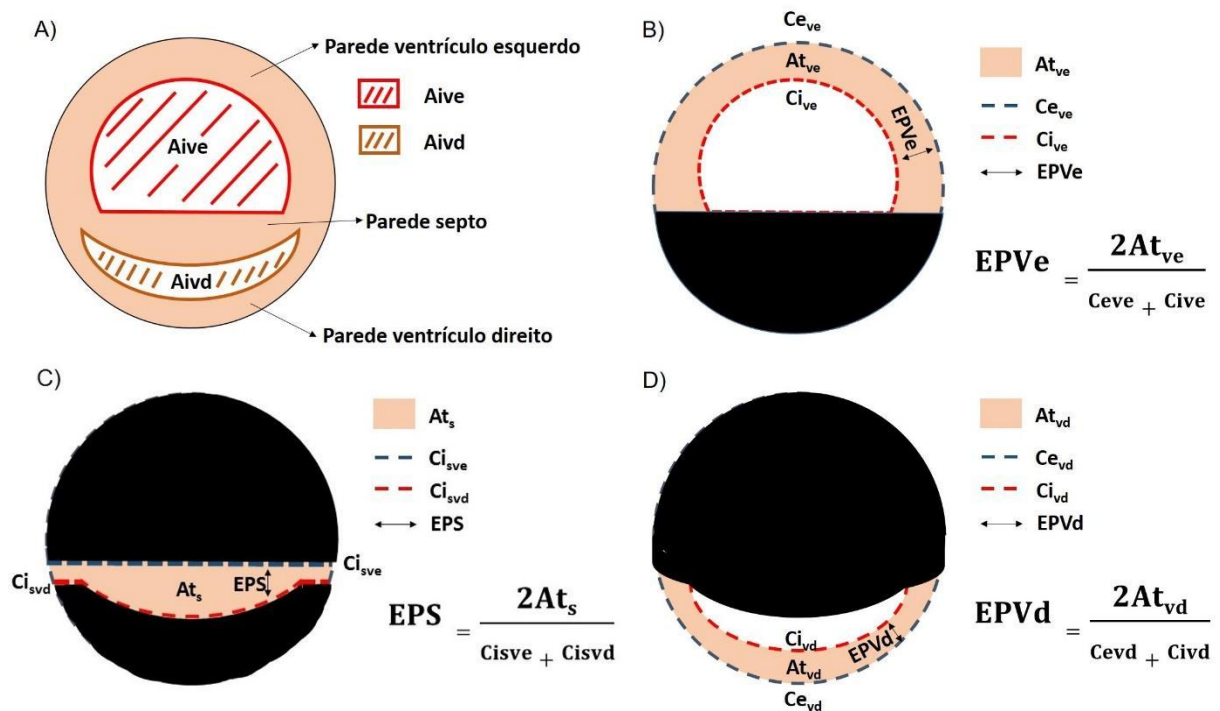


Figura 7: Representação esquemática e cálculo da morfometria cardíaca. Representação da base do coração, vista em um corte transversal, emblocada em parafina e fórmulas de medidas morfométrica utilizadas. A_{ive} = área interna da câmara ventricular esquerda; A_{ivd} = área interna da câmara ventricular direita. $Cive$ = comprimento interno do ventrículo esquerdo; $Civd$ = comprimento interno do ventrículo direito; $Cisve$ = comprimento interno septo-ventricular esquerdo; $Cisvd$ = comprimento interno septo-ventricular direito; $Ceve$ = comprimento externo do ventrículo esquerdo; $Cevd$ = comprimento externo do ventrículo direito; At_{ve} = Área total do ventrículo esquerdo; At_{vd} = Área total do ventrículo direito; At_s = Área total do septo; EPS = espessura média da parede septal; $EPVe$ = espessura média da parede ventricular esquerda; $EPVd$ = espessura média da parede ventricular direita.

3.6.1.2. Diâmetro de cardiomiócitos

As lâminas histológicas coradas em HE foram digitalizadas usando uma microcâmera (Q-Color5, Olympus) acoplada ao microscópio BX53 (Olympus) com auxílio do softwer Q-Capture Pro 7.0. O diâmetro dos cardiomiócitos foi determinado pela distância perpendicular ao eixo longitudinal, entre as membranas celulares que circundam o núcleo. Esta distância, portanto, foi utilizada para a medida de 100 diferentes cardiomiócitos dispostos longitudinalmente com ampliação final de 400x. Medidas das paredes septais e da parede posterior do ventrículo esquerdo foram realizadas. Após a medição, a média aritmética das paredes foi calculada para expressar o valor do diâmetro de cardiomiócitos de cada animal.

3.6.2. Análise de espécies reativas de oxigênio em cardiomiócitos isolados e *in situ*

A sonda fluorescente dihidroetidina [DHE; Biotium (California, EUA)] foi utilizada para detectar a quantidade de EROs em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo e no córtex renal em OCT. Os cortes longitudinais dos tecidos em OCT foram feitos em criostato Leica CM1950 (espessura de 5 μ m). Cardiomiócitos isoladas ou tecidos de rim em lâminas foram, então, lavados usando PBS pH 7.4, depois tratadas com 10 μ mol/L de DHE, por 30 min a 37°C, ao abrigo da luz. Por fim, as estruturas foram lavadas e a leitura realizada. Foi utilizado o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti a 585 nm de excitação e 610 nm de captura da fluorescência emitida. A intensidade de fluorescência vermelha foi determinada usando o software ImageJ.

3.6.3. Análise de ativação do inflamassoma NLRP3 por atividade da caspase-1 em cardiomiócitos isolados e *in situ*

Para determinar a atividade da caspase-1 após a ativação do NLRP3, cardiomiócitos isolados ou cortes transversais dos tecidos cardíacos em OCT feitos em criostato Leica CM1950 (espessura de 5 μ m) e preparados como descrito em (MIRANDA; BRUNO et al., 2024) foram utilizados. Brevemente, as células ou os tecidos foram lavados usando PBS pH 7.4, o substrato falso de caspase-1 marcado com fluorocromo FAM [FLICA, FAM-YVAD-FMK; ImmunoChemistry Technologies, LLC (California, EUA)] foi acrescentado sobre as células ou tecidos, que foram, assim, incubados por 1 h ao abrigo da luz. Em seguida, as estruturas foram lavadas e as imagens foram registradas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti a 493 nm de excitação e 520 nm de captura da fluorescência emitida. A intensidade de fluorescência verde foi determinada usando o software ImageJ.

3.6.4. Análise de enzimas antioxidantes

Parte dos tecidos congelados, de coração e rim, foi triturada em PBS contendo antiproteases para detecção das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona reduzida (GSH) e catalase por métodos colorimétricos.

A determinação da concentração de proteína total foi realizada seguindo o método de Bradford, utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad laboratories, USA). O ânion radical superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), um substrato da SOD, foi gerado pela xantina oxidase e hipoxantina. A solução SOD com atividade conhecida foi usada como padrão (0–0,05 U/mL). A atividade da SOD foi expressa em U/mg de proteína. O GSH e a atividade da catalase também foram avaliados por métodos colorimétricos que se baseiam na degradação do DTNB ou do H_2O_2 pela ação do GSH ou da catalase, respectivamente, e expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína e U/mg de proteína, também respectivamente.

3.6.5. Análise por Western Blotting de proteínas cardíacas

A expressão cardíaca da proteína ATPase transportadora de cálcio do retículo sarcoplasmático 2 (SERCA2a), dos receptores adrenérgicos α -1 e β -1, bem como de HSP90, foi realizada em homogenatos de ventrículos esquerdos pela técnica de Western Blotting. Para isso, as amostras de tecido cardíaco previamente congeladas foram homogeneizadas com tampão RIPA gelado (50 mM Tris HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Deoxicolato, Triton-X-100 1%, cocktail de inibidores de protease (Sigma), inibidores de protease separados (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM) e inibidor de fosfatase (Na_3VO_4 , 1mM) para extração de proteínas total. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 RPM e a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o conteúdo proteico total foi quantificado assim como descrito por Bradford (1976), utilizando solução reagente da Bio-Rad Laboratories, Inc.

Após a quantificação de proteínas totais, as proteínas (30 μg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose por métodos semi-seco por meio de aparelho da Bio-Rad, por 27 minutos, a 400 mA fixos. Em seguida, já com as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose, os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados com TBS-T (Tris 0,02 M, NaCl 0,16 M, Tween 0,1%) + 5% de albumina de soro bovino. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting

Alvo	Diluição	Marca
α 1a Adrenergic Receptor	1:1000	GeneTex (GTX100190)
β 1 Adrenergic Receptor	1:1000	Bioss Antibodies (bs-20177R)
SERCA2a (F-1)	1:2500	Santa Cruz (sc-376235)
HSP90 α & β (F-8)	1:3000	Santa Cruz (sc-13119)
Mouse anti-rabbit IgG-HPR	1:3000	Santa Cruz (sc-2357)
Anti-mouse IgG (Fc specific)-Peroxidase	1:15000	Sigma (A2554)

A incubação do anticorpo primário foi realizada em solução de TBS-T + 1% de BSA durante 18h horas (4°C). Logo depois, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, como descrito também na **Tabela 1**. As bandas foram, então, detectadas através de fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Piscata Way, NJ, EUA). A intensidades das bandas foi quantificada, portanto, através do programa ImageJ (NIH – National Institute of Health), por densitometria óptica.

3.6.6. Análise da expressão gênica para marcadores do inflamassoma

A expressão gênica dos marcadores do inflamassoma, incluindo NLRP3 e IL-1 β foi avaliada por meio de RT-qPCR, utilizando o 18S como gene de referência para normalização. As sequências e concentrações utilizadas dos oligonucleotídeos (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) podem ser observados na **Tabela 2**. Inicialmente, o ventrículo esquerdo foi coletado utilizando tubos nuclease-free e o reagente DNA/RNA Shield (Zymo Research, California, USA). O RNA total foi extraído dos tecidos renais utilizando o Kit Quick-RNA Miniprep Plus (Zymo Research, California, USA), que inclui a etapa de digestão com proteinase K para assegurar a digestão de proteínas, garantindo uma alta pureza do RNA. A concentração e a pureza do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria, considerando a razão de

absorbância A260/280, sendo amostras com razão entre 1,8 e 2,0 caracterizadas adequadas para posterior transcrição reversa. Em seguida, 1 µg de RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™), conforme as recomendações do fabricante, em um volume final de 20 µL. O cDNA sintetizado foi diluído 1:5 em água livre de nucleases antes da amplificação por qPCR.

A reação de qPCR foi realizada em sistema de detecção em tempo real, utilizando o SYBR™ Green Universal Master Mix (Applied Biosystems™), que utiliza o agente intercalante como método de detecção de dupla fita de DNA. As condições de ciclagem incluíram uma etapa inicial de ativação da polimerase a 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. A especificidade dos produtos amplificados foi verificada por meio da análise da curva de dissociação (*melting curve*), garantindo que não houvesse amplificações inespecíficas ou formação de dímeros de primers. A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde os valores de C_t dos genes-alvo foram normalizados pelos valores médios do gene de referência (18S) em cada amostra. Os resultados foram expressos em relação ao grupo controle, com a análise estatística realizada utilizando testes apropriados para comparar as diferenças de expressão entre os grupos experimentais.

Tabela 2: Alvo, sequência e concentração (nM) dos oligonucleotídeos utilizados

Alvo	Sequência 5'-3'	Concentração
NLRP3 For	ATTACCCGCCCCGAGAAAGG	250 nM
NLRP3 Rev	CATGAGTGTGGCTAGATCCAAG	250 nM
IL1-β For	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	250 nM
IL1-β Rev	GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	250 nM
18S For	CGTTCCACCAACTAAGAACG	250 nM
18S Rev	CTCAACACGGGAAACCTCAC	250 nM

3.6.7. Análise de função de cardiomiócitos

A análise de cardiomiócitos foi realizada assim como descrito por ROMAN-CAMPOS; DUARTE *et al.* (2009). Brevemente, a temperatura de 37 °C foi mantida por todo experimento. Os cardiomiócitos foram estimulados por meio de eletrodos de platina com pulsos de voltagem com duração de 5 ms e intensidade de 20 V. A frequência de estimulação foi fixada em 1 Hz. As células foram visualizadas em um monitor de computador com uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, EUA) em modo de varredura parcial. Esta imagem foi usada para medir a fração de encurtamento celular em resposta à estimulação elétrica, usando um sistema de detecção de borda de movimento de vídeo (Ionoptix, Milton, MA, EUA). A imagem da célula foi registrada a 240 Hz. O encurtamento celular foi calculado a partir da saída do detector de borda usando um conversor IonWizard A/D (Ionoptix, Milton, MA, EUA). Os valores de média de 8 a 16 contrações consecutivas foram utilizados para a aquisição e cálculo dos seguintes parâmetros: fração de encurtamento celular (expressa como uma porcentagem do comprimento da célula em repouso) e os tempos até 50% da contração e relaxamento, sendo estes parâmetros obtidos por meio de software desenvolvido por nosso grupo, na plataforma MatLab. Após a análise basal, as células foram estimuladas com isoprenalina (10^{-7} mol/L) ou felinefrina (10^{-7} mol/L), e as medidas de contratilidade foram registradas novamente.

3.6.8. Análise de transiente de cálcio de cardiomiócitos

Miócitos ventriculares adultos dos animais foram isolados e armazenados em meio DMEM (Sigma). Experimentos de imagem de Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) foram realizados em cardiomiócitos carregados com a sonda fluorescente Fluo-4 AM (6 μM ; Invitrogen, Oregon, EUA) por 25 minutos, que foram posteriormente lavados com uma solução extracelular contendo 1,8 mmol/L de Ca^{2+} para remover o excesso de corante. As células foram estimuladas eletricamente a 1 Hz para produzir condições de estado estacionário. A imagem de varredura em linha confocal foi realizada por um microscópio confocal Zeiss LSM 510META (localizado na instalação CAPI-ICB/UFMG), e a análise foi realizada usando o software ImageJ (NIH).

3.7. Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de criação de gráficos estatísticos GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Primeiramente, todos os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para análise de normalidade de distribuição dos dados. Os resultados foram expressos como média seguida de erro padrão da média (média $\pm$ e.p.m.). Além da comparação entre dois grupos por teste t de student, naqueles casos em que havia apenas uma variável, o teste paramétrico “Oneway ANOVA” foi utilizado para análise de variância, seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Dunnett. Para aqueles casos em que havia duas ou mais variáveis, o teste paramétrico “Twoway ANOVA” foi utilizado para análise de variância, seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Resultados onde $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

4. RESULTADOS

4.1. A cocaína causa alterações morfofuncionais cardíacas de curto prazo associadas à produção de espécies reativas de oxigênio e à ativação do inflamassoma NLRP3.

Para determinar o curso temporal das alterações cardíacas, o peso e a morfometria cardíaca foram avaliados em animais tratados com cocaína (15 mg/kg/dia; i.p) por 5 ou 15 dias (**Figura 8A**). Observa-se que a cocaína induziu um aumento no peso cardíaco de camundongos tanto após 5 quanto após 15 dias em comparação aos controles (**Figura 8B**). Esse aumento do peso cardíaco foi associado a um aumento na EPS nos mesmos períodos (**Figura 8C**). Em contraste, a EPVe e a EPVd não apresentaram diferenças entre os grupos Controle e Cocaína em nenhum dos tempos avaliados (**Figuras 8D e 8E**). No que diz respeito às áreas internas das câmaras ventriculares, não foram observadas diferenças na AIVe entre os grupos (**Figura 8F**). No entanto, a AIVd aumentou significativamente após 5 dias de cocaína, uma alteração que não foi observada após 15 dias, sugerindo um remodelamento transitório (**Figura 8G**).

A elevação da pressão arterial é um fator importante para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Porém, a PAS aumentou significativamente apenas após 15 dias de cocaína (**Figura 8H**). Dessa forma, a cocaína promove um remodelamento cardíaco, que é caracterizado por hipertrofia cardíaca e espessamento da parede septal, de forma independente do aumento da pressão arterial.

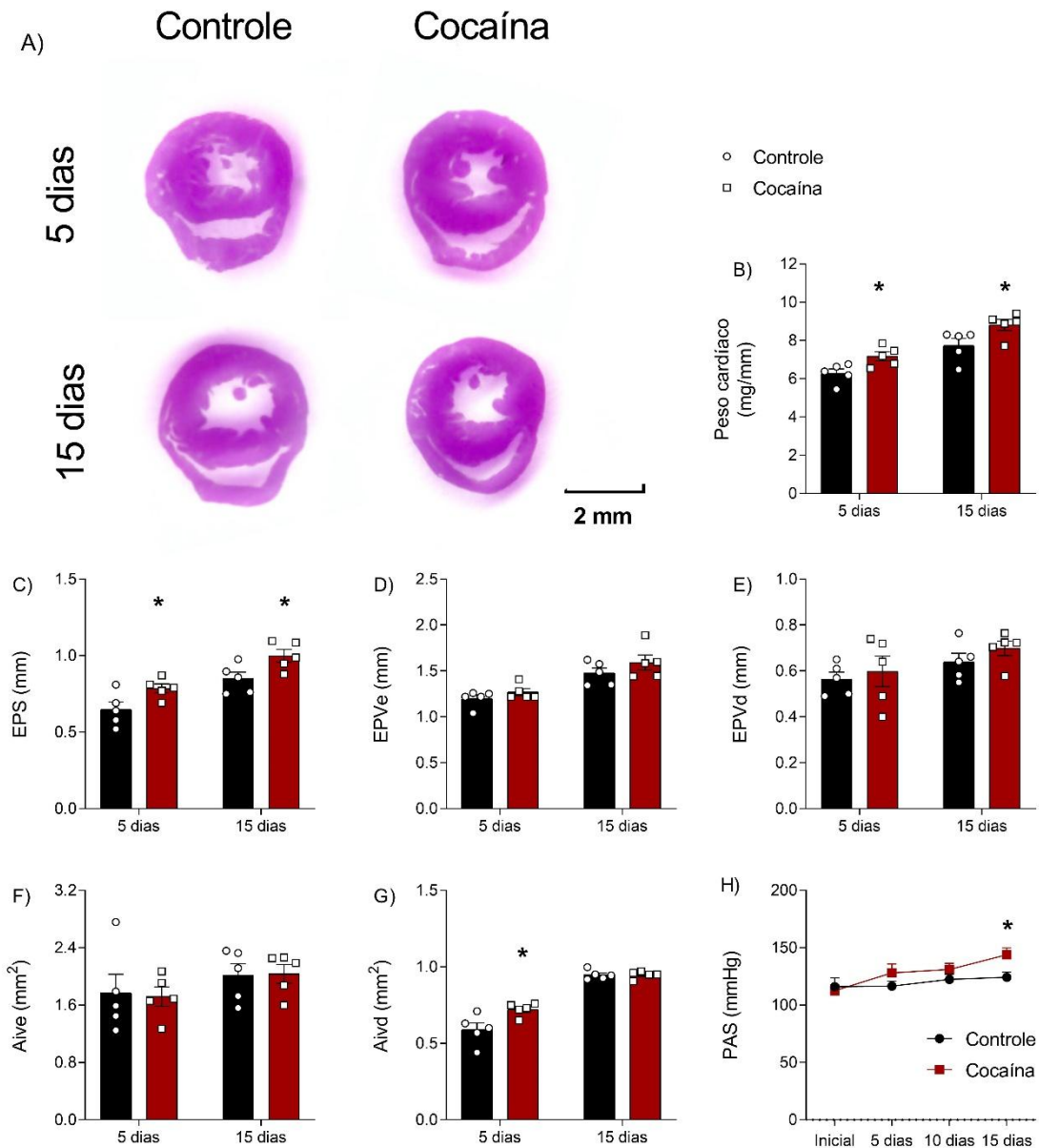


Figura 8: Alterações de curto (5 dias) e médio (15 dias) prazos induzidas por cocaína sobre a estrutura cardíacas e a pressão arterial. Análise morfométrica do coração dos grupos Controle e Cocaína (15 mg/kg) por 5 ou 15 dias: (A) cortes transversais corados com Hematoxilina e Eosina (HE), mostrando as diferenças morfológicas entre os grupos; (B) peso cardíaco, corrigido pelo comprimento da tibia (mg/mm); (C) espessura da parede septal (EPS); (D) espessura da parede ventricular esquerda (EPVe); (E) espessura da parede ventricular direita (EPVd); (F) área interna do ventrículo esquerdo (Aive); (G) área interna do ventrículo direito (Aivd). (H) Pressão arterial sistólica (PAS) não invasiva ao longo de 15 dias de cocaína e nos controles. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média; * $p < 0,05$ vs. Controle, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Para determinar a hipertrofia celular induzida por cocaína, o diâmetro dos cardiomiócitos, em corte longitudinal, das regiões interventricular (septal) e da parede posterior do VE foram determinados separadamente (**Figura 9A**). Observou-se que a

administração de cocaína promoveu aumento do diâmetro dos cardiomiócitos nos dois tempos analisados apenas na parede interventricular (**Figura 9B**).

A análise do diâmetro de cardiomiócitos da parede do VE não revelou diferenças significativas entre os grupos Controle e Cocaína em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 9C**). Estes dados estão em concordância com os dados morfométricos, que mostraram espessamento septal, sem alteração da espessura da parede do VE.

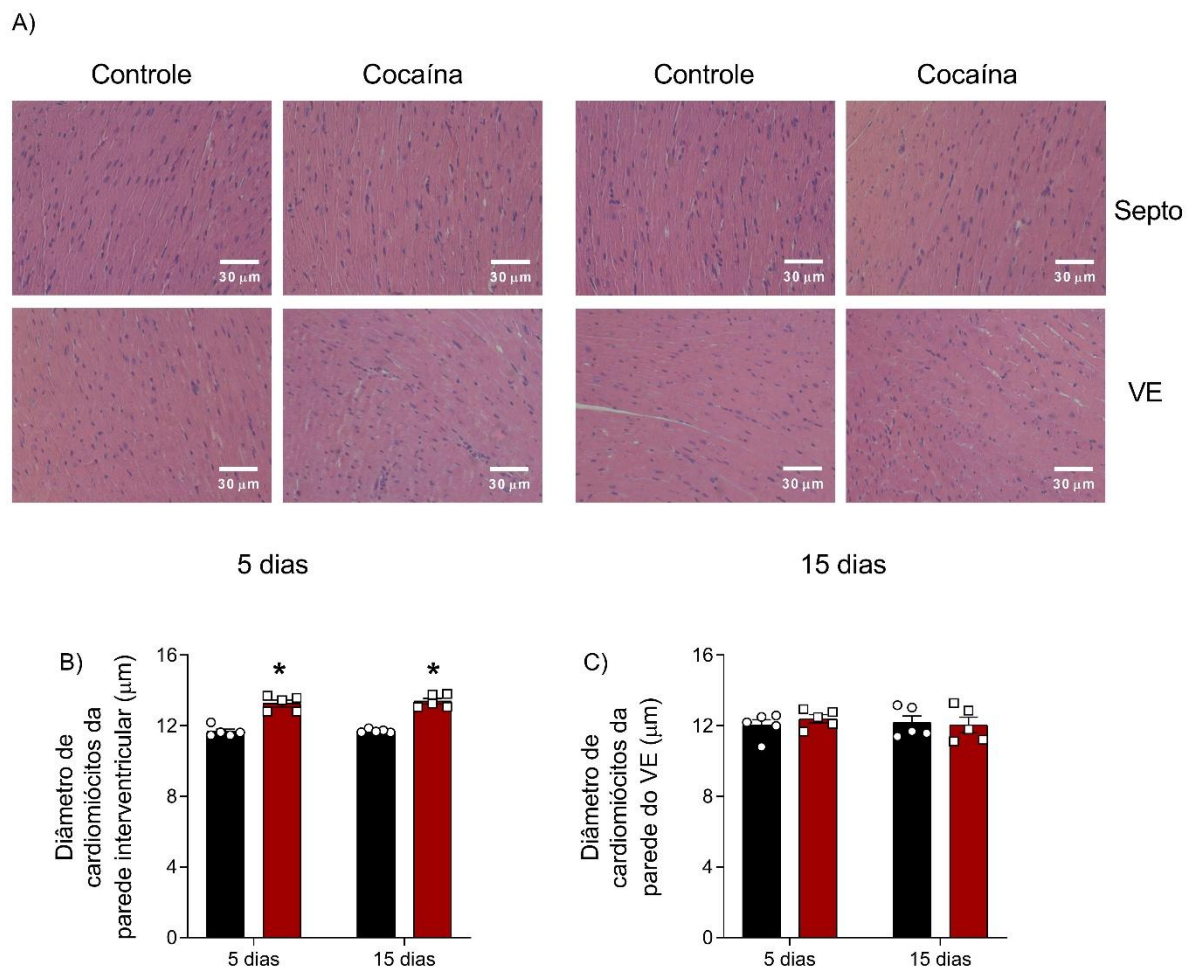


Figura 9: Determinação histológica da hipertrofia de cardiomiócitos após cocaína por 5 e 15 dias. (A) Imagens representativas de cardiomiócitos, dispostos longitudinalmente e corados com HE, captados a 400x, das paredes interventricular e ventricular esquerda (VE) dos diferentes grupos. Diâmetro dos cardiomiócitos da parede interventricular (B) e da parede do ventrículo esquerdo (VE) nos grupos Controle e Cocaína após 5 e 15 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média; * $p < 0,05$ vs. Controle, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Considerando os dados acima, definimos o esquema de doses de 5 dias, no qual as alterações estruturais cardíacas induzidas por cocaína já estão instaladas e de forma independente do aumento da pressão arterial.

Assim, partimos para a caracterização do modelo experimental quanto a alterações renais e cardíacas. Para estudo do dano renal, o balanço oxidativo foi determinado. Em cortes longitudinais da região cortical observou-se um aumento significativo na fluorescência de DHE no grupo Cocaína, indicando maior produção de EROs, em comparação com os animais controles (**Figuras 10A e 10B**). Em relação às enzimas antioxidantes, a cocaína causou redução na atividade da SOD comparado ao grupo Controle (**Figura 10C**). Em contrapartida, a concentração de GSH e a atividade da catalase não mostraram diferenças significativas entre os grupos Controle e Cocaína (**Figuras 10D e 10E**). Assim, conclui-se que há estresse oxidativo renal induzido por cocaína, o que poderia gerar prejuízo da função renal.

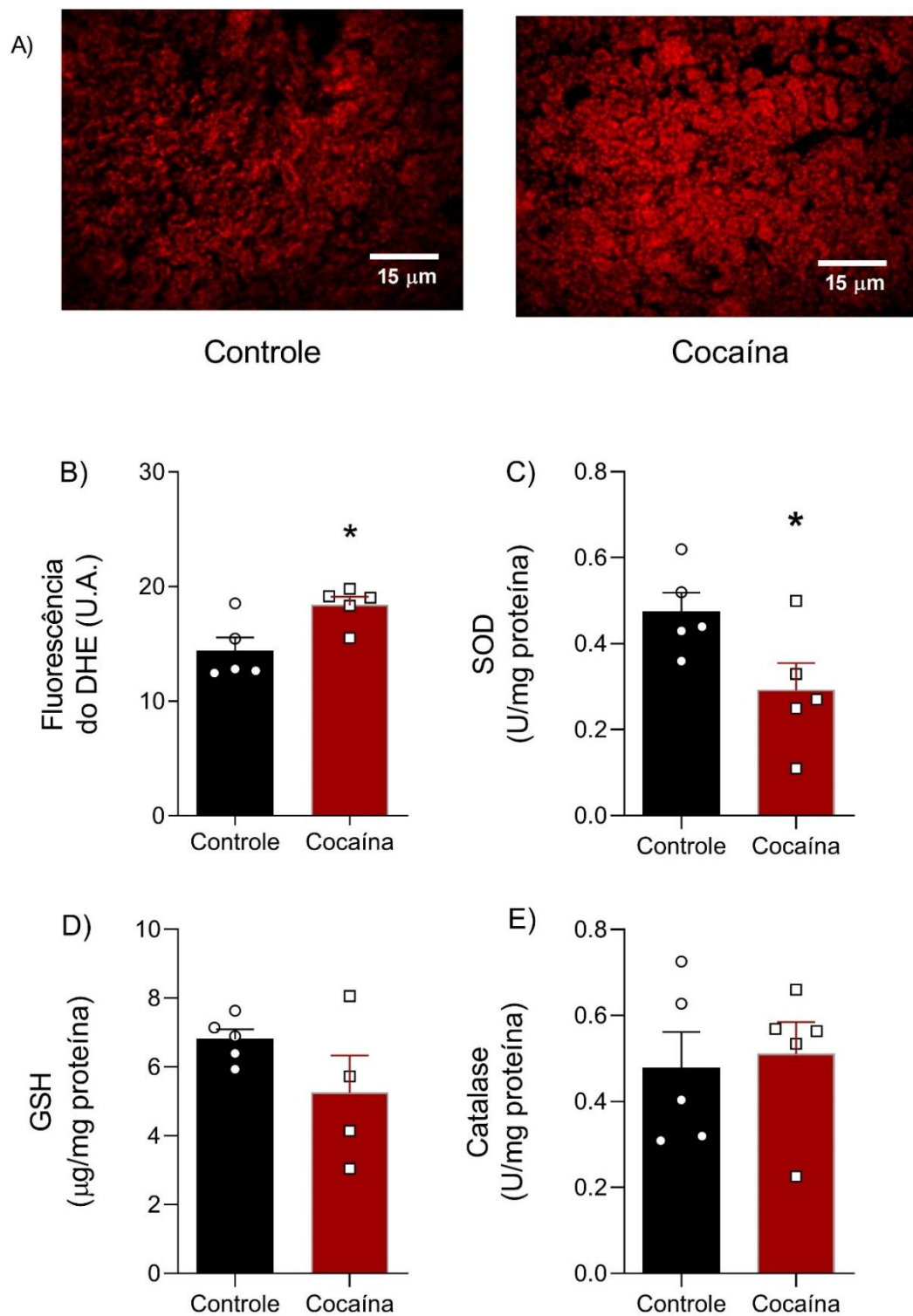


Figura 10: Balanço oxidativo renal após cocaína. (A) Imagens representativas de seções longitudinais de córtex renal marcadas com dihidroetídio (DHE), captados a 400x. (B) Quantificação da fluorescência do DHE (UA: unidades arbitrárias). (C) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). (D) Níveis de glutathiona reduzida (GSH). (E) Atividade da catalase. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média; onde * $p < 0,05$ vs. Controle, analisados por teste t de Student.

Após identificadas as alterações do balanço oxidativo renal, partimos para o estudo cardíaco, onde analisamos a superfície fibrótica. Foi observado que a deposição de matriz extracelular nas paredes ventriculares, representada pela superfície corada em vermelho (**Figura 11A**), não apresentou diferenças entre os grupos, indicando que a cocaína, neste período de avaliação, não causa fibrose cardíaca (**Figura 11B**).

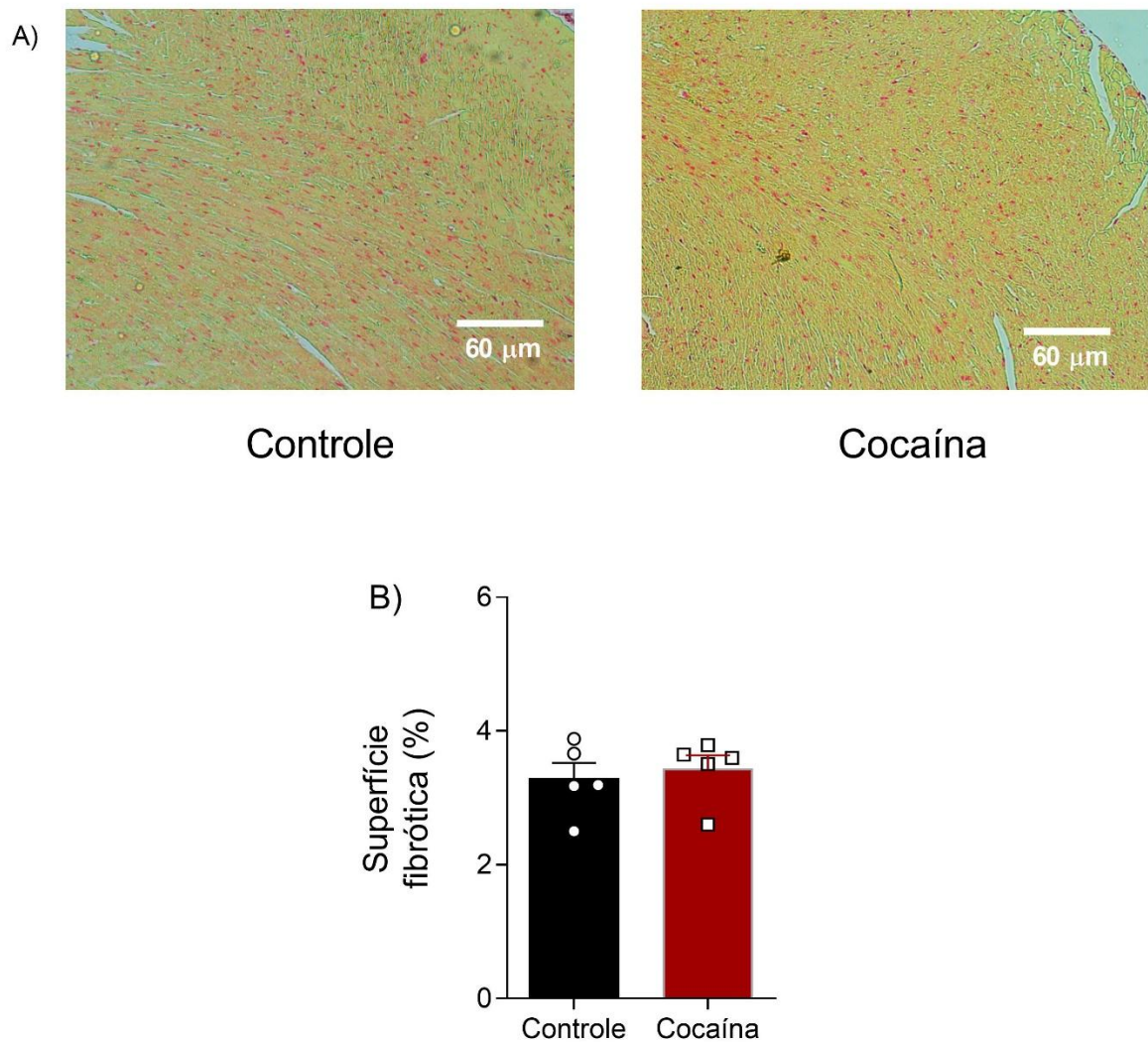


Figura 11: Superfície fibrótica cardíaca após cocaína. (A) Imagens representativas de cortes transversais da parede ventricular corada com Picrosirius sob luz branca, obtidas com aumento de 200x, evidenciando a deposição de matriz extracelular em vermelho. (B) Quantificação percentual da superfície fibrótica nos grupos Controle e Cocaína. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, onde $*p < 0,05$ vs. Controle por teste t de Student.

Em seguida, o estudo eletrocardiográfico sob anestesia foi realizado. Observou-se que a FC não apresentou diferença entre os grupos Controle e Cocaína

(**Figura 12A**). Por outro lado, a duração da onda P, que representa a despolarização atrial, foi reduzida no grupo Cocaína em comparação aos controles (**Figura 12B**), sugerindo uma alteração na propagação do impulso elétrico atrial. Entretanto, o intervalo PR, que reflete o tempo de condução atrioventricular, não mostrou diferença entre os grupos (**Figura 12C**).

A duração do complexo QRS, que corresponde à despolarização ventricular, também não apresentou diferença entre os grupos Controle e Cocaína (**Figura 12D**). Esse achado indica que a propagação do impulso elétrico pelos ventrículos não é alterada pela cocaína. De maneira semelhante, o intervalo QT, que representa a duração entre despolarização e repolarização ventricular, não mostrou alteração entre os grupos (**Figura 12E**). Também foi determinado o intervalo QT ajustado pela FC, o QTc(n)-B, que também não apresentou diferença entre os grupos (**Figura 12F**). Esses dados indicam que a exposição de curto prazo à cocaína não afeta a repolarização ventricular.

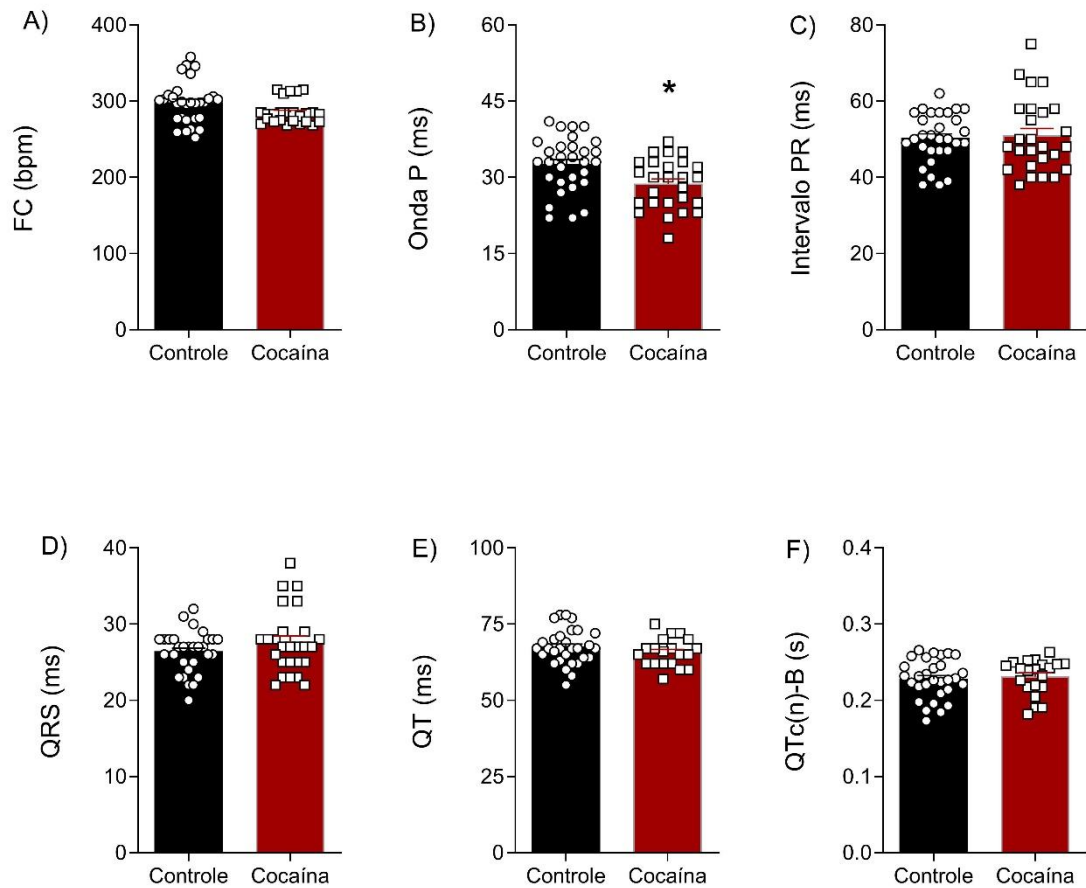


Figura 12: Análise eletrocardiográfica dos efeitos da cocaína. (A) Frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm). (B) Duração da onda P, que representa a despolarização atrial. (C) Intervalo PR, que reflete o tempo de condução atrioventricular. (D) Duração do complexo QRS, que corresponde à despolarização ventricular. (E) Intervalo QT, que representa a duração da repolarização ventricular. (F) Intervalo QT corrigido (QTc) utilizando a fórmula de Bazett (QTc(B)). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, onde * $p < 0,05$ vs. Controle por teste t de Student.

Estes achados indicam que o impacto da cocaína na eletrofisiologia cardíaca é mínimo neste modelo experimental. Dessa forma, partimos para a investigação da função contrátil cardíaca em preparação isolada pelo método de Langendorff. A **figura 13A** ilustra as diferenças basais (ausência de estímulo) entre os grupos Cocaína e Controle. Observa-se que a cocaína aumentou a PDVE (**Figura 13D**) e os índices $dP/dt_{\max}$ (**Figura 13E**) e $dP/dt_{\min}$ (**Figura 13F**), que indicam maior velocidade nas fases de contração e relaxamento, respectivamente. Observou-se também elevação na pressão de perfusão (PP) do leito arterial coronariano no grupo Cocaína (**Figura 13C**), que indica maior resistência vascular coronariana. Não houve

alteração da frequência dos batimentos espontâneos entre os grupos (**Figura 13C**). Dessa forma, a cocaína promove um estado basal de hipercontratilidade miocárdica.

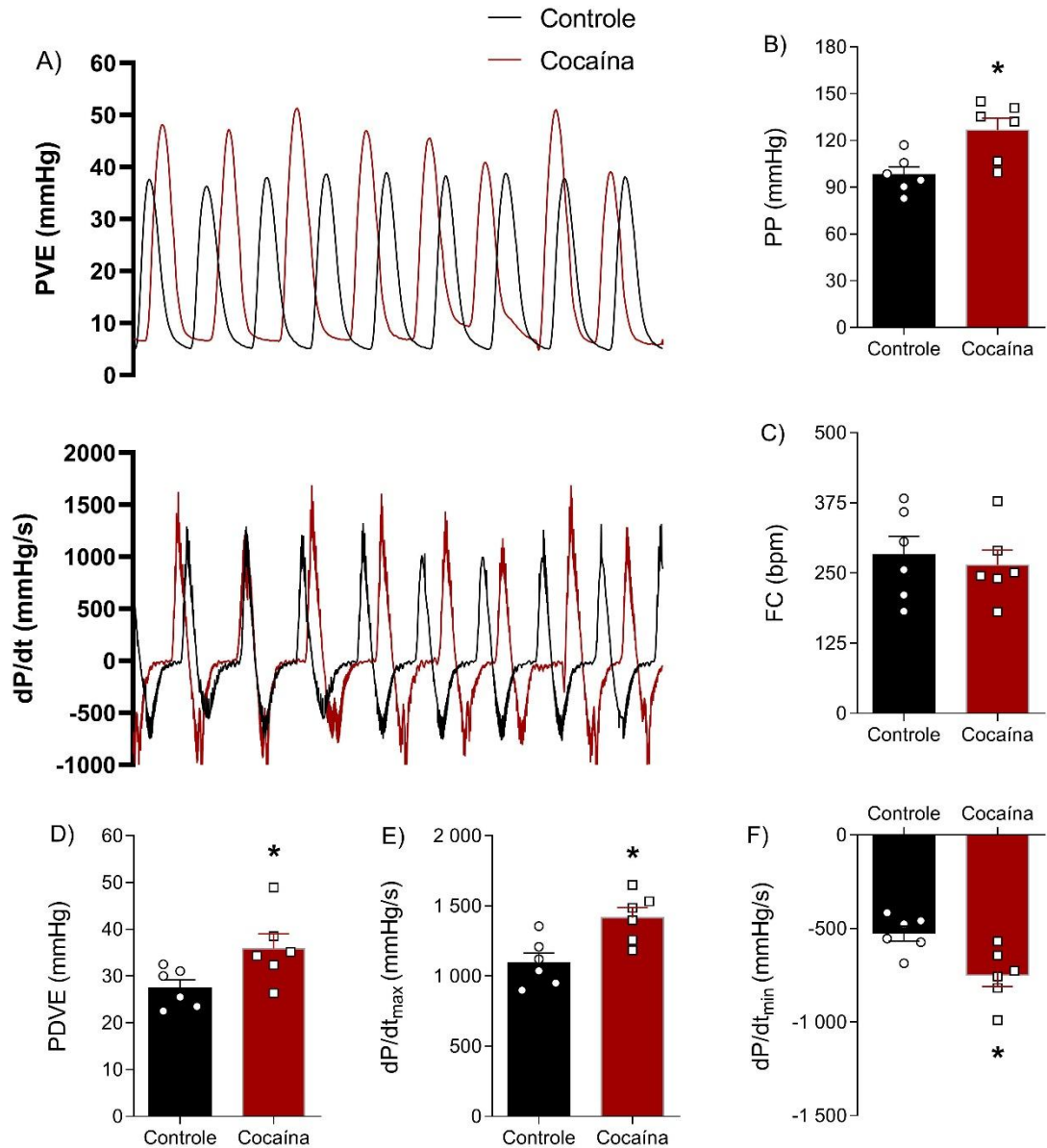


Figura 13: Função cardíaca basal *ex vivo*, utilizando a técnica de Langendorff. (A) Traçado representativo da curva de pressão do ventrículo esquerdo (PVE) ao longo do tempo e da derivada da pressão pela derivada do tempo (dP/dt) nas fases de contração (ascendente) e relaxamento (descendente). (B) Pressão de perfusão (PP) do leito arterial coronariano. Como o fluxo é mantido constante, variações na PP indicam alterações da resistência vascular. (C) Frequência cardíaca (FC) de batimentos espontâneos, em batimentos por minuto (bpm). (E) Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE). (F) Índice de contratilidade máxima (dP/dt_{max}). (G) Índice de contratilidade mínima (dP/dt_{min}). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média, onde *p < 0,05 vs. Controle por teste t de Student.

Após análise da contratilidade ventricular esquerda no estado basal, o desafio com isoprenalina, um agonista β -adrenérgico, foi realizado a fim de mimetizar o efeito da ativação simpática sobre o coração. O efeito inotrópico positivo foi analisado por meio de curvas concentração-resposta à isoprenalina, em que se observa uma menor resposta do grupo Cocaína em comparação ao grupo Controle para todos os parâmetros: PVDE (**Figura 14A**), $dP/dt_{\max}$ (**Figura 14B**) e $dP/dt_{\min}$ (**Figura 14C**). De modo interessante, a resposta inotrópica ao deslanosídeo, um inibidor da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase), foi mantida no grupo Cocaína em relação ao grupo Controle. Isto é, o deslanosídeo aumentou significativamente a PDVE (**Figura 14D**), a $dP/dt_{\max}$ (**Figura 14E**) e a $dP/dt_{\min}$ (**Figuras 14F**) igualmente nos dois grupos. Em suma, os resultados indicam que a cocaína compromete a resposta inotrópica à isoprenalina, refletindo um possível comprometimento da sinalização β -adrenérgica. No entanto, a resposta ao deslanosídeo, que inibe a Na^+/K^+ -ATPase, permanece inalterada. Logo, sugere-se que a cocaína prejudica de forma específica a modulação adrenérgica da contratilidade cardíaca.

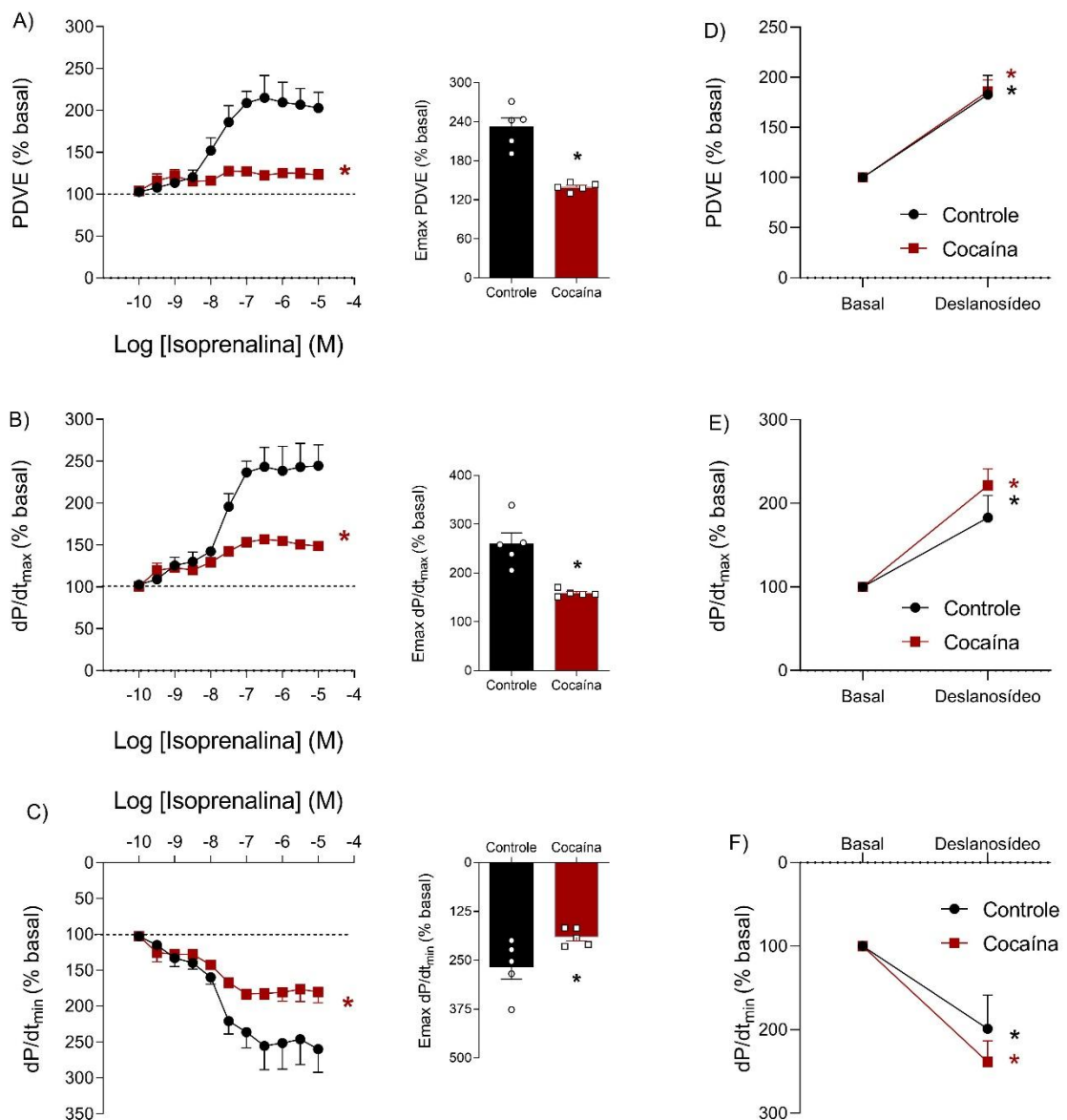


Figura 14: Resposta inotrópica à isoprenalina (agonista β -adrenérgico) e ao deslanosídeo (inibidor de bomba de sódio/potássio). Curvas concentração-resposta à isoprenalina (10^{-10} a 10^{-5} mol/L) para (A) pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (B) índice de contratilidade máxima (dP/dt_{max}) e (C) índice de contratilidade mínima (dP/dt_{min}), e respectivos valores de efeito máximo (E_{max}) (gráficos à direita). Efeito do deslanosídeo (10^{-10} mol/L) sobre (D) PDVE, (E) dP/dt_{max} e (F) dP/dt_{min} nos grupos controle e cocaína. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, A-C: $*p < 0,05$ vs. Controle, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni e E_{max} por teste t de Student; D-F: $*p < 0,05$ vs. basal (não estimulado), por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Após caracterizados os danos cardíacos estruturais e funcionais induzidos pela cocaína, foi avaliada a atividade da caspase-1, um marcador da ativação do

inflamassoma NLRP3. Para isso, foi utilizando o substrato FAM-FLICA, que se liga à caspase-1 ativa emitindo fluorescência verde.

Nas **Figura 15A** (imagens representativas) e **15B** (intensidade da fluorescência verde), observa-se um aumento na fluorescência do FAM-FLICA em cardiomiócitos isolados de animais do grupo Cocaína em comparação aos do grupo Controle, indicando maior atividade da caspase-1 e, portanto, uma maior ativação do inflamassoma NLRP3. Em adição, sabendo da contribuição de EROs para formação do inflamassoma NLRP3, foi avaliado o estresse oxidativo em cardiomiócitos através da sonda fluorescente DHE. Conforme as **Figura 15C** (imagens representativas) e **15D** (intensidade da fluorescência vermelha), a cocaína aumenta a produção de EROs.

Além disso, os sistemas enzimáticos antioxidantes foram avaliados. A atividade da SOD (**Figura 15E**) não reduziu significativamente no grupo Cocaína em comparação ao Controle ($p = 0,08$), porém, essa redução pode ter relevância biológica. A concentração de GSH (**Figura 15F**) não apresentou diferenças entre os grupos, indicando que esta reserva antioxidante do sistema glutathiona peroxidase não foi alterada. Por fim, a atividade da catalase (**Figura 15G**) foi menor no grupo Cocaína em comparação ao Controle, sugerindo uma redução da capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

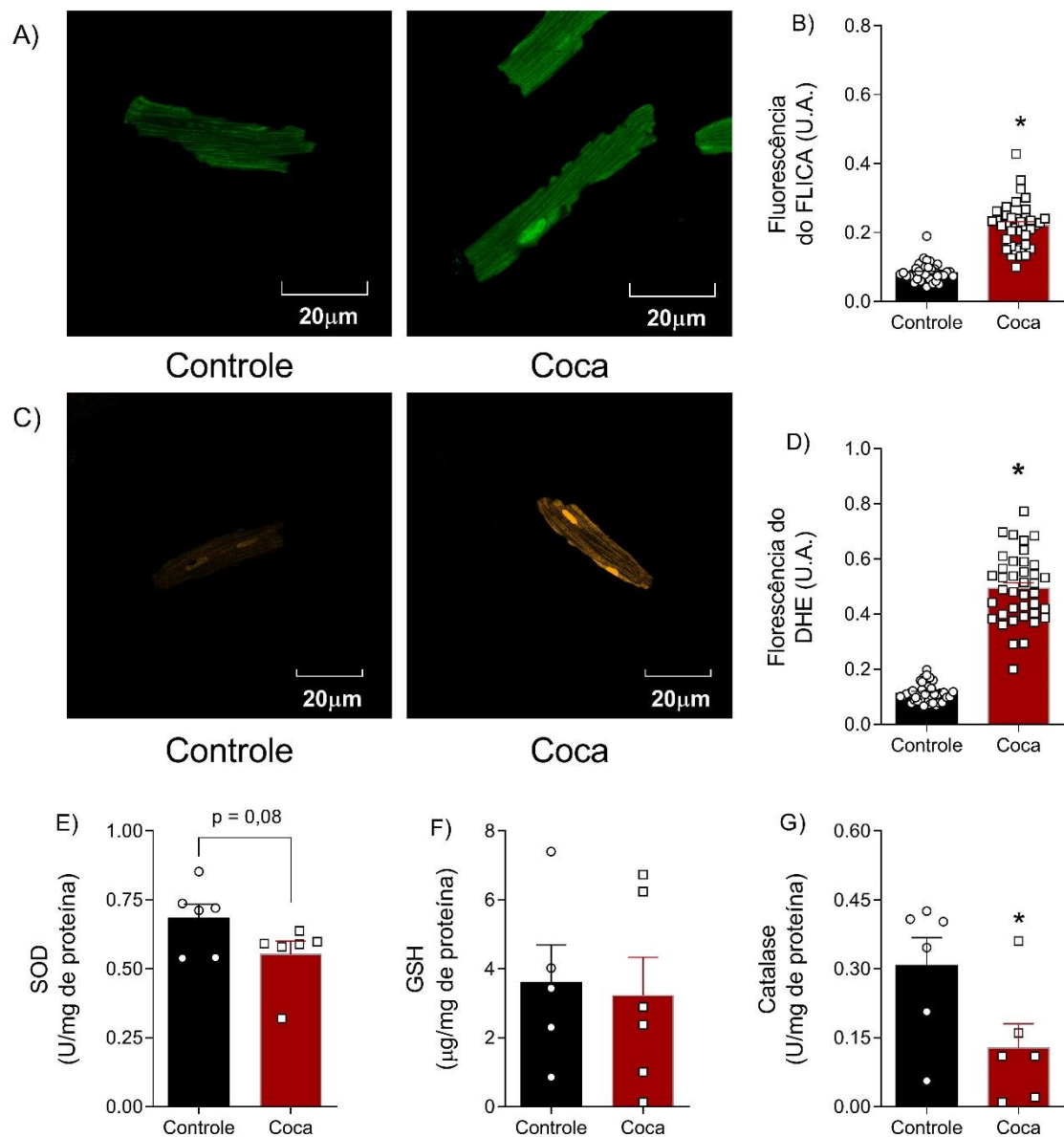


Figura 15: Avaliação cardíaca da atividade da caspase-1 e do estresse oxidativo causados por cocaína. (A) Imagens representativas de cardiomiócitos isolados emitindo fluorescência verde da marcação com FAM-FLICA, indicando a atividade da caspase-1. (B) Quantificação da fluorescência do FAM-FLICA (U.A.: unidades arbitrárias) nos grupos Controle e Cocaína. (C) Imagens representativas da fluorescência da reação da sonda DHE (núcleos vermelhos brilhantes) com espécies reativas de oxigênio (EROs) em cardiomiócitos isolados. (D) Quantificação da fluorescência do DHE nos grupos Controle e Cocaína. (E) Atividade da superóxido dismutase (SOD), (F) concentração de glutathiona (GSH) e (G) atividade da catalase em lisado de tecido cardíaco nos grupos Controle e Cocaína. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, onde * $p < 0,05$ vs. Controle por teste t de Student.

Esses resultados sugerem que a cocaína ativa o inflamassoma NLRP3 e promove estresse oxidativo em cardiomiócitos. A diminuição da atividade da catalase

e a tendência de redução da SOD podem refletir um comprometimento da capacidade antioxidante, contribuindo para o ambiente pró-inflamatório e pró-oxidativo observado.

Com base nos achados apresentados até aqui, conclui-se que a cocaína por um período de 5 dias resulta em alterações significativas na morfologia e na função cardíaca, associadas a um aumento da produção de EROs e à ativação do inflamassoma NLRP3.

4.2. A inibição farmacológica do inflamassoma NLRP3 previne os efeitos negativos da cocaína sobre o coração.

Para investigar se há uma relação causal entre a ativação do inflamassoma NLRP3 e dano cardíaco induzido por cocaína, duas estratégias farmacológicas foram escolhidas: a glibenclamida, uma sulfonilureia usada no tratamento do diabetes, mas, que inibe seletivamente o inflamassoma NLRP3 em dose não hipoglicemiante (MIRANDA; BRUNO *et al.*, 2024), e o MCC950, um composto derivado de glibenclamida, que mostrou-se um inibidor potente e seletivo de NLRP3, sem efeito hipoglicemiante (DUAN; SUN *et al.*, 2023).

A estrutura cardíaca foi determinada por estudo morfométrico das secções transversais (**Figura 16A**). O MCC950 preveniu o aumento do peso cardíaco (**Figura 16B**) e o espessamento do septo (**Figura 16G**) induzidos por cocaína, enquanto a glibenclamida apenas evitou o espessamento septal (**Figura 16G**). Os demais parâmetros, como área interna do ventrículo esquerdo (**Figura 16C**), área interna do ventrículo direito (**Figura 16D**), espessura da parede do ventrículo esquerdo (**Figura 16E**) e espessura da parede do ventrículo direito (**Figura 16F**), não foram modificados pela cocaína sozinha ou associada aos tratamentos.

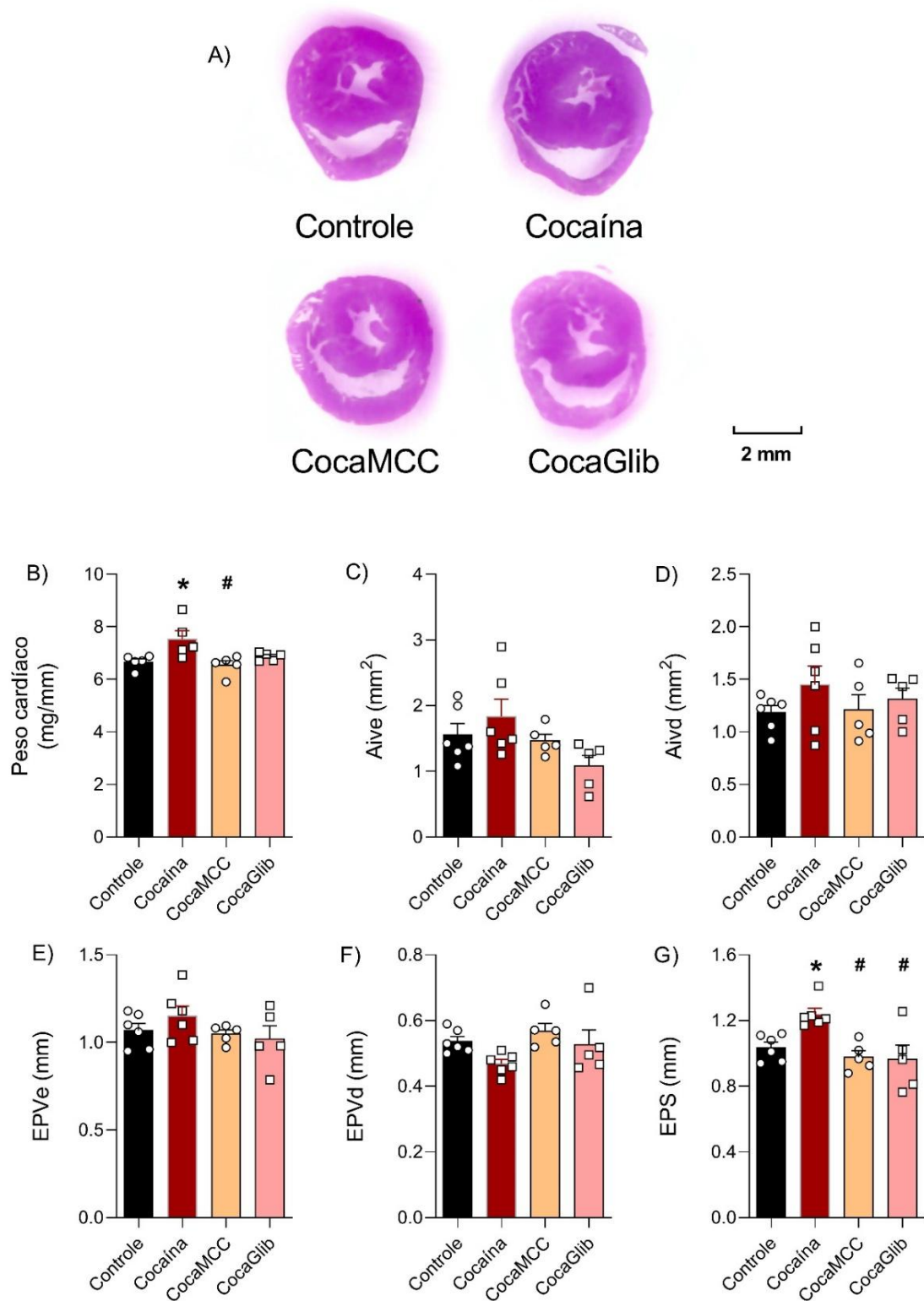


Figura 16: Efeito dos tratamentos com MCC950 e glibenclamida nas alterações morfológicas causadas por cocaína. (A) Seções transversais representativas dos corações corados com Hematoxilina e Eosina (HE) de cada grupo. (B) Peso cardíaco (mg/mm), corrigido pelo comprimento da tibia. (C) Área interna do ventrículo esquerdo (Aive). (E). Espessura da parede ventricular esquerda (EPVe). (F) Espessura da parede ventricular direita (EPVd). (G) Espessura da parede septal (EPS). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Após a avaliação da morfologia do coração, a análise do diâmetro de cardiomiócitos da parede interventricular (septal) foi realizada (**Figura 17A**). Verificou-se que a cocaína induziu um aumento no diâmetro médio dos cardiomiócitos em comparação ao grupo Controle (**Figura 17B**). Esse aumento foi prevenido nos grupos tratados com MCC950 (CocaMCC) e glibenclamida (CocaGlib), mostrando que ambos os tratamentos previnem a hipertrofia dos cardiomiócitos interventriculares induzida pela cocaína.

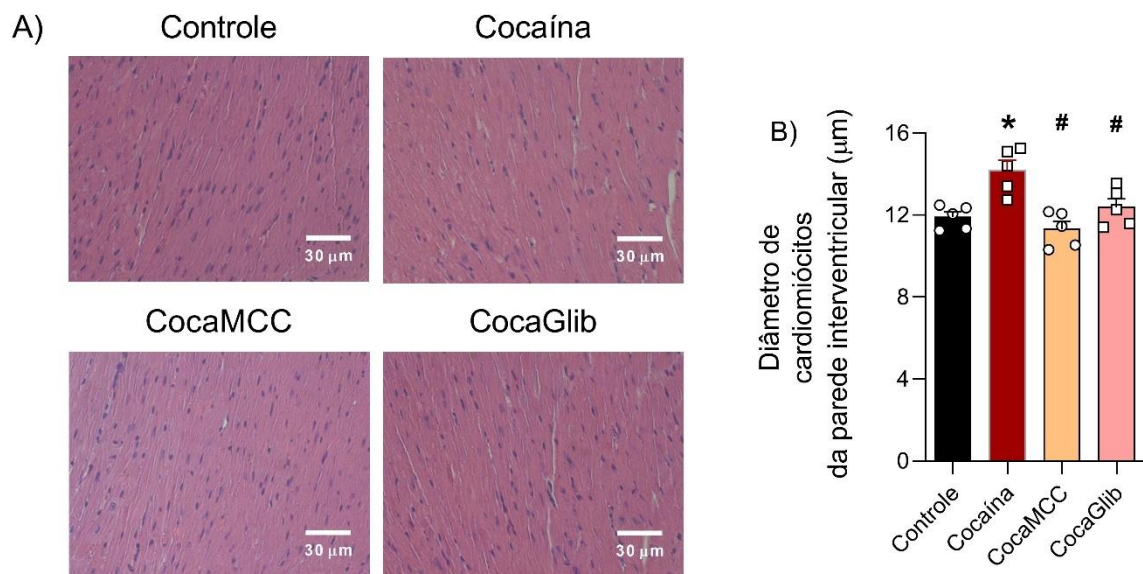


Figura 17: Efeito do tratamento com MCC950 ou glibenclamida sobre a hipertrofia de cardiomiócitos da parede interventricular induzida por cocaína. (A) Cortes transversais da parede interventricular cardíaca corados com HE dos grupos Controle, Cocaína, CocaMCC e CocaGlib. (B) Diâmetro de cardiomiócitos da parede interventricular. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Após a análise dos parâmetros morfométricos cardíacos e celulares, a influência da inibição do inflamassoma NLRP3 foi avaliada no impacto da cocaína sobre a função cardíaca *ex vivo*.

A PP (**Figura 18A**) e FC (**Figura 18B**) permaneceram inalteradas nos grupos Cocaína, CocaMCC e CocaGlib em comparação ao Controle. A cocaína aumentou a PDVE, efeito prevenido pelo tratamento com MCC950, mas não por glibenclamida (**Figura 18C**). Tanto $dP/dt_{\max}$ quanto $dP/dt_{\min}$ foram aumentados no grupo Cocaína. Esses aumentos foram prevenidos por MCC950, mas não por glibenclamida (**Figuras 18D e 18E**). Conclui-se, portanto, que a inibição do

inflamassoma NLRP3 com MCC950 previne o estado de hipercontratilidade basal causada pela cocaína.

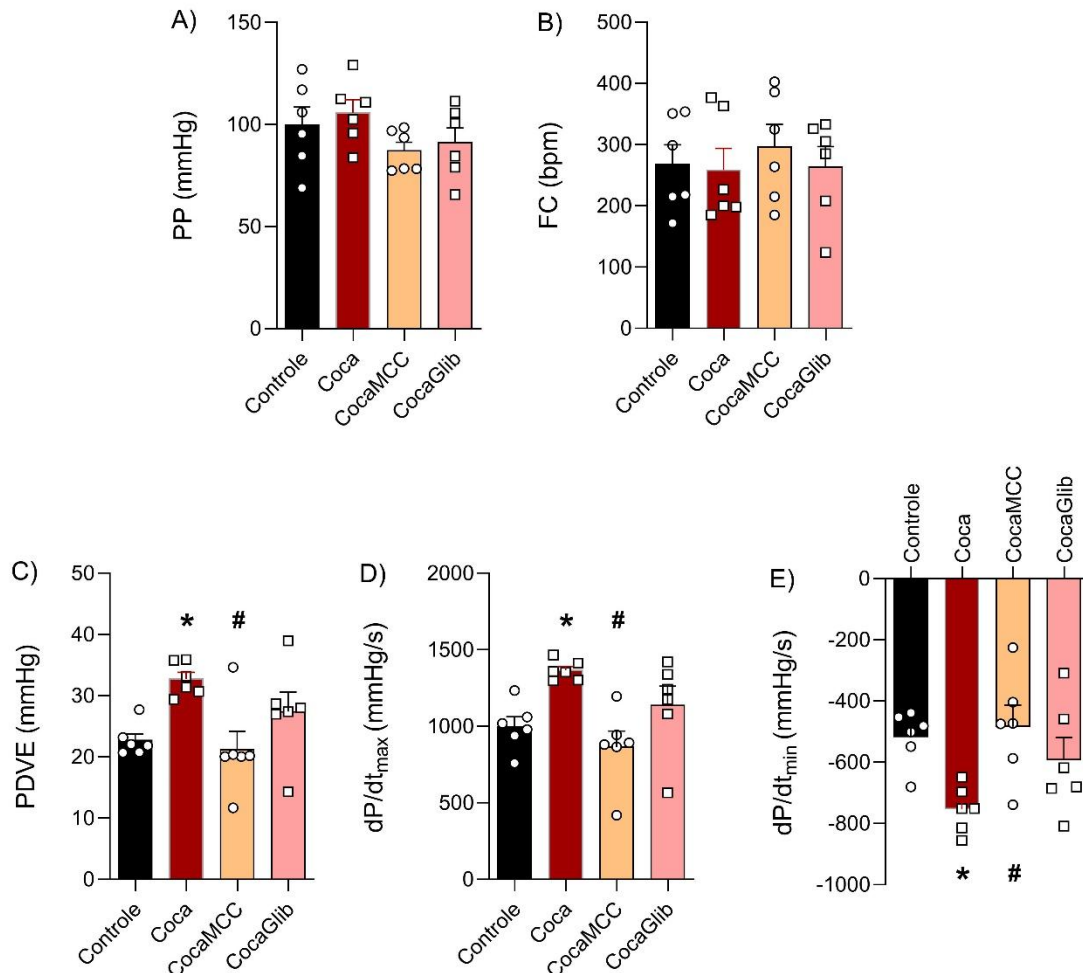


Figura 18: Efeito do tratamento com MCC950 ou glibenclamida sobre a alteração de função cardíaca *ex vivo* causada por cocaína. (A) Pressão de perfusão (PP); (B) frequência cardíaca (FC), (C) pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (D) índice de contratilidade máxima (dP/dt_{max}) e (E) índice de contratilidade mínima (dP/dt_{min}). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Sob estresse farmacológico com a isoprenalina, os parâmetros de PDVE, dP/dt_{max} e dP/dt_{min} aumentaram de forma concentração-dependente em todos os grupos, porém, o grupo Cocaína apresentou respostas atenuadas em comparação ao Controle (**Figura 19**). A PDVE foi mantida próxima aos valores do grupo Controle nos grupos tratados com MCC950 e glibenclamida, prevenindo a redução observada no grupo Cocaína (**Figura 19A**). Da mesma forma, a dP/dt_{max} e a dP/dt_{min} foram preservados nos grupos tratados com MCC950 e glibenclamida, prevenindo a diminuição causada por cocaína (**Figuras 19B e 19C**). No geral, os resultados indicam

que a inibição do inflamassoma NLRP3 previne a diminuição do efeito inotrópico positivo da isoprenalina causada pela cocaína.

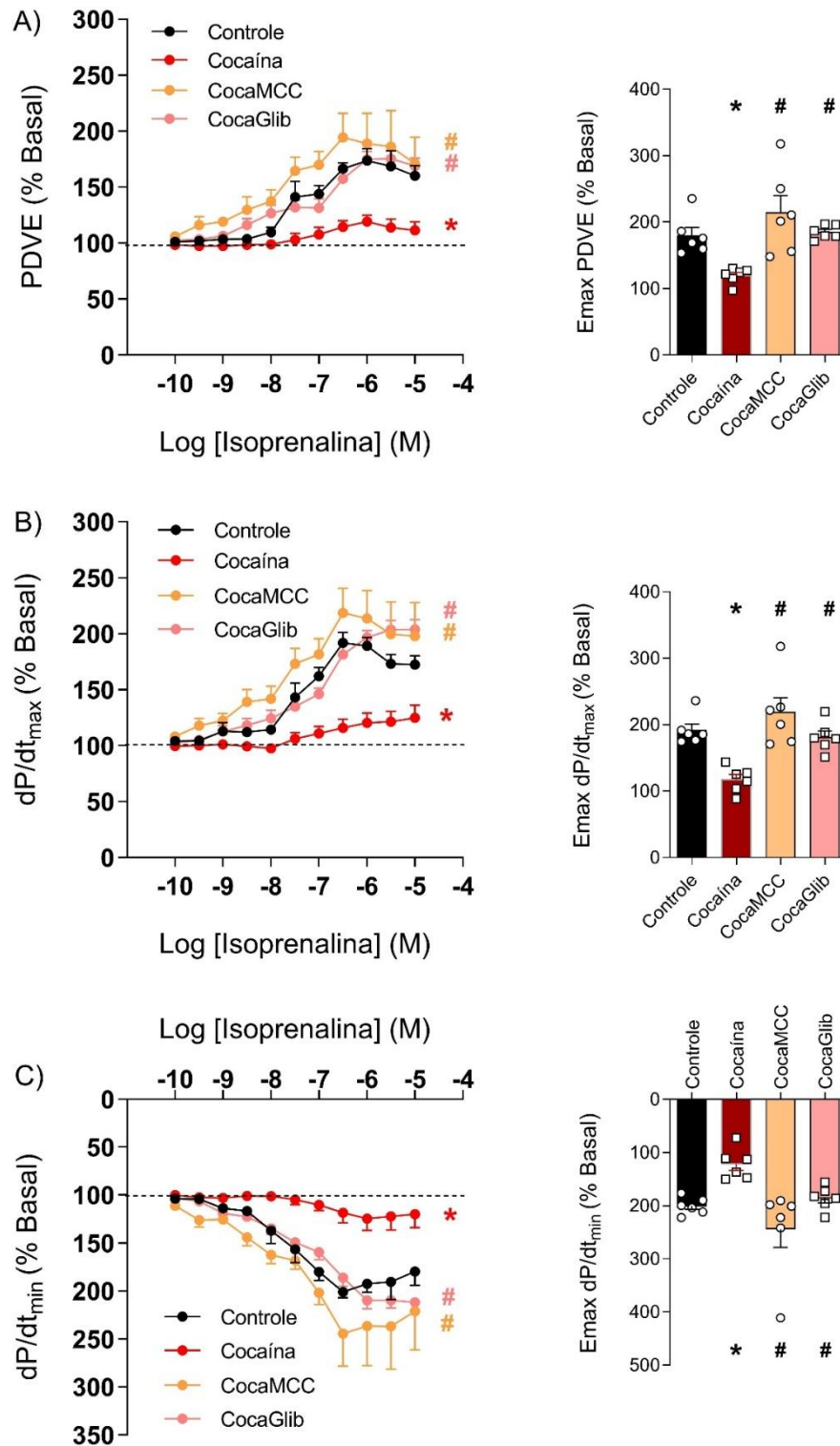


Figura 19: Impacto da inibição do inflamassoma NLRP3 por MCC950 ou glibenclamida sobre o efeito inotrópico positivo da isoprenalina em corações isolados de camundongos que receberam cocaína. Curvas concentração-resposta à isoprenalina (10^{-10} a 10^{-5} mol/L) para (A) pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (B) índice de contratilidade máxima (dP/dt_{max}) e (C) índice de contratilidade mínima (dP/dt_{min}), e respectivos valores de efeito máximo (E_{max}) (gráficos à direita). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Para complementar os dados funcionais, estudamos a resposta contrátil celular basal e frente ao desafio com agonistas adrenérgicos. Corroborando ao observado nos corações isolados, os cardiomiócitos do grupo Cocaína na ausência de estímulo farmacológico (basal) apresentaram menor tempo até o pico (**Figura 20A**) e maior fração de encurtamento (**Figura 20C**), caracterizando um estado hiperdinâmico. Nos grupos CocaMCC ou CocaGlib, observou-se uma normalização no tempo até o pico da contração e da fração de encurtamento no basal, prevenindo o efeito de aceleração induzido pela cocaína (**Figura 20A e C**).

A isoprenalina, por sua vez, desencadeou maior velocidade de contração (**Figura 20A**) e maior efeito inotrópico positivo no grupo Cocaína (**Figura 20C**), enquanto os tratamentos com os inibidores de inflamassoma NLRP3 retornaram à capacidade de responder ao agonista β -adrenérgico para níveis do controle (**Figura 20A e C**). Vale realçar que a isoprenalina desencadeou diminuição do valor do basal em todos os grupos nas análises de velocidade de contração e relaxamento (**Figura 20A e B**), porém, aumentou a fração de encurtamento apenas do grupo Cocaína após estímulo farmacológico (**Figura 20C**), realçando a maior resposta ao agonista β -adrenérgico. Semelhantemente, a fenilefrina reduziu os valores encontrados no basal nos tempos de contração e relaxamento celular (**Figura 20A e B**) para todos os grupos, reduzindo também a fração de encurtamento dos grupos Controle e Cocaína, em relação ao basal (**Figura 20C**). Apesar de aumentar a velocidade de contração (**Figura 20A**) no grupo Cocaína, com manutenção pelos grupos tratados com os inibidores de inflamassoma NLRP3, a fenilefrina não modificou a fração de encurtamento entre os grupos.

Interessantemente, os tratamentos com MCC950 e glibenclamida prolongaram a fase de relaxamento em comparação ao grupo cocaína, tanto em condições basais quanto sob estresse farmacológico induzido por isoprenalina e fenilefrina (**Figura 20B**).

A nível dos receptores, não houve diferença na expressão do receptor adrenérgico (AR) $\beta 1$ (**Figura 20D**) e não foi possível detectar o $\alpha 1$ (dados não mostrados) nas células dos grupos analisados. Sugere-se, portanto, que as diferenças de respostas aos agonistas entre os grupos são independentes de alteração na quantidade total dos receptores adrenérgicos.

Esses resultados, em conjunto, mostram que os tratamentos com MCC950 e glibenclamida previnem os efeitos da cocaína sobre a dinâmica de contração-relaxamento celular.

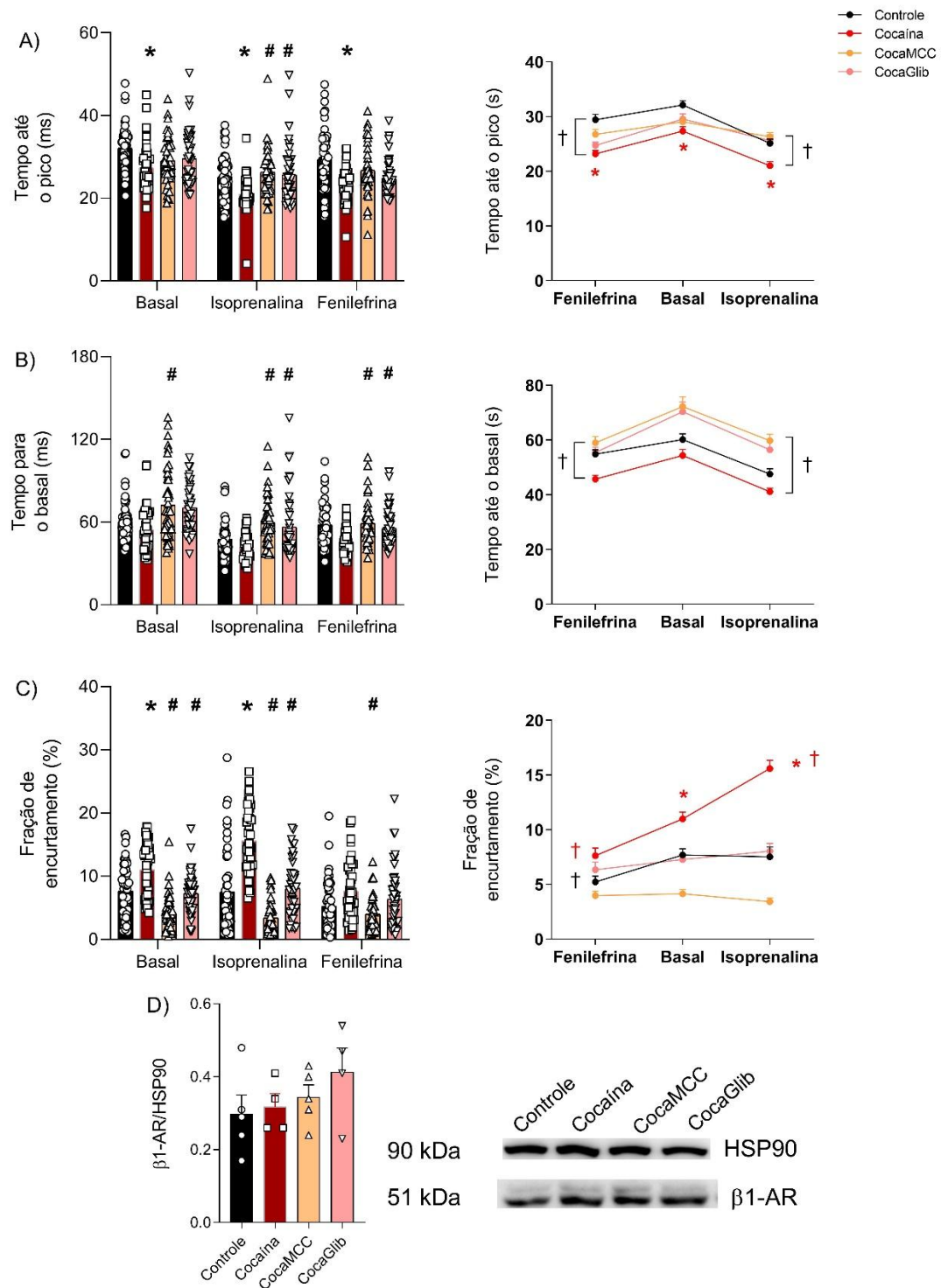


Figura 20: Efeito da cocaína e dos tratamentos com MCC950 ou glibenclamida sobre a função contrátil na ausência ou presença de isoprenalina (10^{-7} M), agonista β -adrenérgico, ou fenilefrina (10^{-7} M), agonista α -adrenérgico, e sobre a expressão proteica dos receptores adrenérgicos em cardiomiócitos isolados. (A) Tempo até 50% do pico da contração; (B) tempo até 50% do término da contração; (C) fração de encurtamento. Os resultados são apresentados como eventos celulares individuais (gráfico à esquerda) ou em média de eventos (gráfico à direita) de todos os grupos no basal ou sob desafio farmacológico. (D) Expressão do receptor adrenérgico β 1 (β 1-AR) normalizada pela HSP90, onde cada símbolo representa o *pool* de células do mesmo animal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, † $p < 0,05$ vs Basal, por Two-way ANOVA, seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Uma vez observado que a cocaína altera a resposta adrenérgica em cardiomiócitos, sem alterar a quantidade total dos receptores, avaliamos elementos da via de sinalização: transiente de cálcio e expressão de SERCA2a. Quanto ao transiente de cálcio, foram avaliados os parâmetros de fluorescência basal intracelular da sonda Fluo-4 AM (F_0) e a amplitude relativa do transiente de cálcio (F/F_0). A expressão da SERCA2a foi usada como um índice de eficiência da recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático. O aumento de F_0 foi observado no grupo Cocaína, enquanto MCC950 e glibenclamida restauraram esse parâmetro para valores próximos ao Controle (**Figura 21B**). A amplitude dos transientes de cálcio (F/F_0) foi reduzida no grupo Cocaína, e esse efeito também foi prevenido pelos tratamentos com MCC950 e glibenclamida (**Figura 21C**). Não foram observadas diferenças na expressão de SERCA2a entre os grupos (**Figura 21D**). Estes resultados, em conjunto, indicam que o inflamassoma NLRP3 contribui para as anormalidades induzidas por cocaína sobre a dinâmica de cálcio em cardiomiócitos isolados e que a inibição do inflamassoma NLRP3 pode normalizar essas alterações.

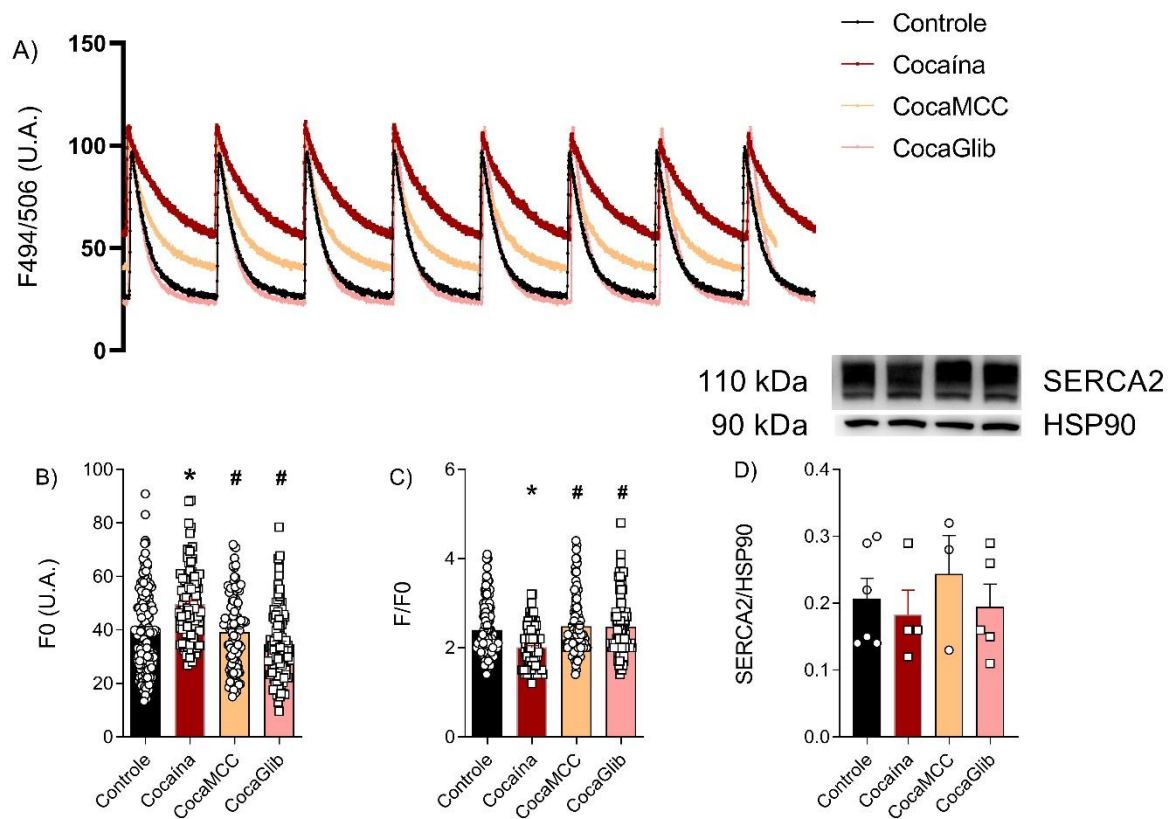


Figura 21: Efeito do tratamento com MCC950 ou glibenclamida sobre as alterações de transiente de cálcio e expressão de SERCA2a induzidas por cocaína em cardiomiócitos isolados. (A) Traços representativos dos transientes de cálcio intracelular, avaliados pela razão F494/506 em unidades arbitrárias (U.A.). (B) Fluorescência de Fluo-4 AM em repouso (F_0 ; U.A.: unidades arbitrárias). (C) Amplitude dos transientes de cálcio, expressa como F/F_0 . (D) Expressão relativa de SERCA2a normalizada pela HSP90. B-C) Cada símbolo representa uma única célula; D) cada símbolo representa o pool de células do mesmo animal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Para comprovar o mecanismo de ação das drogas, a atividade da caspase-1 e a produção de EROs foram realizadas (**Figura 22A**). Os tratamentos com MCC950 e glibenclamida preveniram o aumento da atividade da caspase-1 mediada por cocaína, restaurando a fluorescência do FAM-FLICA para valores próximos ao Controle (**Figura 22B**). Da mesma forma, o aumento da produção de EROs causado por cocaína foi reduzido nos grupos tratados com os inibidores (**Figura 22C**). Além disso, a Cocaína aumentou a expressão de mRNA para IL-1 β e o tratamento com MCC950, mas não com glibenclamida, impediu esse aumento (**Figura 22D**). Mostra-se, portanto, que a produção de EROs por cocaína parece estar intimamente

conectada com a ativação do inflamassoma NLRP3 e que o aumento da expressão gênica de IL-1 β pôde ser prevenido pelo MCC950.

A)

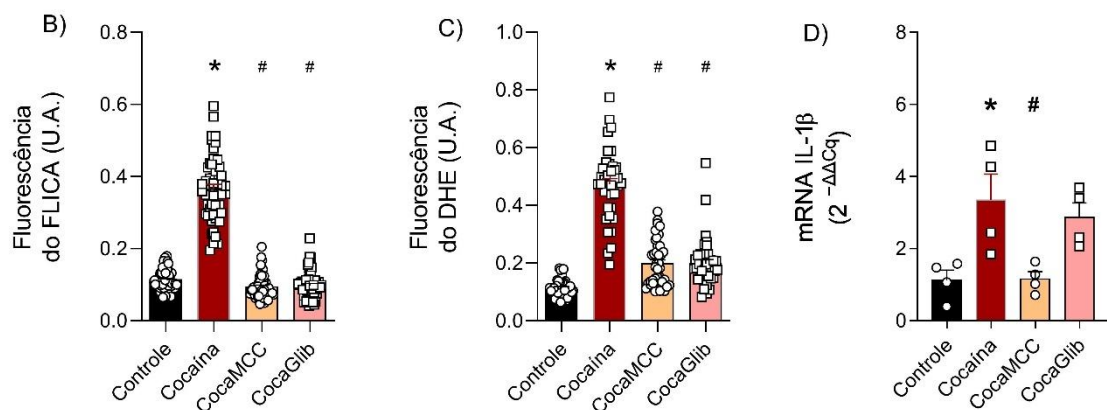
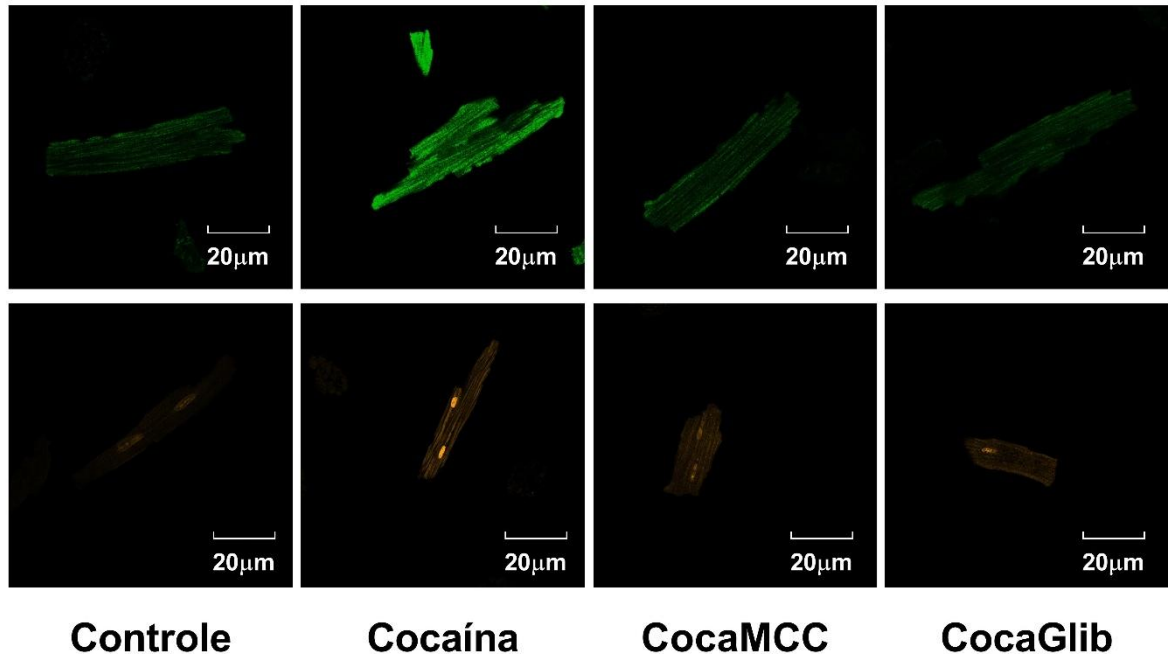


Figura 22: Efeitos cardíacos da cocaína e dos tratamentos com MCC950 ou glibenclamida sobre a atividade da caspase-1, produção de EROs e expressão gênica de IL-1 β . (A) Imagens representativas de cardiomiócitos isolados emitindo fluorescência verde da marcação com FAM-FLICA (painel superior), indicando a atividade da caspase-1, ou vermelha da marcação de EROs pela sonda DHE (painel inferior). (B) Quantificação da fluorescência do FAM-FLICA e da (C) fluorescência do DHE em cardiomiócitos isolados. (D) Expressão gênica do mRNA para IL-1 β em relação ao gene de referência (18S) a partir de amostras de coração. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que *p < 0,05 vs. Controle, #p < 0,05 vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Em suma, a inibição da ativação do inflamassoma NLRP3 preveniu os efeitos deletérios da cocaína, atuando tanto na preservação da morfologia e função cardíacas, quanto na redução da inflamação e do estresse oxidativo. Esses achados sugerem que o antagonismo do inflamassoma NLRP3 pode ser uma estratégia promissora para mitigar os efeitos cardiotoxicos da cocaína.

4.3. A deleção de genes do receptor NLRP3 e da caspase-1 confirma que o inflamassoma NLRP3 é essencial para os efeitos cardiodeletérios da cocaína.

Como prova de conceito, a análise de hipertrofia cardíaca e atividade de enzimas antioxidantes, após 5 dias de cocaína, foi realizada em animais Wt ou KO para os genes que codificam o receptor NLRP3 (NLRP3 KO) ou a enzima caspase-1 (Casp-1 KO). A cocaína aumentou o peso cardíaco apenas no grupo Wt, enquanto os grupos NLRP3 KO e Casp-1 KO não apresentaram aumento, indicando que a ausência dessas proteínas previne a hipertrofia induzida pela cocaína (**Figura 23A**). A atividade da catalase foi reduzida no grupo Wt cocaína, enquanto nos grupos NLRP3 KO e Casp-1 KO essa redução não foi observada, indicando que a deleção genética desses genes protege contra a queda da atividade da catalase induzida pela cocaína (**Figura 23B**). A atividade de SOD, por sua vez, não foi significativamente alterada no grupo Wt cocaína, apesar de uma tendência de redução ($p = 0,11$; **Figura 23C**). Nos grupos NLRP3 KO e Casp-1 KO e, a atividade de SOD permaneceu inalterada (em relação ao Controle) após o desafio com cocaína, sugerindo um papel modulador desses genes na resposta antioxidante. Por fim, fêmeas Wt e KO submetidas ao mesmo protocolo (cocaína 15 mg/kg/dia; i.p., 5 dias) não apresentaram aumento do peso cardíaco, demonstrando proteção à hipertrofia cardíaca relativa ao sexo (**Figura 23D**).

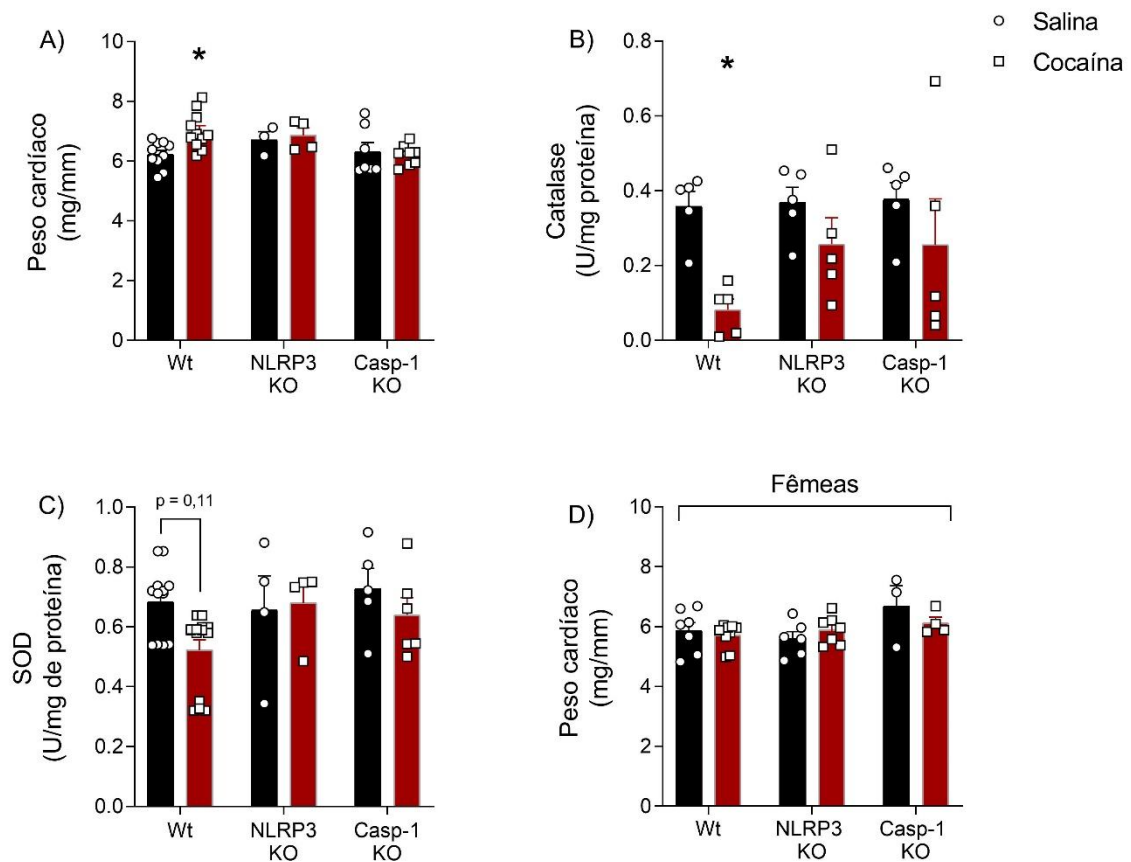


Figura 23: Avaliação da deleção genética do receptor NLRP3 e da enzima caspase-1 sobre a redução da proteção oxidante e o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzidos por cocaína em machos e fêmeas. (A) Peso cardíaco de animais machos das linhagens selvagem (Wt) e nocautes (KO) para NLRP3 ou Casp-1 após 5 dias de cocaína ou salina. Atividade de (B) catalase e de (C) SOD nos diferentes grupos. (D) Peso cardíaco de camundongos fêmeas Wt, NLRP3 KO ou Casp-1 KO após cocaína. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Salina, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

A deleção dos genes NLRP3 e caspase-1 confirmou o papel central do inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e na alteração das defesas antioxidantes provocadas pela cocaína. Esses resultados reforçam que o inflamassoma NLRP3 é essencial para os efeitos deletérios da cocaína sobre o coração.

4.4. O antagonista misto dos receptores adrenérgicos, carvedilol, melhora os efeitos cardiodeletérios da cocaína, concomitantemente à inibição do inflamassoma NLRP3.

A cocaína aumenta a concentração de noradrenalina nas sinapses simpáticas e pode estimular a liberação de adrenalina (SOFUOGLU; NELSON *et al.*, 2001), ativando de forma exagerada os receptores α e β -adrenérgicos no coração. Além da ação simpatomimética, são reconhecidos outros alvos da cocaína, como canais sensíveis à voltagem para sódio e para potássio (O'LEARY; HANCOX, 2010). Dessa forma, nos perguntamos se o dano cardíaco e a ativação do inflamassoma causados por cocaína eram dependentes dos receptores adrenérgicos ou não. Uma vez que cardiomiócitos isolados de animais que receberam cocaína responderam aos agonistas α e β -adrenérgicos, escolhemos como estratégia bloquear a sinalização por ambos os receptores usando o carvedilol, que é antagonista α/β misto.

Inicialmente, analisamos a hipertrofia e a morfometria cardíaca (**Figura 24A**). O tratamento com carvedilol preveniu o aumento do peso cardíaco induzido pela cocaína, mantendo os valores próximos aos do grupo Controle (**Figura 24B**). Não foram observadas alterações notáveis na AIVe e AIVd entre os grupos (**Figuras 24C e 24D**). As espessuras das paredes ventriculares (EPVe e EPVd) também não apresentaram diferenças entre os grupos (**Figuras 24E e 24F**). No entanto, a EPS foi aumentada no grupo Cocaína em comparação ao Controle e o carvedilol preveniu esse aumento (**Figura 24G**).

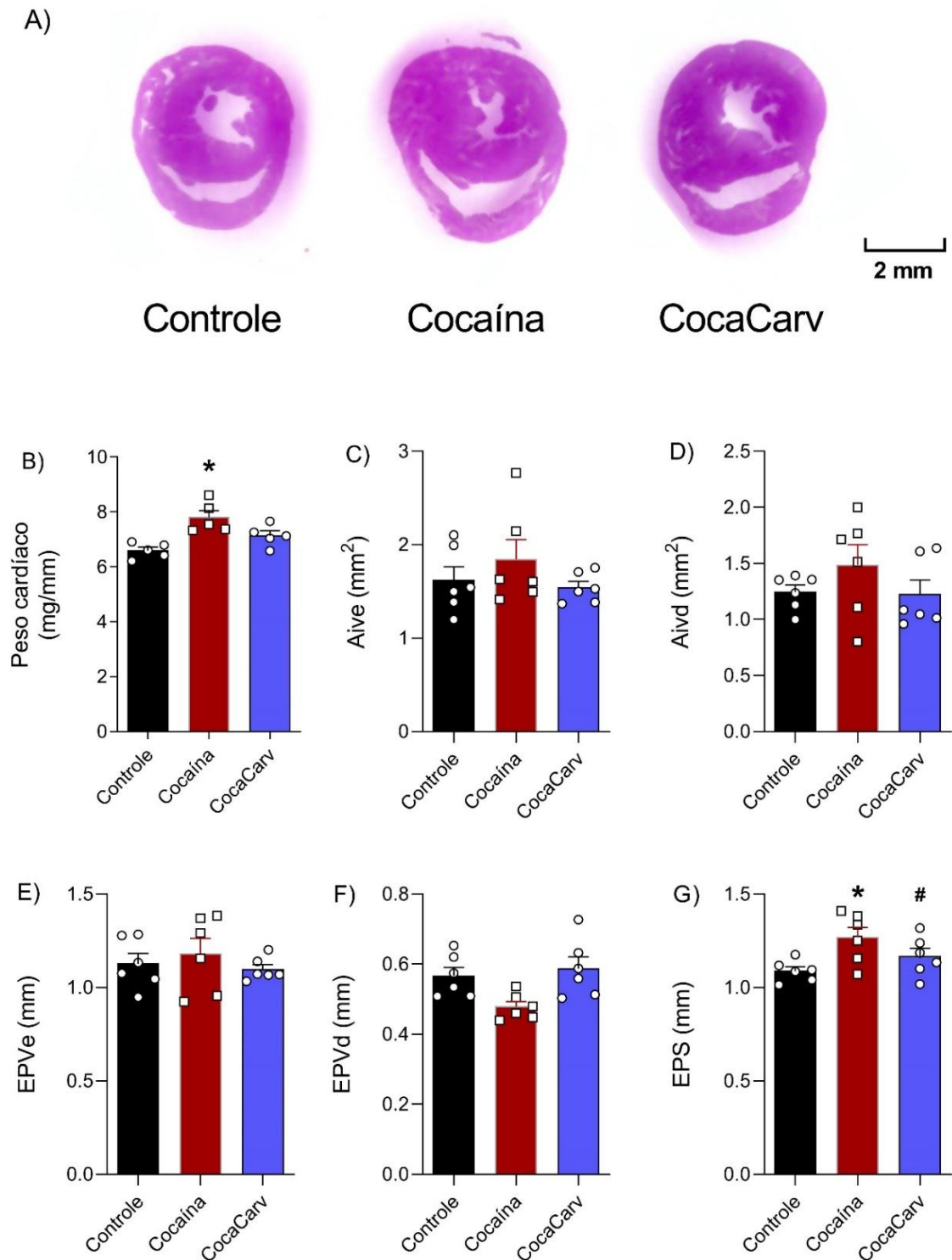


Figura 24: Efeito do Carvedilol sobre o remodelamento cardíaco causado por cocaína. (A) Imagens representativas de cortes transversais de corações corados com HE. (B) Peso cardíaco corrigido pelo comprimento da tíbia. (D) Área interna do ventrículo esquerdo (Aive). (E) Área interna do ventrículo direito (Aivd). (F) Espessura média da parede ventricular esquerda (EPVe). (G) Espessura média da parede ventricular direita (EPVd). (H) Espessura média da parede septal (EPS). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Também analisamos o diâmetro dos cardiomiócitos da parede interventricular (**Figura 25A**). O tratamento com carvedilol atenuou o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos da parede interventricular, prevenindo a hipertrofia celular induzida pela cocaína (**Figura 25B**). Estes dados corroboram com a prevenção do espessamento septal e indicam que o carvedilol exerce efeito protetor sobre o remodelamento cardíaco induzido pela cocaína.

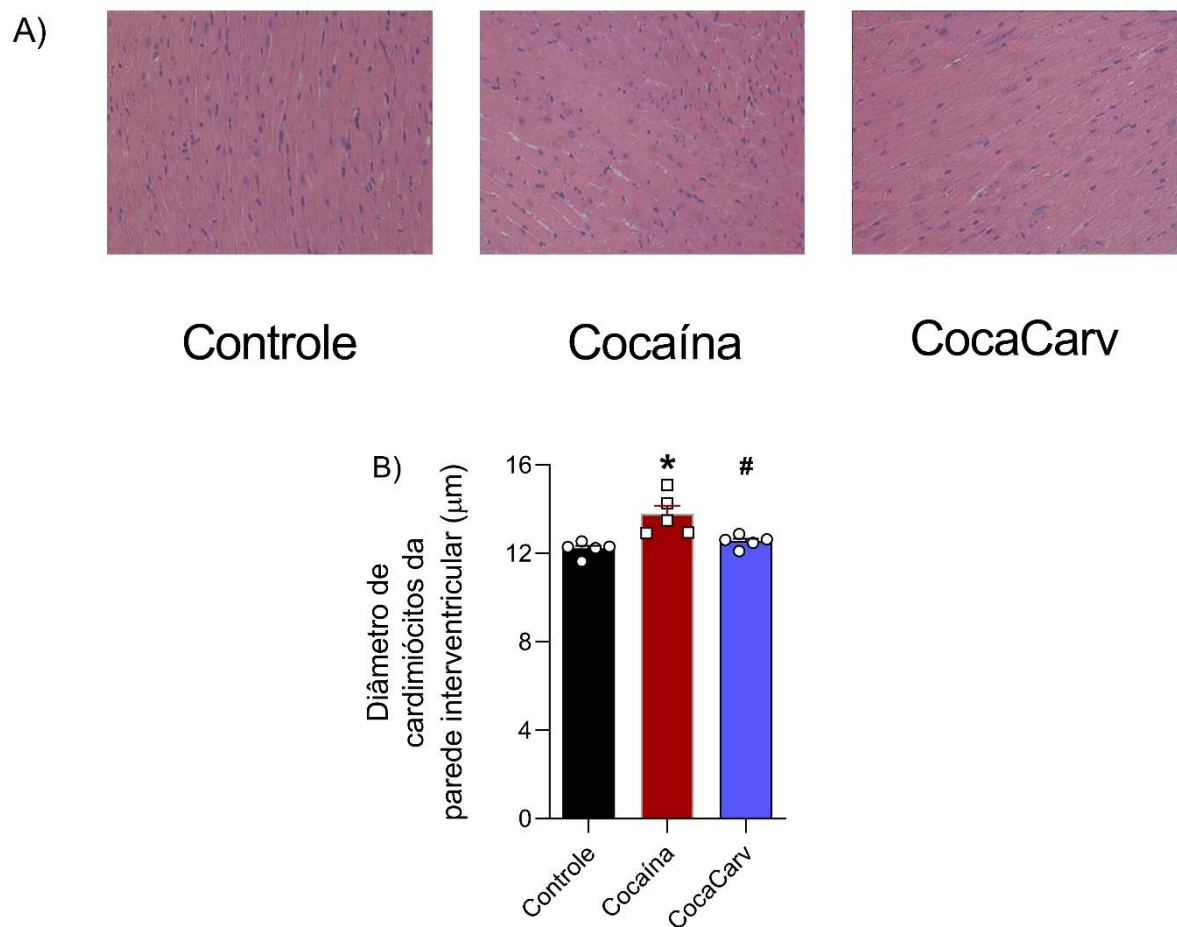


Figura 25: Efeito do tratamento com carvedilol sobre a hipertrofia de cardiomiócitos da parede interventricular induzida por cocaína. (A) Cortes transversais representativos da parede interventricular cardíaca corados com HE dos grupos Controle, Cocaína e CocaCarv. (B) Diâmetro de cardiomiócitos da parede interventricular. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Em seguida, analisamos o efeito do tratamento com carvedilol sobre a função cardíaca *ex vivo*. A PP e a FC não apresentaram diferenças significativas entre os

grupos (**Figuras 28A e 28B**). A PDVE no basal aumentou no grupo Cocaína e foi normalizada pelo carvedilol (**Figura 28C**). Da mesma forma, o carvedilol preveniu o aumento da $dP/dt_{\max}$ e $dP/dt_{\min}$ observados no grupo Cocaína (**Figuras 28D e 28E**).

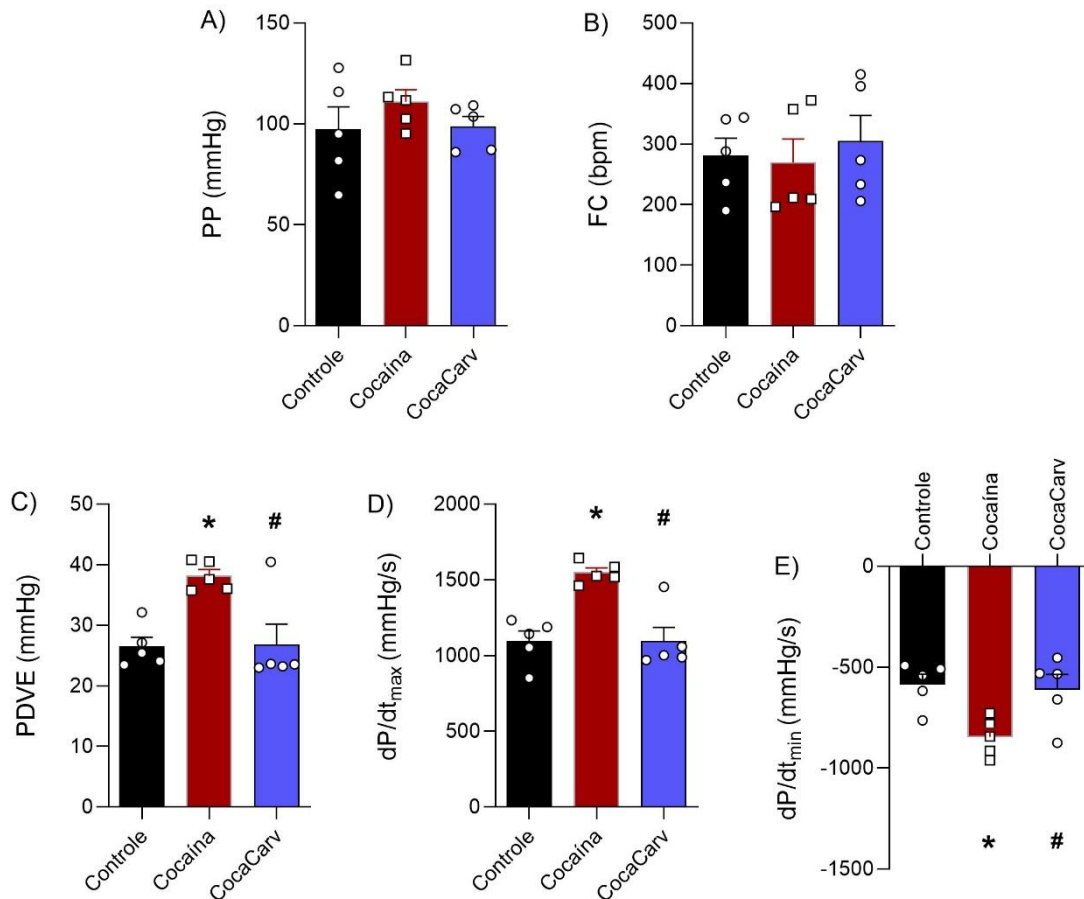


Figura 26: Efeito do tratamento com carvedilol (Carv) sobre as alterações basais de contratilidade *ex vivo* causadas por cocaína. (A) Pressão de perfusão (PP), (B) frequência cardíaca (FC), (C) pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (D) índice de contratilidade máxima ($dP/dt_{\max}$) e (E) índice de contratilidade mínima ($dP/dt_{\min}$). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Sob estresse farmacológico com isoprenalina, os parâmetros de PDVE (**Figura 27A**), $dP/dt_{\max}$ (**Figura 27B**) e $dP/dt_{\min}$ (**Figura 27C**) aumentaram de forma concentração-dependente em todos os grupos, porém, o grupo Cocaína apresentou respostas atenuadas em comparação ao Controle. O tratamento com carvedilol preveniu essas alterações no grupo CocaCarv (**Figuras 27**). Assim, o carvedilol preveniu a diminuição do inotropismo positivo induzido pela isoprenalina causado pela cocaína.

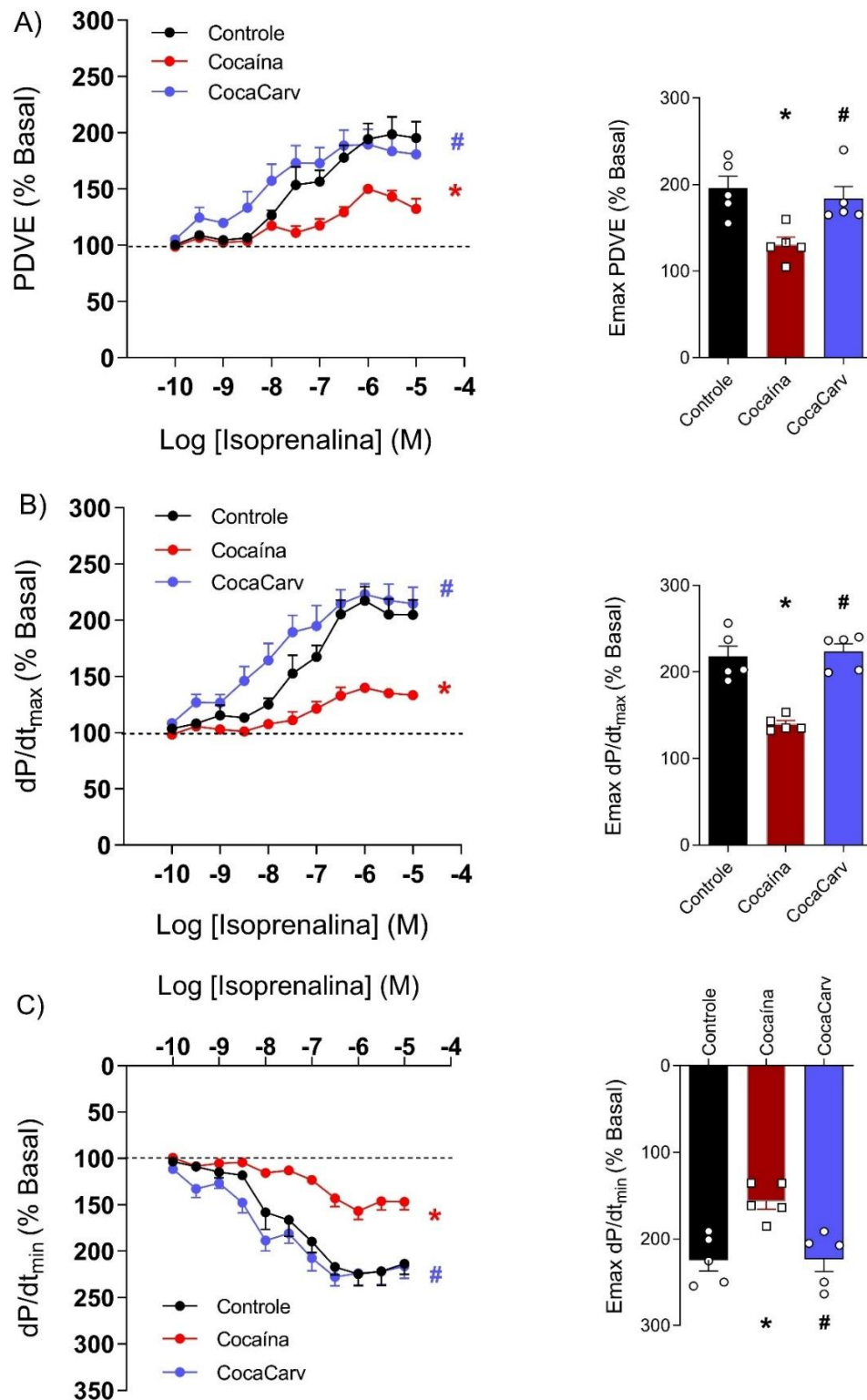


Figura 27: Efeito do tratamento com carvedilol sobre o prejuízo da resposta inotrópica à isoprenalina causado por cocaína. Curvas concentração-resposta à isoprenalina (10^{-10} a 10^{-5} mol/L) para (A) pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (B) índice de contratilidade máxima (dP/dt_{max}) e (C) índice de contratilidade mínima (dP/dt_{min}), e respectivos valores de efeito máximo (E_{max}) (gráficos à direita). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Por fim, para confirmar se os efeitos protetores do carvedilol envolvem a inibição do inflamassoma NLRP3 cardíaco, a atividade de caspase-1 *in situ* foi medida (**Figuras 28A**). O tratamento com carvedilol reduziu a ativação da caspase-1 causada pela cocaína, indicada pela menor intensidade de fluorescência verde (**Figuras 28B**).

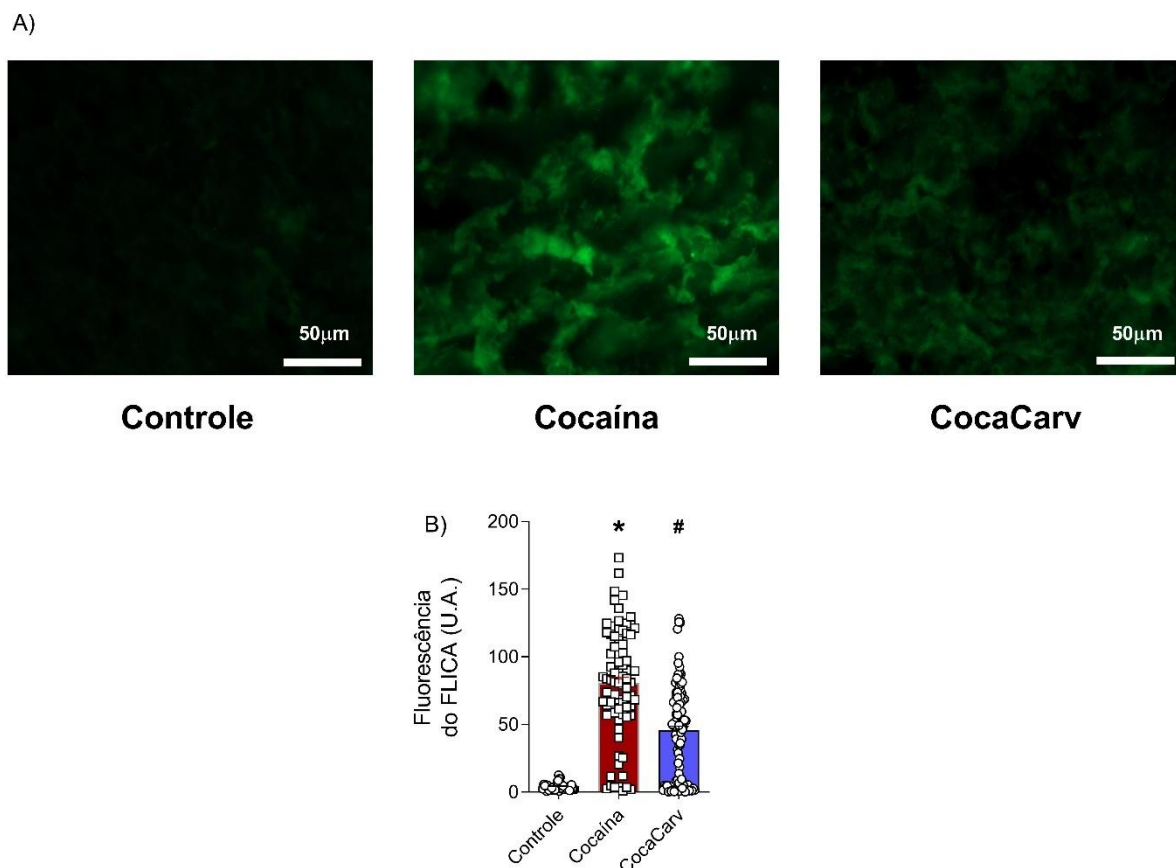


Figura 28: Efeito do tratamento com carvedilol sobre o aumento da atividade da caspase-1 cardíaca. (A) Imagens representativas de cortes transversais do VE emitindo fluorescência verde da marcação com FAM-FLICA, indicando a atividade da caspase-1 (B) Quantificação da fluorescência do FAM-FLICA. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Adicionalmente, como havíamos identificado que a cocaína causa estresse oxidativo renal (**Figura 10**), os níveis séricos de creatinina, indicador de função renal, foram determinados. O carvedilol preveniu o aumento de creatinina sérica induzido por cocaína (**Figura 29**), sugerindo um efeito protetor sobre a função dos rins.

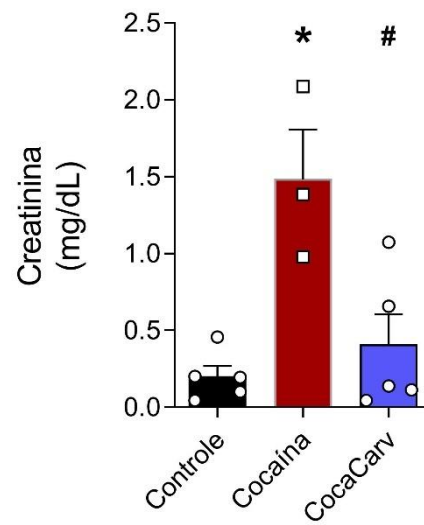


Figura 29: Efeito do tratamento com carvedilol sobre os níveis séricos de creatinina. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, em que * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Cocaína, analisados por Two-way ANOVA seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho mostra pela primeira vez, em nosso conhecimento, que a ativação do inflamassoma NLRP3 participa do dano cardíaco desencadeado por cocaína e que esse dano é mediado pelos receptores adrenérgicos. Em conjunto, propõe-se que a cocaína inibe a recaptção de catecolaminas que, por sua vez, atuam sobre os receptores adrenérgicos cardíacos, levando à ativação do inflamassoma NLRP3 e ao dano cardíaco observado. A participação do inflamassoma NLRP3 mostra-se como ponto-chave para o dano morfológico, funcional pró-oxidativo e inflamatório cardíaco causado pela cocaína.

Inicialmente, mostramos que a cocaína causa hipertrofia e remodelamento cardíaco a curto prazo (5 dias), que é mantida a médio prazo (15 dias). É importante notar que a escolha do tempo de 5 dias de cocaína foi realizada devido à manutenção da PAS nesse tempo de estudo. Por outro lado, no décimo quinto dia de cocaína, os animais desenvolveram aumento da PAS. O aumento da PAS por cocaína possui padrão de resposta tempo-dependente em dose superior (20 mg/kg/dia i.p) ao longo de 10 dias, como evidenciado por ZHU; WANG *et al.* (2018). Nossa escolha, usando menor dose e por menos tempo, visou a obtenção de resultados livres de interferência do aumento da pós-carga, representada pela maior resistência vascular periférica.

Outra diferença é que a medida de PAS realizada por ZHU; WANG *et al.* (2018) ocorria 1 hora após a administração da cocaína, refletindo, assim, os efeitos agudos da cocaína sobre o sistema cardiovascular, enquanto a cocaína ainda estava presente no organismo (ZHU; WANG *et al.*, 2018). Nós medimos o efeito da cocaína sobre a PAS 12 horas após a administração da dose, refletindo, assim, o efeito cumulativo da administração sistêmica, na ausência da droga no organismo. Dito isso, não podemos afirmar que os efeitos observados neste trabalho são independentes de alteração temporária da pós-carga e da pressão arterial, mas, podemos sugerir que os efeitos aqui observados contêm influências hemodinâmicas reduzidas do uso crônico da droga. Portanto, este seria o momento ideal para estudar os mecanismos diretos da cocaína sobre o coração. Também, é importante frisar que os efeitos sobre a PAS são, normalmente, associados ao uso de longo prazo, pois a ação de barorreceptores evita o aumento da pressão arterial de curto prazo, embora haja liberação de adrenalina induzido por cocaína (TUNCEL; WANG *et al.*, 2002). É provável que o

desequilíbrio do sistema imune participe do ponto de inflexão do estado normotenso para hipertenso crônico, como já evidenciado para diversos casos por nosso grupo de pesquisa e outros (BOMFIM; CAU *et al.*, 2019). Por isso, o estudo da participação do inflamassoma NLRP3 cardíaco, renal e vascular é de grande relevância para a fisiopatologia da doença cardiovascular desencadeada por cocaína, incluindo estudos futuros sobre a hipertensão arterial secundária ao abuso de cocaína.

Além disso, o não desenvolvimento de hipertrofia cardíaca por cocaína em fêmeas direcionou o trabalho apenas para machos. A literatura científica demonstra que fêmeas de diversas espécies, incluindo os humanos, apresentam uma proteção mais robusta às doenças cardiovasculares em comparação aos machos devido, principalmente, à ação dos hormônios sexuais femininos, especialmente o estrogênio, que possuem efeitos cardioprotetores (DAVEZAC; BUSCATO *et al.*, 2021). O estrogênio auxilia na manutenção da função endotelial, promovendo vasodilatação por meio da modulação da síntese de óxido nítrico, o que contribui para o controle da hipertensão e do remodelamento cardíaco (MURPHY, 2011). Os receptores de estrogênio, por sua vez, regulam vias metabólicas e inflamatórias, modulando a expressão de genes envolvidos na homeostase cardiovascular, o que promove perfis lipídicos mais saudáveis e menor suscetibilidade a eventos ateroscleróticos, reforçando a importância do equilíbrio hormonal feminino na prevenção de doenças cardiovasculares (FAIRWEATHER, 2014). Reconhecemos a importância dos estudos sobre dimorfismo sexual na fisiopatologia das doenças cardiovasculares; entretanto, nossos dados indicaram a necessidade de concentrar a análise nos machos, devido à sua maior suscetibilidade à mortalidade associada a essas condições.

O remodelamento cardíaco induzido pela cocaína, por sua vez, revela alterações de relevância clínica, com destaque para o aumento do peso cardíaco. A hipertrofia cardíaca é reconhecida como um importante preditor de eventos cardiovasculares adversos. O *Framingham Heart Study* (LEVY; ANDERSON *et al.*, 1987), por exemplo, reconhece a hipertrofia cardíaca como um fator de risco independente para insuficiência cardíaca e outras condições cardiovasculares graves. Assim como em nosso estudo, observou-se que usuários de cocaína em fase inicial de dependência, possuem a massa cardíaca aumentada (KOZOR; GRIEVE *et al.*, 2014) com alteração da morfologia dos cardiomiócitos (VERMA; ORME MERVE *et al.*,

2021). Este aumento do coração associado à falha cardíaca leva à morte precoce do usuário de cocaína por doença cardiovascular (ARENAS; BELTRAN *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que o remodelamento concêntrico é o mais prevalente entre usuários de cocaína (MACEIRA; RIPELL *et al.*, 2014). Contudo, as alterações observadas indicam um remodelamento em fase inicial, visto que a parede posterior do ventrículo esquerdo permaneceu inalterada, enquanto apenas os cardiomiócitos da parede interventricular (septal) estão hipertrofiados, resultando em espessamento do septo interventricular. O aumento seletivo da espessura septal pode estar relacionado à densa inervação simpática presente na parede septal cardíaca (AKSU; GUPTA *et al.*, 2021). A cocaína, ao inibir a recaptação de noradrenalina, aumenta sua biodisponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, intensificando a estimulação dos receptores adrenérgicos. Esse fenômeno pode exacerbar a atividade simpática local, onde a concentração de fibras simpáticas é maior do que o tradicional, o que poderia explicar o remodelamento septal, de maneira precoce. Estudos, também, apontam que o remodelamento do septo precede o remodelamento ventricular da parede posterior do ventrículo esquerdo e está associado ao desenvolvimento de hipertensão sistólica (GROSSMAN; GROSSMAN *et al.*, 2008), como observado, inclusive, neste trabalho, quando no décimo quinto dia de cocaína, os animais apresentaram elevada pressão arterial sistólica.

É importante notar que tanto os tratamentos com os inibidores de inflamassoma NLRP3, bem como o carvedilol, preveniram a hipertrofia cardíaca e o espessamento seletivo do septo cardíaco, indicando que a fisiopatologia do remodelamento induzido por cocaína está associada à ativação do inflamassoma NLRP3 mediada por receptores adrenérgicos. Similarmente, a reversão da hipertrofia dos cardiomiócitos foi atribuída ao antagonismo de receptores adrenérgicos (CHEN; LI *et al.*, 2012) e à inibição da ativação do inflamassoma NLRP3 (CHENG; ZHAO *et al.*, 2023) em modelos de hipertrofia cardíaca (XIE; WEI *et al.*, 2016). Mais especificamente, já foi demonstrado que a glibenclamida (CAO; WANG *et al.*, 2022) e o MCC950 (SHI; ZHAO *et al.*, 2022) atenuam a hipertrofia cardíaca e celular via inibição do inflamassoma NLRP3 ativado pelos receptores β -adrenérgicos. Não obstante, a ativação continuada do receptor α 1-adrenérgico também é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 cardíaco (XIN; WU *et al.*, 2020) e de levar à hipertrofia cardíaca (COTECCHIA; DEL VESCOVO *et al.*, 2015). Apesar de outros estudos já apontarem o carvedilol como um

inibidor da ativação do inflamassoma NLRP3 (WONG; LI *et al.*, 2018), dentro de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a unir a abordagem do uso de inibidores da ativação do inflamassoma NLRP3 (Glibenclamida, MCC950 e Carvedilol) à um contexto de proteção cardíaca associada ao uso de cocaína e, por conseguinte, ativação exagerada de receptores adrenérgicos no coração.

Ao contrário de estudos como o de Wang *et al.* (2022), que indicam que a ativação do inflamassoma NLRP3 resulta em aumento da massa ventricular associada à fibrose (WANG; ZHAO *et al.*, 2022), este trabalho não observou fibrose. Apesar disso, foi possível observar, durante experimentos, que o coração de animais do grupo Cocaína era digerido de forma mais fácil, tanto em experimentos com collagenases (para isolamento dos cardiomiócitos), como com proteinases (para o experimento de expressão gênica). Isso nos sugere que a matriz extracelular estava alterada. Como limitação deste trabalho, entendemos que seria interessante investigar por outras técnicas a composição da matriz extracelular. Além disso, reconhecemos que seria interessante separar a investigação entre parede ventricular esquerda e parede interventricular, como foi feito com o diâmetro de cardiomiócitos. Em modelos animais com dose maior (20mg/kg), foi encontrada fibrose pericárdica (DUYSEN; LI *et al.*, 2008). Em autópsias de usuários crônicos de cocaína é frequente a observação de fibrose perivascular (DAMIÁN SÁNCHEZ-QUINTANA, 2022), mas apenas 21% de casos apresentam fibrose miocárdica (RAJAB; STEARNS *et al.*, 2008). Sendo assim, independentemente da duração da administração de cocaína, é possível que a fibrose cardíaca seja desencadeada em alguns indivíduos, enquanto em outros isso não ocorra.

Os achados eletrocardiográficos em pacientes usuários de cocaína são frequentemente representativos de um quadro de hiperatividade simpática e de isquemia miocárdica, refletindo a ação farmacológica da droga sobre o sistema cardiovascular (TISDALE; CHUNG *et al.*, 2020). Contudo, no nosso modelo não foram encontrados achados eletrocardiográficos significativos. A redução da duração da onda P, que reflete a despolarização atrial, observada no grupo Cocaína, indica uma alteração na propagação do impulso elétrico atrial. Esse achado sugere que a cocaína pode acelerar a condução elétrica nas fibras atriais. Porém, nenhuma alteração da condutibilidade elétrica ventricular foi observada. Essa ausência de alterações eletrocardiográficas possivelmente se relaciona ao curto período e à dose moderada

de cocaína, que não foram suficientes para desencadear o remodelamento elétrico ventricular. É importante mencionar que a ausência de alterações nos intervalos PR, QRS e QT sugere que, nesse regime de administração, a cocaína não provoca bloqueio ventricular dos canais para Na^+ ou K^+ .

Por outro lado, alterações notórias na função cardíaca foram observadas. No basal, foi constatada elevação da PDVE e dos índices de contratilidade máxima e mínima ($\text{dP/dt}_{\text{max}}$ e $\text{dP/dt}_{\text{min}}$) no modelo *ex vivo* e elevação da fração de encurtamento, bem como da velocidade de contração dos cardiomiócitos isolados. Esse dado é extremamente relevante do ponto de vista de entendimento do quadro fisiopatológico cardíaco e sugere que o hiperdinamismo contrátil precede o dano à excitação. Além de concordantes, eles ainda contribuem para o entendimento da razão pela qual foi observada hipertrofia cardíaca com espessamento septal. Esse fenômeno sugere que o coração se encontra em um estado de ativação exacerbada no repouso, que pode ser interpretado como uma resposta adaptativa a estímulos prolongados de estresse em resposta à cocaína. No entanto, essa adaptação inicial, embora beneficie o desempenho cardíaco a curto prazo, pode, em longo prazo, contribuir para a sobrecarga mecânica e bioquímica do miocárdio. Além disso, o aumento da contratilidade basal pode implicar em maior consumo de energia pelos cardiomiócitos, elevando a demanda metabólica, o que, pode culminar em angina e disfunção progressiva do miocárdio (ARENAS; BELTRAN *et al.*, 2020).

É importante notar que a ativação do inflamassoma NLRP3 mediado por receptores adrenérgicos parece ser parte fundamental para o problema cardíaco observado. Isto é, quando os inibidores do inflamassoma NLRP3 ou o carvedilol foram utilizados em conjunto à cocaína, o efeito de aumento basal da contratilidade foi prevenido. Se prolongado o desafio com a cocaína, é possível que esse estado de contração exacerbada evoluísse para um quadro de redução da sinalização intracelular, comprometimento da maquinaria contrátil e diminuição da função sistólica, como já evidenciado em modelos mais crônicos (WANG; REN *et al.*, 2001). Porém, aqui, temos a evidência experimental de que o início do problema pode estar relacionado a um quadro de hiperatividade celular e tecidual desencadeado pela ativação exacerbada de receptores adrenérgicos e potencializado pelos danos inflamatórios desencadeados pelo inflamassoma NLRP3. Por fim, também trazemos, pela primeira vez, a evidência de que o tratamento preventivo com os inibidores do

inflamassoma NLRP3 ou com o carvedilol podem mitigar os efeitos negativos do quadro de hiperatividade cardíaca basal desencadeada pela cocaína.

Nenhuma alteração de FC foi observada, tanto *in vivo* (animais anestesiados) como no modelo *ex vivo*. Como efeito agudo da cocaína, observa-se o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial sistêmica (SCHWARTZ; REZKALLA *et al.*, 2010). Isso é fruto, principalmente, da vasoconstrição mediada por receptor α_1 -adrenérgico em vasos de resistência, somada à ativação de receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos. Promove-se, portanto, efeito cronotrópico, dromotrópico, inotrópico positivo, o que resulta em elevação na resistência vascular periférica somada ao aumento do débito cardíaco e, conseqüentemente, da pressão arterial sistêmica. Entretanto, similarmente ao nosso trabalho, ZHU; WANG *et al.* (2018) também não observaram alteração na FC em camundongos submetidos a uma dose maior de cocaína (20mg/kg) por 10 dias, mesmo com aumento da PAS (ZHU; WANG *et al.*, 2018). Desta forma, fica evidente que, neste modelo, os efeitos sobre a frequência estão de acordo ao evidenciado pela literatura.

Por fim, o aumento da PP no primeiro experimento mostrou-se um evento com grande variabilidade entre grupos, sem reprodutibilidade entre protocolos, indicando a necessidade de um número amostral maior para sua comprovação. Apesar dessa variabilidade, a elevação da PP, que reflete elevada resistência vascular coronariana, possui relevância clínica. O aumento da resistência vascular coronariana, em resposta a uma elevada demanda energética, pode reduzir o fluxo sanguíneo ao miocárdio, predispondo ao desenvolvimento de angina e IAM (LANGE; HILLIS, 2001).

O carvedilol é um antagonista misto de receptores adrenérgicos [β_2 (13 vezes) > β_1 (7 vezes) > α_1 (MOLENAAR; CHRIST *et al.*, 2006; YOSHIKAWA; PORT *et al.*, 1996)] e, por isso, apresenta-se como uma escolha assertiva para o estudo sobre o papel do inflamassoma NLRP3 no dano cardíaco desencadeado por cocaína. Principalmente, pois a cocaína diminui a densidade de receptores β de membrana (WANG; GAUVIN *et al.*, 1996) e o receptor α_1 participa diretamente do dano cardíaco desencadeado por cocaína (ISABELLE; MONTEIL *et al.*, 2005). Ademais, o inflamassoma NLRP3 pode ser ativado tanto por receptores β (SHI; ZHAO *et al.*, 2022), como α_1 (XIN; WU *et al.*, 2020) no coração. De fato, observamos que o carvedilol melhorou os danos cardíacos associados à cocaína concomitantemente à inibição do inflamassoma NLRP3 no coração. Diante da ativação exacerbada dos

receptores adrenérgicos induzida pela cocaína, o carvedilol surge como uma estratégia terapêutica evidente para modular os efeitos deletérios decorrentes da hiperatividade simpática.

Atualmente, o carvedilol já é indicado no tratamento de doenças cardiovasculares associadas ao uso da cocaína (ANDERSON; ADAMS *et al.*, 2007), sendo este o primeiro trabalho a evidenciar o benefício da prevenção da ativação do inflamassoma NLRP3, com consequente melhora da função cardíaca. O carvedilol está sendo testado, em fase clínica IIb, como principal opção terapêutica para pacientes oncológicos com risco de insuficiência cardíaca mediada por altas doses de antraciclina, sendo um dos medicamentos mais seguros do mercado (ARMENIAN; HUDSON *et al.*, 2024). Não obstante, o resultado sobre a função cardíaca sob estresse farmacológico *ex vivo* foi surpreendente com o carvedilol. Neste caso, a inibição do inflamassoma NLRP3 parece estar diretamente ligada ao benefício do carvedilol sobre a disfunção cardíaca causada por cocaína, visto que mimetizou os efeitos do MCC950.

Apesar do aumento da função basal, o grupo Cocaína apresentou uma resposta diminuída ao estresse farmacológico induzido por agonista β -adrenérgico *ex vivo*. Em contrapartida, animais tratados com os inibidores do inflamassoma NLRP3 e com o Carvedilol retornaram as respostas às máximas do Controle. O uso contínuo de cocaína pode, portanto, causar falha em suprir o organismo de sangue sob situação de luta ou fuga. Majoritariamente, a resposta cardíaca a catecolaminas é mediada por receptores do subtipo β_1 , que ativam a via metabotrópica da proteína Gs, com aumento de AMPc e subsequente ativação da PKA, que promove fosforilação de canais ligados ao cálcio intra e extracelular. Essa diminuição na resposta à estimulação β -adrenérgica pode, portanto, trazer prejuízos de débito cardíaco, contribuindo, juntamente com outros fatores, para eventos isquêmicos secundários à cocaína (MCCORD; JNEID *et al.*, 2008). Visto que o estímulo inotrópico com o deslanosídeo evidenciou que a maquinaria contrátil está preservada nos camundongos que receberam cocaína, é possível que a menor resposta β -adrenérgica nos corações isolados seja devido à prejuízo específico sobre a sinalização adrenérgica cardíaca. Todavia, os experimentos com glibenclamida e MCC950 demonstram que o inflamassoma NLRP3 compromete a sinalização adrenérgica cardíaca. Os resultados obtidos com carvedilol, por sua vez, indicam que

o efeito ativador do inflamassoma induzido pela cocaína é mediado pelos receptores adrenérgicos. Dessa forma, evidencia-se uma cadeia de eventos na qual a ativação dos receptores adrenérgicos promove a ativação do inflamassoma, que, em contrapartida, interfere na sinalização adrenérgica.

Um dos mecanismos possíveis do prejuízo da resposta adrenérgica é o aumento de EROs. Em corações insuficientes, o estresse oxidativo local se correlaciona com a disfunção ventricular esquerda. As EROs afetam negativamente o manejo do cálcio miocárdico, causam arritmia e contribuem para o remodelamento cardíaco, induzindo sinais de hipertrofia, apoptose e necrose (MUNZEL; CAMICI *et al.*, 2017). Evidenciou-se que a cocaína aumenta a produção de EROs e diminui a proteção antioxidante. Mais especificamente, foi observado o aumento da concentração de EROs no córtex renal e em cardiomiócitos isolados, bem como redução da atividade da SOD e da catalase nestes tecidos. Interessantemente, relata-se que o MCC950 reduz EROs e, por consequência, melhora a função cardíaca de camundongos com doença cardíaca induzida por isoprenalina (SHI; ZHAO *et al.*, 2022). Similarmente, carvedilol (NAKAMURA; KUSANO *et al.*, 2002) e glibenclamida (MIRANDA E CASTOR; BRUNO *et al.*, 2024) recuperaram a função cardíaca por um mecanismo envolvendo a redução de EROs. Nosso grupo demonstrou que a glibenclamida melhora a função cardíaca *in vivo* e *ex vivo* ao reduzir EROs e inibir o inflamassoma NLRP3 induzida por consumo de açúcar (MIRANDA E CASTOR; BRUNO *et al.*, 2024).

Neste cenário, vale realçar que a deficiência de SOD permite o acúmulo do ânion superóxido (O_2^-), que pode danificar diretamente estruturas e interferir em vias de sinalização, bem como reagir com óxido nítrico (NO) para formar o peroxinitrito (ONOO^-), que é extremamente danoso à função cardíaca (GERDES; YANG *et al.*, 2020). O ONOO^- é classicamente conhecido por diminuir a função mitocondrial (SCHULZ; DODGE *et al.*, 1997), induzir expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β (FERDINANDY; DANIAL *et al.*, 2000), ativar o inflamassoma NLRP3 (LAN; TAO *et al.*, 2020) e reduzir a função cardíaca (BUTTS; GARY *et al.*, 2015; UMAR; VAN DER LAARSE, 2010). No caso da catalase, a principal função é a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), evitando o acúmulo de peróxido de hidrogênio, que é tóxico para as células (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970). O peróxido de hidrogênio, além de ser uma

ERO, gera radicais livres altamente reativos, como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), que causam danos ao DNA, proteínas e lipídios celulares (HAIZLIP; HIRANANDANI *et al.*, 2012).

Os camundongos com deleção dos genes do receptor NLRP3 e da enzima caspase-1 permitiram demonstrar quão essencial o inflamassoma NLRP3 é para o desenvolvimento de fator de risco (hipertrofia) de doença cardíaca associada à alteração nas barreiras antioxidantes. A deleção genética preveniu a diminuição das barreiras antioxidantes e, por consequência, a concentração de ânion superóxido, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila nas células cardíacas, evitando a hipertrofia cardíaca mediada por cocaína.

Um dos possíveis mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3 é o aumento de EROs mediado pela cocaína. EROs podem ativar diretamente o inflamassoma NLRP3 (BAI; YANG *et al.*, 2018) e levar ao dano celular e à redução da função cardíaca (LIU; WANG *et al.*, 2024). Neste trabalho, evidenciamos que a cocaína promove a elevação de EROs associada à ativação do inflamassoma NLRP3 e ao aumento da expressão gênica para pró-IL1 β . Ao inibir a ativação do inflamassoma NLRP3, com MCC950, os níveis de EROs diminuíram e a função retornou para níveis do Controle, tanto no basal, como sob estresse farmacológico. Interessantemente, apenas o MCC950 foi capaz de retornar a expressão gênica da pró-IL-1 β para níveis do Controle. Apesar de demonstrado na literatura que o MCC950 seria capaz de suprimir a expressão gênica de pró-IL-1 β (MATSUOKA; YOSHIMATSU *et al.*, 2020), esperávamos que a glibenclamida também seria capaz de fazê-lo. Contudo, a glibenclamida mostrou-se menos eficaz que o MCC950 também em outros parâmetros avaliados. Essa redução de eficácia em comparação ao MCC950 pode estar relacionada à ação da glibenclamida em outros alvos moleculares, cuja investigação, no entanto, não estava no escopo deste trabalho.

A nível celular, observamos que os cardiomiócitos provenientes do grupo Cocaína estavam hiper-reativos no basal, assim como observado no modelo *ex vivo*. Surpreendentemente, a expressão total de receptores β 1-adrenérgicos estava preservada e a resposta à isoprenalina elevada em relação aos cardiomiócitos Controle. Estes resultados sugerem que há uma adaptação celular à cocaína que, porém, não se reflete no coração como um todo. Como a análise de função celular é realizada apenas em células que estão visualmente preservadas e que respondem

com velocidade constante a dez ciclos de contração e relaxamento ininterruptamente, é possível que os cardiomiócitos que se adaptaram positivamente ao desafio com cocaína tenham sido selecionados e aqueles que sofreram maior dano tenham sido desconsiderados. Isso sugere que a piora da resposta de corações isolados do grupo Cocaína à isoprenalina é o somatório das repostas de células adaptadas e danificadas.

Os cardiomiócitos do grupo Cocaína também responderam mais ao estímulo com fenilefrina, mesmo com expressão de receptores α -adrenérgicos abaixo do limite de detecção. Interessantemente, a ativação dos receptores α -adrenérgicos diminuiu a fração de encurtamento no grupo cocaína. Dados similares, da menor função contrátil de miócitos cardíaco estimulados com fenilefrina, foram explicados pelo prejuízo enérgico induzido pela sinalização α (GERAETS; COUMANS *et al.*, 2021). Vale realçar que os tratamentos com MCC950 e glibenclamida reverteram a hiperresponsividade celular aos estímulos farmacológicos, mostrando a participação do inflamassoma NLRP3 nas alterações de sinalização adrenérgica causadas por cocaína.

Outra modificação de sinalização alterada pela cocaína está associada ao cálcio intracelular. Foi observada uma redução do transiente de cálcio nos animais que receberam a cocaína. Este resultado condiz com a literatura que indica que a cocaína é capaz de reduzir o transiente de cálcio em cardiomiócitos (RENARD; DELAVILLE *et al.*, 1994) e corrobora a menor resposta inotrópica à isoprenalina em corações isolados. É de se notar que o maior sinal basal (F_0) sugere um aumento da concentração citoplasmática de cálcio no repouso, que pode ser reflexo de modificações da recaptação ou liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e também já foi demonstrado por LATTANZIO; TIANGCO *et al.* (2005). O inflamassoma é um receptor de reconhecimento de padrões moleculares ligado ao perigo e pode ser ativado por sensores de cálcio, como o receptor sensível ao cálcio (CaSR) (JAGER; MURTHY *et al.*, 2020). Este receptor realiza tanto a comunicação com o cálcio extracelular, como intracelular (CHU; QIN *et al.*, 2022). Foi demonstrado por LEE; SUBRAMANIAN *et al.* (2012) que o CaSR murino ativa o inflamassoma NLRP3, mediado pelo aumento de Ca^{2+} intracelular e pela diminuição de AMP cíclico (cAMP). Talvez, a redução da movimentação do cálcio, com acúmulo citoplasmático, tenha

desencadeado a ativação do inflamassoma NLRP3 devido a esta comunicação direta com o receptor CaSR.

Em nosso modelo, os níveis de SERCA2a não foram reduzidos pela cocaína, contrariando o achado de WANG; YAN *et al.* (2002), que demonstraram redução de SERCA2a desencadeada pela cocaína. Isso pode ter ocorrido pois WANG; YAN *et al.* (2002) utilizou modelo com dose maior (30mg/kg i.p.) e por tempo mais prolongado (14 dias). Isso indica que a redução do transiente ocorre por um mecanismo distinto, não relacionado à atividade da SERCA2a. Como demonstrado neste estudo, a produção de EROs está aumentada em animais que receberam cocaína. Por sua vez, a oxidação de *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II* (CaMKII) aumenta a fosforilação do canal de rianodina, promovendo maior permeabilidade ao cálcio do retículo sarcoplasmático (HO; LIU *et al.*, 2014; WANG; HERNANDEZ-OCHOA *et al.*, 2021), acúmulo do cálcio no citoplasma e menor transiente, por consequência (CHIN; CHEN *et al.*, 2024). Por sinal, foi demonstrado que o MCC950, ao inibir o inflamassoma NLRP3, evita esses prejuízos (CHIN; CHEN *et al.*, 2024), assim como demonstrado em nosso trabalho. Ainda, apesar de menor transiente, aparentemente, as células provenientes de camundongos que receberam cocaína estão mais sensíveis ao cálcio ali acumulado, visto o ganho de função observado *ex vivo* (no basal) e nos parâmetros celulares.

Por fim, como um dos principais achados deste trabalho, o carvedilol apresenta-se como um inibidor da ativação do inflamassoma NLRP3 por cocaína, indicando que esta é mediada por receptores adrenérgicos. Mostra-se que o carvedilol mimetizou os efeitos cardioprotetores dos inibidores do inflamassoma NLRP3, MCC950 e glibenclamida e reduziu o aumento da atividade da caspase-1 causado por cocaína. O carvedilol ao inibir a ativação de inflamassoma NLRP3 induzida por cocaína, não apenas melhorou a morfometria e a função cardíaca, como já discutido, mas também a função renal. Isso demonstra que o organismo, em geral, foi beneficiado pelas ações de antagonismo misto dos receptores adrenérgicos, especialmente, protegido dos efeitos deletérios da cocaína sobre rim e coração. Além disso, nossos dados estão de acordo com as recomendações clínicas do uso de antagonistas mistos dos receptores adrenérgicos para o tratamento das complicações cardiovasculares secundárias ao uso de cocaína (RICHARDS; HOLLANDER *et al.*, 2017), além de elucidar um novo mecanismo de ação que justifique esta indicação.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o inflamassoma NLRP3 possui papel central no dano cardíaco causado por cocaína. A cocaína desencadeia disfunções cardíacas e renais, bem como modificações morfológicas, inflamatórias no coração via ativação do inflamassoma NLRP3, uma vez que os inibidores foram capazes de prevenir esses prejuízos. O efeito da cocaína sobre o coração parece ocorrer por meio de receptores adrenérgicos, visto que o antagonista misto dos receptores adrenérgicos, carvedilol, inibiu a atividade do inflamassoma NLRP3 e preveniu os danos cardíacos causados pela cocaína. Por fim, nossos dados encorajam estudos clínicos com inibidores do inflamassoma NLRP3 para o tratamento de problemas cardíacos secundários ao uso de cocaína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, R. R.; MADRUGA, C. S.; RIBEIRO, M.; PINSKY, I. *et al.* Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian national alcohol and drugs survey (BNADS). **Addict Behav**, 39, n. 1, p. 297-301, Jan 2014.

AKSU, T.; GUPTA, D.; PAUZA, D. H. Anatomy and Physiology of Intrinsic Cardiac Autonomic Nervous System: Da Vinci Anatomy Card #2. **JACC Case Rep**, 3, n. 4, p. 625-629, Apr 2021.

ANDERSON, J. L.; ADAMS, C. D.; ANTMAN, E. M.; BRIDGES, C. R. *et al.* ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. **J Am Coll Cardiol**, 50, n. 7, p. e1-e157, Aug 14 2007.

ARENAS, D. J.; BELTRAN, S.; ZHOU, S.; GOLDBERG, L. R. Cocaine, cardiomyopathy, and heart failure: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 19795, Nov 13 2020.

ARMENIAN, S. H.; HUDSON, M. M.; LINDENFELD, L.; CHEN, S. *et al.* Effect of carvedilol versus placebo on cardiac function in anthracycline-exposed survivors of childhood cancer (PREVENT-HF): a randomised, controlled, phase 2b trial. **Lancet Oncol**, 25, n. 2, p. 235-245, Feb 2024.

BAE, S.; GILBERT, R. D.; DUCSAY, C. A.; ZHANG, L. Prenatal cocaine exposure increases heart susceptibility to ischaemia-reperfusion injury in adult male but not female rats. **J Physiol**, 565, n. Pt 1, p. 149-158, May 15 2005.

BAI, H.; YANG, B.; YU, W.; XIAO, Y. *et al.* Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome. **Exp Cell Res**, 362, n. 1, p. 180-187, Jan 1 2018.

BIONDICH, A. S.; JOSLIN, J. D. Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. **Emerg Med Int**, 2016, p. 4048764, 2016.

BOMFIM, G. F.; CAU, S. B. A.; BRUNO, A. S.; FEDOCE, A. G. *et al.* Hypertension: a new treatment for an old disease? Targeting the immune system. **Br J Pharmacol**, 176, n. 12, p. 2028-2048, Jun 2019.

BRODY, S. L.; SLOVIS, C. M.; WRENN, K. D. Cocaine-related medical problems: consecutive series of 233 patients. **Am J Med**, 88, n. 4, p. 325-331, Apr 1990.

BRUNO, A. S.; CASTOR, R. G. M.; BERG, B.; DOS REIS COSTA, D. E. F. *et al.* Cardiac disturbances and changes in tissue cytokine levels in mice fed with a high-refined carbohydrate diet. **Cytokine**, 166, p. 156192, Jun 2023.

BUTTS, B.; GARY, R. A.; DUNBAR, S. B.; BUTLER, J. The Importance of NLRP3 Inflammasome in Heart Failure. **J Card Fail**, 21, n. 7, p. 586-593, Jul 2015.

CALATAYUD, J.; GONZALEZ, A. History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. **Anesthesiology**, 98, n. 6, p. 1503-1508, Jun 2003.

CAO, N.; WANG, J. J.; WU, J. M.; XU, W. L. *et al.* Glibenclamide alleviates beta adrenergic receptor activation-induced cardiac inflammation. **Acta Pharmacol Sin**, 43, n. 5, p. 1243-1250, May 2022.

CARTWRIGHT, W. S. Cocaine medications, cocaine consumption and societal costs. **Pharmacoeconomics**, 18, n. 4, p. 405-413, Oct 2000.

CAU, S. B.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; SILVA, M. B.; RAMALHO, F. N. Z. *et al.* Angiotensin-II activates vascular inflammasome and induces vascular damage. **Vascul Pharmacol**, 139, p. 106881, Aug 2021.

CAU, S. B.; GUIMARAES, D. A.; RIZZI, E.; CERON, C. S. *et al.* The Nuclear Factor kappaB Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents Cardiac Remodelling and Matrix Metalloproteinase-2 Up-Regulation in Renovascular Hypertension. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 117, n. 4, p. 234-241, Oct 2015.

CHEN, B.; LI, Y.; JIANG, S.; XIE, Y. P. *et al.* beta-Adrenergic receptor antagonists ameliorate myocyte T-tubule remodeling following myocardial infarction. **FASEB J**, 26, n. 6, p. 2531-2537, Jun 2012.

CHENG, X.; ZHAO, H.; WEN, X.; LI, G. *et al.* NLRP3-inflammasome inhibition by MCC950 attenuates cardiac and pulmonary artery remodelling in heart failure with preserved ejection fraction. **Life Sci**, 333, p. 122185, Nov 15 2023.

CHIN, C. G.; CHEN, Y. C.; LIN, F. J.; LIN, Y. K. *et al.* Targeting NLRP3 signaling reduces myocarditis-induced arrhythmogenesis and cardiac remodeling. **J Biomed Sci**, 31, n. 1, p. 42, Apr 22 2024.

CHIVERO, E. T.; THANGARAJ, A.; TRIPATHI, A.; PERIYASAMY, P. *et al.* NLRP3 Inflammasome Blockade Reduces Cocaine-Induced Microglial Activation and Neuroinflammation. **Mol Neurobiol**, 58, n. 5, p. 2215-2230, May 2021.

CHU, H.; QIN, Z.; MA, J.; XIE, Y. *et al.* Calcium-Sensing Receptor (CaSR)-Mediated Intracellular Communication in Cardiovascular Diseases. **Cells**, 11, n. 19, Sep 30 2022.

COLL, R. C.; HILL, J. R.; DAY, C. J.; ZAMOSHNIKOVA, A. *et al.* MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. **Nat Chem Biol**, 15, n. 6, p. 556-559, Jun 2019.

COTECCHIA, S.; DEL VESCOVO, C. D.; COLELLA, M.; CASO, S. *et al.* The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: signaling mechanisms and functional implications. **Cell Signal**, 27, n. 10, p. 1984-1993, Oct 2015.

DAGENAIS, G. R.; LEONG, D. P.; RANGARAJAN, S.; LANAS, F. *et al.* Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. **Lancet**, 395, n. 10226, p. 785-794, Mar 7 2020.

DAMIÁN SÁNCHEZ-QUINTANA, S. A., Yolanda Macías, José-Ángel Cabrera. Histopathological and Quantitative Lesions of the Cardiac Conduction System and Its Vascularization Related to Chronic Cocaine Abusers and Sudden Unexpected Death. **Forensic Sciences**, 2, n. 2, 2022.

DAVEZAC, M.; BUSCATO, M.; ZAHREDDINE, R.; LACOLLEY, P. *et al.* Estrogen Receptor and Vascular Aging. **Front Aging**, 2, p. 727380, 2021.

DE BARROS, G. M.; DIEHL, A.; DE MOURA, A. A. M.; MIASSO, A. I. *et al.* The Perceptions of Domestic Violence by a Family Member Who Uses Crack or Cocaine: A Secondary Retrospective Cross-Sectional Study. **Int J Environ Res Public Health**, 19, n. 10, May 23 2022.

DE MIGUEL, C.; PELEGRIN, P.; BAROJA-MAZO, A.; CUEVAS, S. Emerging Role of the Inflammasome and Pyroptosis in Hypertension. **Int J Mol Sci**, 22, n. 3, Jan 21 2021.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiol Rev**, 50, n. 3, p. 319-375, Jul 1970.

DU, C.; PARK, K.; ALLEN, C. P.; HU, X. T. *et al.* Ca(2+) channel blockade reduces cocaine's vasoconstriction and neurotoxicity in the prefrontal cortex. **Transl Psychiatry**, 11, n. 1, p. 459, Sep 6 2021.

DUAN, M.; SUN, L.; HE, X.; WANG, Z. *et al.* Medicinal chemistry strategies targeting NLRP3 inflammasome pathway: A recent update from 2019 to mid-2023. **Eur J Med Chem**, 260, p. 115750, Nov 15 2023.

DUYSEN, E. G.; LI, B.; CARLSON, M.; LI, Y. F. *et al.* Increased hepatotoxicity and cardiac fibrosis in cocaine-treated butyrylcholinesterase knockout mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 103, n. 6, p. 514-521, Dec 2008.

FAIRWEATHER, D. Sex differences in inflammation during atherosclerosis. **Clin Med Insights Cardiol**, 8, n. Suppl 3, p. 49-59, 2014.

FAN, L.; SAWBRIDGE, D.; GEORGE, V.; TENG, L. *et al.* Chronic cocaine-induced cardiac oxidative stress and mitogen-activated protein kinase activation: the role of Nox2 oxidase. **J Pharmacol Exp Ther**, 328, n. 1, p. 99-106, Jan 2009.

FERDINANDY, P.; DANIAL, H.; AMBRUS, I.; ROTHERY, R. A. *et al.* Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. **Circ Res**, 87, n. 3, p. 241-247, Aug 4 2000.

FERNANDEZ-CASTILLO, N.; CABANA-DOMINGUEZ, J.; COROMINAS, R.; CORMAND, B. Molecular genetics of cocaine use disorders in humans. **Mol Psychiatry**, 27, n. 1, p. 624-639, Jan 2022.

FOX, E. R.; TAYLOR, J.; TAYLOR, H.; HAN, H. *et al.* Left ventricular geometric patterns in the Jackson cohort of the Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) Study: clinical correlates and influences on systolic and diastolic dysfunction. **Am Heart J**, 153, n. 2, p. 238-244, Feb 2007.

GANAU, A.; DEVEREUX, R. B.; ROMAN, M. J.; DE SIMONE, G. *et al.* Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. **J Am Coll Cardiol**, 19, n. 7, p. 1550-1558, Jun 1992.

GERAETS, I. M. E.; COUMANS, W. A.; STRZELECKA, A.; SCHONLEITNER, P. *et al.* Metabolic Interventions to Prevent Hypertrophy-Induced Alterations in Contractile Properties In Vitro. **Int J Mol Sci**, 22, n. 7, Mar 31 2021.

GERDES, H. J.; YANG, M.; HEISNER, J. S.; CAMARA, A. K. S. *et al.* Modulation of peroxynitrite produced via mitochondrial nitric oxide synthesis during Ca(2+) and succinate-induced oxidative stress in cardiac isolated mitochondria. **Biochim Biophys Acta Bioenerg**, 1861, n. 12, p. 148290, Dec 1 2020.

GROSSMAN, C.; GROSSMAN, A.; KOREN-MORAG, N.; AZARIA, B. *et al.* Interventricular septum thickness predicts future systolic hypertension in young healthy pilots. **Hypertens Res**, 31, n. 1, p. 15-20, Jan 2008.

GRZYBOWSKI, A. [The history of cocaine in medicine and its importance to the discovery of the different forms of anaesthesia]. **Klin Oczna**, 109, n. 1-3, p. 101-105, 2007.

GUIDA, C. R.; MAIA, J. M.; FERREIRA, L. F. R.; RAHDAR, A. *et al.* Advancements in addressing drug dependence: A review of promising therapeutic strategies and interventions. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 134, p. 111070, Aug 30 2024.

HAIZLIP, K. M.; HIRANANDANI, N.; BIESIADECKI, B. J.; JANSSEN, P. M. Impact of hydroxyl radical-induced injury on calcium handling and myofilament sensitivity in isolated myocardium. **J Appl Physiol** (1985), 113, n. 5, p. 766-774, Sep 1 2012.

HALE, S. L.; ALKER, K. J.; REZKALLA, S. H.; EISENHAEUER, A. C. *et al.* Nifedipine protects the heart from the acute deleterious effects of cocaine if administered before but not after cocaine. **Circulation**, 83, n. 4, p. 1437-1443, Apr 1991.

HALL, F. S.; SORA, I.; DRGONOVA, J.; LI, X. F. *et al.* Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. **Ann N Y Acad Sci**, 1025, p. 47-56, Oct 2004.

HARGRAVE, B. Y.; TIANGCO, D. A.; LATTANZIO, F. A.; BEEBE, S. J. Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB in transiently cotransfected heart cells. **Cardiovasc Toxicol**, 3, n. 2, p. 141-151, 2003.

HE, J.; XIAO, Y.; ZHANG, L. Cocaine induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol**, 35, n. 4, p. 572-580, Apr 2000.

HENNING, R. J.; CUEVAS, J. Cocaine activates calcium/calmodulin kinase II and causes cardiomyocyte hypertrophy. **J Cardiovasc Pharmacol**, 48, n. 1, p. 802-813, Jul 2006.

HO, H. T.; LIU, B.; SNYDER, J. S.; LOU, Q. *et al.* Ryanodine receptor phosphorylation by oxidized CaMKII contributes to the cardiotoxic effects of cardiac glycosides. **Cardiovasc Res**, 101, n. 1, p. 165-174, Jan 1 2014.

HOFFMAN, R. S. Treatment of patients with cocaine-induced arrhythmias: bringing the bench to the bedside. **Br J Clin Pharmacol**, 69, n. 5, p. 448-457, May 2010.

IRIZAR, P.; PUDDEPHATT, J. A.; GAGE, S. H.; FALLON, V. *et al.* The prevalence of hazardous and harmful alcohol use across trauma-exposed occupations: A meta-analysis and meta-regression. **Drug Alcohol Depend**, 226, p. 108858, Sep 1 2021.

ISABELLE, M.; MONTEIL, C.; MORITZ, F.; DAUTREAUX, B. *et al.* Role of alpha1-adrenoreceptors in cocaine-induced NADPH oxidase expression and cardiac dysfunction. **Cardiovasc Res**, 67, n. 4, p. 699-704, Sep 1 2005.

JAGER, E.; MURTHY, S.; SCHMIDT, C.; HAHN, M. *et al.* Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome response to calcein particles drives inflammation in rheumatoid arthritis. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 4243, Aug 25 2020.

Jl, N.; Ql, Z.; WANG, Y.; YANG, X. *et al.* Pyroptosis: A New Regulating Mechanism in Cardiovascular Disease. **J Inflamm Res**, 14, p. 2647-2666, 2021.

KAUFMAN, M. J.; LEVIN, J. M.; ROSS, M. H.; LANGE, N. *et al.* Cocaine-induced cerebral vasoconstriction detected in humans with magnetic resonance angiography. **JAMA**, 279, n. 5, p. 376-380, Feb 4 1998.

KEHAT, I.; DAVIS, J.; TIBURCY, M.; ACCORNERO, F. *et al.* Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. **Circ Res**, 108, n. 2, p. 176-183, Jan 21 2011.

KEHAT, I.; MOKKENTIN, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. **Circulation**, 122, n. 25, p. 2727-2735, Dec 21 2010.

KIM, S. T.; PARK, T. Acute and Chronic Effects of Cocaine on Cardiovascular Health. **Int J Mol Sci**, 20, n. 3, Jan 29 2019.

KLONER, R. A.; HALE, S.; ALKER, K.; REZKALLA, S. The effects of acute and chronic cocaine use on the heart. **Circulation**, 85, n. 2, p. 407-419, Feb 1992.

KOZOR, R.; GRIEVE, S. M.; BUCHHOLZ, S.; KAYE, S. *et al.* Regular cocaine use is associated with increased systolic blood pressure, aortic stiffness and left ventricular mass in young otherwise healthy individuals. **PLoS One**, 9, n. 4, p. e89710, 2014.

KRUEGER, D. D.; HOWELL, J. L.; OO, H.; OLAUSSON, P. *et al.* Prior chronic cocaine exposure in mice induces persistent alterations in cognitive function. **Behav Pharmacol**, 20, n. 8, p. 695-704, Dec 2009.

LADRON DE GUEVARA-MIRANDA, D.; MILLON, C.; ROSELL-VALLE, C.; PEREZ-FERNANDEZ, M. *et al.* Long-lasting memory deficits in mice withdrawn from cocaine are concomitant with neuroadaptations in hippocampal basal activity, GABAergic interneurons and adult neurogenesis. **Dis Model Mech**, 10, n. 3, p. 323-336, Mar 1 2017.

LAN, T.; TAO, A.; XU, X.; KVIETYS, P. *et al.* Peroxynitrite/PKR Axis Modulates the NLRP3 Inflammasome of Cardiac Fibroblasts. **Front Immunol**, 11, p. 558712, 2020.

LANGE, R. A.; HILLIS, L. D. Cardiovascular complications of cocaine use. **N Engl J Med**, 345, n. 5, p. 351-358, Aug 2 2001.

LATTANZIO, F. A., Jr.; TIANGCO, D.; OSGOOD, C.; BEEBE, S. *et al.* Cocaine increases intracellular calcium and reactive oxygen species, depolarizes mitochondria, and activates genes associated with heart failure and remodeling. **Cardiovasc Toxicol**, 5, n. 4, p. 377-390, Fall 2005.

LEE, G. S.; SUBRAMANIAN, N.; KIM, A. I.; AKSENTIJEVICH, I. *et al.* The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. **Nature**, 492, n. 7427, p. 123-127, Dec 6 2012.

LEPSCH, L. B.; MUNHOZ, C. D.; KAWAMOTO, E. M.; YSHII, L. M. *et al.* Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. **Mol Brain**, 2, p. 3, Feb 1 2009.

LEVY, D.; ANDERSON, K. M.; SAVAGE, D. D.; BALKUS, S. A. *et al.* Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. **Am J Cardiol**, 60, n. 7, p. 560-565, Sep 1 1987.

LIAUDET, L. C., B

Pacher, P. Pathophysiological mechanisms of catecholamine and cocaine-mediated cardiotoxicity. **Heart Fail Rev**, 19, p. 815-824, 2014.

LIU, W. B.; WANG, S. S.; ZHANG, X.; KE, Z. Z. *et al.* Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis Promotes d-Galactose-Induced Cardiac Aging. **J Am Heart Assoc**, 13, n. 14, p. e032904, Jul 16 2024.

LUCYK, S. N. Acute Cardiovascular Toxicity of Cocaine. **Can J Cardiol**, 38, n. 9, p. 1384-1394, Sep 2022.

MACEIRA, A. M.; RIPOLL, C.; COSIN-SALES, J.; IGUAL, B. *et al.* Long term effects of cocaine on the heart assessed by cardiovascular magnetic resonance at 3T. **J Cardiovasc Magn Reson**, 16, n. 1, p. 26, Apr 23 2014.

MARAJ, S.; FIGUEREDO, V. M.; LYNN MORRIS, D. Cocaine and the heart. **Clin Cardiol**, 33, n. 5, p. 264-269, May 2010.

MATEO, Y.; BUDYGIN, E. A.; JOHN, C. E.; JONES, S. R. Role of serotonin in cocaine effects in mice with reduced dopamine transporter function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 1, p. 372-377, Jan 6 2004.

MATSUOKA, T.; YOSHIMATSU, G.; SAKATA, N.; KAWAKAMI, R. *et al.* Inhibition of NLRP3 inflammasome by MCC950 improves the metabolic outcome of islet transplantation by suppressing IL-1beta and islet cellular death. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 17920, Oct 21 2020.

MCCORD, J.; JNEID, H.; HOLLANDER, J. E.; DE LEMOS, J. A. *et al.* Management of cocaine-associated chest pain and myocardial infarction: a scientific statement from the American Heart Association Acute Cardiac Care Committee of the Council on Clinical Cardiology. **Circulation**, 117, n. 14, p. 1897-1907, Apr 8 2008.

MCCOY, M. T.; JAYANTHI, S.; CADET, J. L. Potassium Channels and Their Potential Roles in Substance Use Disorders. **Int J Mol Sci**, 22, n. 3, Jan 27 2021.

MEHTA, A.; JAIN, A. C.; MEHTA, M. C. Electrocardiographic effects of intravenous cocaine: an experimental study in a canine model. **J Cardiovasc Pharmacol**, 41, n. 1, p. 25-30, Jan 2003.

MIRANDA E CASTOR, R. G.; BRUNO, A. S.; PEREIRA, C. A.; BELLO, F. L. M. *et al.* Glibenclamide reverses cardiac damage and NLRP3 inflammasome activation associated with a high refined sugar diet. **Eur J Pharmacol**, 984, p. 177035, Oct 4 2024.

MIRANDA, E. C. R. G.; BRUNO, A. S.; PEREIRA, C. A.; BELLO, F. L. M. *et al.* Glibenclamide reverses cardiac damage and NLRP3 inflammasome activation associated with a high refined sugar diet. **Eur J Pharmacol**, p. 177035, Oct 4 2024.

MOLENAAR, P.; CHRIST, T.; RAVENS, U.; KAUMANN, A. Carvedilol blocks beta2- more than beta1-adrenoceptors in human heart. **Cardiovasc Res**, 69, n. 1, p. 128-139, Jan 2006.

MUNZEL, T.; CAMICI, G. G.; MAACK, C.; BONETTI, N. R. *et al.* Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. **J Am Coll Cardiol**, 70, n. 2, p. 212-229, Jul 11 2017.

MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. **Circ Res**, 109, n. 6, p. 687-696, Sep 2 2011.

MUSTO, D. F. Opium, cocaine and marijuana in American history. **Sci Am**, 265, n. 1, p. 40-47, Jul 1991.

NAKAMURA, K.; KUSANO, K.; NAKAMURA, Y.; KAKISHITA, M. *et al.* Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. **Circulation**, 105, n. 24, p. 2867-2871, Jun 18 2002.

NOLY, P. E.; NAIK, S.; TANG, P.; LEI, I. Assessment of Ex Vivo Murine Biventricular Function in a Langendorff Model. **J Vis Exp**, n. 190, Dec 23 2022.

NOVAK, M.; SALEMINK, C. A.; KHAN, I. Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*. **J Ethnopharmacol**, 10, n. 3, p. 261-274, May 1984.

NOWBAR, A. N.; GITTO, M.; HOWARD, J. P.; FRANCIS, D. P. *et al.* Mortality From Ischemic Heart Disease. **Circ Cardiovasc Qual Outcomes**, 12, n. 6, p. e005375, Jun 2019.

O'LEARY, M. E.; HANCOX, J. C. Role of voltage-gated sodium, potassium and calcium channels in the development of cocaine-associated cardiac arrhythmias. **Br J Clin Pharmacol**, 69, n. 5, p. 427-442, May 2010.

OLIVA, F.; MANGIAPANE, C.; NIBBIO, G.; BERCHIALLA, P. *et al.* Prevalence of cocaine use and cocaine use disorder among adult patients with attention-deficit/hyperactivity disorder: A systematic review and meta-analysis. **J Psychiatr Res**, 143, p. 587-598, Nov 2021.

OSTLUND, S. B.; LEBLANC, K. H.; KOSHELEFF, A. R.; WASSUM, K. M. *et al.* Phasic mesolimbic dopamine signaling encodes the facilitation of incentive motivation produced by repeated cocaine exposure. **Neuropsychopharmacology**, 39, n. 10, p. 2441-2449, Sep 2014.

PITTS, W. R.; VONGPATANASIN, W.; CIGARROA, J. E.; HILLIS, L. D. *et al.* Effects of the intracoronary infusion of cocaine on left ventricular systolic and diastolic function in humans. **Circulation**, 97, n. 13, p. 1270-1273, Apr 7 1998.

PRZYWARA, D. A.; DAMBACH, G. E. Direct actions of cocaine on cardiac cellular electrical activity. **Circ Res**, 65, n. 1, p. 185-192, Jul 1989.

QURESHI, A. I.; SURI, M. F.; GUTERMAN, L. R.; HOPKINS, L. N. Cocaine use and the likelihood of nonfatal myocardial infarction and stroke: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Circulation**, 103, n. 4, p. 502-506, Jan 30 2001.

RAJAB, R.; STEARNS, E.; BAITHUN, S. Autopsy pathology of cocaine users from the Eastern district of London: a retrospective cohort study. **J Clin Pathol**, 61, n. 7, p. 848-850, Jul 2008.

RENARD, D. C.; DELAVILLE, F. J.; THOMAS, A. P. Inhibitory effects of cocaine on Ca^{2+} transients and contraction in single cardiomyocytes. **Am J Physiol**, 266, n. 2 Pt 2, p. H555-567, Feb 1994.

RENDON, L. F.; MALTA, S.; LEUNG, J.; BADENES, R. *et al.* Cocaine and Ischemic or Hemorrhagic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Evidence. **J Clin Med**, 12, n. 16, Aug 10 2023.

REZKALLA, S. H.; KLONER, R. A. Cocaine-induced acute myocardial infarction. **Clin Med Res**, 5, n. 3, p. 172-176, Oct 2007.

RICHARDS, J. R.; HOLLANDER, J. E.; RAMOSKA, E. A.; FAREED, F. N. *et al.* beta-Blockers, Cocaine, and the Unopposed alpha-Stimulation Phenomenon. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, 22, n. 3, p. 239-249, May 2017.

RIVIER, L. Analysis of alkaloids in leaves of cultivated *Erythroxylum* and characterization of alkaline substances used during coca chewing. **J Ethnopharmacol**, 3, n. 2-3, p. 313-335, Mar-May 1981.

ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H. L.; SALES, P. A., Jr.; NATALI, A. J. *et al.* Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Basic Res Cardiol**, 104, n. 3, p. 238-246, May 2009.

ROQUE BRAVO, R.; FARIA, A. C.; BRITO-DA-COSTA, A. M.; CARMO, H. *et al.* Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. **Toxins (Basel)**, 14, n. 4, Apr 13 2022.

RUTH, J. A.; ULLMAN, E. A.; COLLINS, A. C. An analysis of cocaine effects on locomotor activities and heart rate in four inbred mouse strains. **Pharmacol Biochem Behav**, 29, n. 1, p. 157-162, Jan 1988.

SANTOS-MIRANDA, A.; COSTA, A. D.; JOVIANO-SANTOS, J. V.; RHANA, P. *et al.* Inhibition of calcium/calmodulin (Ca^{2+})/CaM-Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) axis reduces in vitro and ex vivo arrhythmias in experimental Chagas disease. **FASEB J**, 35, n. 10, p. e21901, Oct 2021.

SCHULZ, R.; DODGE, K. L.; LOPASCHUK, G. D.; CLANACHAN, A. S. Peroxynitrite impairs cardiac contractile function by decreasing cardiac efficiency. **Am J Physiol**, 272, n. 3 Pt 2, p. H1212-1219, Mar 1997.

SCHWARTZ, B. G.; REZKALLA, S.; KLONER, R. A. Cardiovascular effects of cocaine. **Circulation**, 122, n. 24, p. 2558-2569, Dec 14 2010.

SEFEROVIC, P. M.; PAULUS, W. J. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. **Eur Heart J**, 36, n. 27, p. 1718-1727, 1727a-1727c, Jul 14 2015.

SERRANO-SERRANO, A. B.; MARQUEZ-ARRICO, J. E.; NAVARRO, J. F.; MARTINEZ-NICOLAS, A. *et al.* Circadian Characteristics in Patients under Treatment for Substance Use Disorders and Severe Mental Illness (Schizophrenia, Major Depression and Bipolar Disorder). **J Clin Med**, 10, n. 19, Sep 25 2021.

SHARMA, A.; TATE, M.; MATHEW, G.; VINCE, J. E. *et al.* Oxidative Stress and NLRP3-Inflammasome Activity as Significant Drivers of Diabetic Cardiovascular Complications: Therapeutic Implications. **Front Physiol**, 9, p. 114, 2018.

SHI, Y.; ZHAO, L.; WANG, J.; LIU, S. *et al.* The selective NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 improves isoproterenol-induced cardiac dysfunction by inhibiting cardiomyocyte senescence. **Eur J Pharmacol**, 937, p. 175364, Dec 15 2022.

SHORTER, D.; LINDSAY, J. A.; KOSTEN, T. R. The alpha-1 adrenergic antagonist doxazosin for treatment of cocaine dependence: A pilot study. **Drug Alcohol Depend**, 131, n. 1-2, p. 66-70, Jul 1 2013.

SKRZYPIEC-SPRING, M.; GROTHUS, B.; SZELAG, A.; SCHULZ, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 55, n. 2, p. 113-126, Mar-Apr 2007.

SOFUOGLU, M.; NELSON, D.; BABB, D. A.; HATSUKAMI, D. K. Intravenous cocaine increases plasma epinephrine and norepinephrine in humans. **Pharmacol Biochem Behav**, 68, n. 3, p. 455-459, Mar 2001.

SOKOLOVA, M.; SJAASTAD, I.; LOUWE, M. C.; ALFSNES, K. *et al.* NLRP3 Inflammasome Promotes Myocardial Remodeling During Diet-Induced Obesity. **Front Immunol**, 10, p. 1621, 2019.

STEINHAEUER, J. R.; CAULFIELD, J. B. Spontaneous coronary artery dissection associated with cocaine use: a case report and brief review. **Cardiovasc Pathol**, 10, n. 3, p. 141-145, May-Jun 2001.

STOLBERG, V. B. The use of coca: prehistory, history, and ethnography. **J Ethn Subst Abuse**, 10, n. 2, p. 126-146, 2011.

SU, J.; LI, J.; LI, W.; ALTURA, B. *et al.* Cocaine induces apoptosis in primary cultured rat aortic vascular smooth muscle cells: possible relationship to aortic dissection, atherosclerosis, and hypertension. **Int J Toxicol**, 23, n. 4, p. 233-237, Jul-Aug 2004.

TALARICO, G. P.; CROSTA, M. L.; GIANNICO, M. B.; SUMMARIA, F. *et al.* Cocaine and coronary artery diseases: a systematic review of the literature. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)**, 18, n. 5, p. 291-294, May 2017.

TELLA, S. R.; GOLDBERG, S. R. Monoamine transporter and sodium channel mechanisms in the rapid pressor response to cocaine. **Pharmacol Biochem Behav**, 59, n. 2, p. 305-312, Feb 1998.

TISDALE, J. E.; CHUNG, M. K.; CAMPBELL, K. B.; HAMMADAH, M. *et al.* Drug-Induced Arrhythmias: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, 142, n. 15, p. e214-e233, Oct 13 2020.

TOLDO, S.; MEZZAROMA, E.; BUCKLEY, L. F.; POTERE, N. *et al.* Targeting the NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases. **Pharmacol Ther**, 236, p. 108053, Aug 2022.

TOZZI, A.; DE IURE, A.; MARSILI, V.; ROMANO, R. *et al.* A2A adenosine receptor antagonism enhances synaptic and motor effects of cocaine via CB1 cannabinoid receptor activation. **PLoS One**, 7, n. 6, p. e38312, 2012.

TUNCCEL, M.; WANG, Z.; ARBIQUE, D.; FADEL, P. J. *et al.* Mechanism of the blood pressure--raising effect of cocaine in humans. **Circulation**, 105, n. 9, p. 1054-1059, Mar 5 2002.

UMAR, S.; VAN DER LAARSE, A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. **Mol Cell Biochem**, 333, n. 1-2, p. 191-201, Jan 2010.

VERMA, A.; ORME MERVE, A.; REMESKEVICIUS, V.; SOBIECKA, P. *et al.* Cocaine Induces Cytoskeletal Changes in Cardiac Myocytes: Implications for Cardiac Morphology. **Int J Mol Sci**, 22, n. 5, Feb 24 2021.

WANG, F. L.; GAUVIN, J. M.; DOMBROWSKI, M. P.; SMITH, Y. R. *et al.* Cocaine downregulates beta-adrenergic receptors in pregnant sheep myometrium. **Reprod Toxicol**, 10, n. 2, p. 119-123, Mar-Apr 1996.

WANG, J. F.; REN, X.; DEANGELIS, J.; MIN, J. *et al.* Differential patterns of cocaine-induced organ toxicity in murine heart versus liver. **Exp Biol Med (Maywood)**, 226, n. 1, p. 52-60, Jan 2001.

WANG, J. F.; YAN, X.; MIN, J.; SULLIVAN, M. F. *et al.* Cocaine downregulates cardiac SERCA2a and depresses myocardial function in the murine model. **Can J Physiol Pharmacol**, 80, n. 10, p. 1015-1021, Oct 2002.

WANG, M.; ZHAO, M.; YU, J.; XU, Y. *et al.* MCC950, a Selective NLRP3 Inhibitor, Attenuates Adverse Cardiac Remodeling Following Heart Failure Through Improving the Cardiometabolic Dysfunction in Obese Mice. **Front Cardiovasc Med**, 9, p. 727474, 2022.

WANG, Q.; HERNANDEZ-OCHOA, E. O.; VISWANATHAN, M. C.; BLUM, I. D. *et al.* CaMKII oxidation is a critical performance/disease trade-off acquired at the dawn of vertebrate evolution. **Nat Commun**, 12, n. 1, p. 3175, May 26 2021.

WHO. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. 2018.

WINHUSEN, T.; THEOBALD, J.; KAELEBER, D. C.; LEWIS, D. The association between regular cocaine use, with and without tobacco co-use, and adverse cardiovascular and respiratory outcomes. **Drug Alcohol Depend**, 214, p. 108136, Sep 1 2020.

WONG, W. T.; LI, L. H.; RAO, Y. K.; YANG, S. P. *et al.* Repositioning of the beta-Blocker Carvedilol as a Novel Autophagy Inducer That Inhibits the NLRP3 Inflammasome. **Front Immunol**, 9, p. 1920, 2018.

XIE, Q.; WEI, T.; HUANG, C.; LIU, P. *et al.* Nebivolol Ameliorates Cardiac NLRP3 Inflammasome Activation in a Juvenile-Adolescent Animal Model of Diet-Induced Obesity. **Sci Rep**, 6, p. 34326, Sep 30 2016.

XIN, J. Z.; WU, J. M.; HU, G. M.; GU, H. J. *et al.* alpha(1)-AR overactivation induces cardiac inflammation through NLRP3 inflammasome activation. **Acta Pharmacol Sin**, 41, n. 3, p. 311-318, Mar 2020.

XU, F.; GAINETDINOV, R. R.; WETSEL, W. C.; JONES, S. R. *et al.* Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. **Nat Neurosci**, 3, n. 5, p. 465-471, May 2000.

YOSHIKAWA, T.; PORT, J. D.; ASANO, K.; CHIDIAC, P. *et al.* Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. **Eur Heart J**, 17 Suppl B, p. 8-16, Apr 1996.

ZHU, W.; WANG, H.; WEI, J.; SARTOR, G. C. *et al.* Cocaine Exposure Increases Blood Pressure and Aortic Stiffness via the miR-30c-5p-Malic Enzyme 1-Reactive Oxygen Species Pathway. **Hypertension**, 71, n. 4, p. 752-760, Apr 2018.

ZULOAGA, D. G.; JACOBSSKIND, J. S.; RABER, J. Methamphetamine and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Front Neurosci**, 9, p. 178, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do papel do inflamassoma NLRP3 no dano cardiovascular desencadeado por cocaína", protocolo do CEUA: 205/2021 sob a responsabilidade de Stefany Bruno de Assis Cau que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 25/10/2021.

ANEXO 2 – Menção Honrosa apresentação oral 2022

XXVI Simpósio Brasileiro de Fisiologia CardioVascular

Prêmio: Menção Honrosa

Categoria: Apresentação oral



ANEXO 3 – Trabalhos publicados (não relacionados à tese)

3.1 Trabalhos publicados como primeiro autor

1) Título: Glibenclamide reverses cardiac damage and NLRP3 inflammasome activation associated with a high refined sugar diet

DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.177035

European Journal of Pharmacology 984 (2024) 177035



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar





Glibenclamide reverses cardiac damage and NLRP3 inflammasome activation associated with a high refined sugar diet

Renata Gomes Miranda e Castor^{a,1}, Alexandre Santos Bruno^{a,1}, Camila André Pereira^b,
Fernanda Luiza Menezes Bello^c, Yuri Blanc Rodrigues^a, Mychel Gonçalves Silva^d,
Sara Santos Bernardes^c, Marina Gomes Miranda e Castor^a, Anderson Jose Ferreira^e,
Rita de Cassia Tostes^b, Stéfany Cau^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil
^b Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil
^c Department of Pathology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil
^d Department of Physics, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil
^e Medicine Faculty, Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Diamantina, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
High carbohydrate diet
Cardiac damage
Glibenclamide
NLRP3 inflammasome

ABSTRACT

Increased energy intake from carbohydrates has been associated with major cardiovascular outcomes. Mice fed a highly-refined carbohydrate (HC) diet develop cardiac hypertrophy and inflammation. During cardiac injury, NLRP3 inflammasome is activated which results in a local inflammatory response. In this study, we hypothesized that a non-hypoglycemic dose of glibenclamide may reverse sugar diet-induced cardiac damage by NLRP3 inflammasome inhibition. Mice were fed the HC diet for eight weeks and divided into a group treated with glibenclamide (20 mg/kg, gavage) and another with vehicle for four weeks. Afterward, hearts were excised for morphometric analysis and *ex vivo* function determination. NLRP3 inflammasome activation was investigated by western blotting and *in situ* fluorescent detection of reactive oxygen species (ROS) and active caspase-1. The HC diet promotes heart hypertrophy and collagen deposition, which were reversed by glibenclamide without ameliorating HC diet-induced insulin resistance. Changes in cardiac performance were observed *in vivo* by invasive catheterization and in Langendorff-perfused hearts due to the HC diet, which were prevented by glibenclamide. Hearts from HC diet mice had increased levels of NLRP3 and cleaved IL-1 β . Glibenclamide reversed ROS production and caspase-1 activity induced by HC diet. These findings suggest glibenclamide's cardioprotective effects on heart damage caused by the HC diet are related to its inhibitory action on the NLRP3 inflammasome.

1. Introduction

Heart diseases continue to be a major health concern, posing a significant burden on healthcare systems worldwide (Luengo-Fernandez et al., 2023; Vaduganathan et al., 2022). Cardiovascular diseases are fundamentally multifactorial, with numerous environmental, metabolic, and behavioral risk factors being historically recognized. Controlling cardiac risk factors is a strategy to increase quality of life and reduce healthcare costs. A multinational effort involving data from over 200 countries revealed that unhealthy dietary habits contribute to a high mortality rate, with more than 80% of these deaths attributed to cardiovascular diseases (Vaduganathan et al., 2022). These habits include not consuming enough of healthy food groups such as fruits and vegetables, as well as overconsuming prejudicial food groups such as processed foods and sugar-sweetened beverages. Only in the last few years it has become evident from large studies that sugar is the primary food nutrient associated with cardiovascular death (Dehghan et al., 2017; Ho et al., 2020; Kelly et al., 2023; Yang et al., 2014). This conclusion has been recently confirmed by a meta-analysis (Huang et al., 2023).

The rise in popularity of processed foods in contemporary society has led to an increase in the amount of carbohydrates that people consume

^{*} Corresponding author.
E-mail address: cau@icb.ufmg.br (S. Cau).
¹ Both authors contributed equally to this manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.177035>
Received 31 May 2024; Received in revised form 13 September 2024; Accepted 3 October 2024

2) Título: Cardiac disturbances and changes in tissue cytokine levels in mice fed with a high-refined carbohydrate diet

DOI: 10.1016/j.cyto.2023.156192



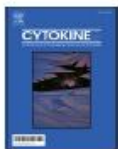
ELSEVIER

Cytokine 166 (2023) 156192

Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine





Cardiac disturbances and changes in tissue cytokine levels in mice fed with a high-refined carbohydrate diet

Alexandre Santos Bruno ^a, Renata Gomes Miranda Castor ^a, Bárbara Berg ^a,
 Daniela Esteves Ferreira dos Reis Costa ^a, André Luis Lima Monteiro ^b, Sérgio Scalzo ^b,
 Karla Caroline Marques Oliveira ^a, Fernanda Luiza Menezes Bello ^c, Grazielle Cordeiro Aguiar ^d,
 Marcos Barrouin Melo ^b, Robson Augusto Souza Santos ^b, Daniella Bonaventura ^a,
 Silvia Guatimosim ^b, Marina Gomes Miranda Castor ^a, Anderson Jose Ferreira ^d, Stefany Bruno
 Assis Cau ^{a,*}

^a Departments of Pharmacology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil
^b Departments of Physiology & Biophysics, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil
^c Departments of Pathology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil
^d Departments of Morphology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Refined carbohydrate diet
 Cardiac remodeling
 Inflammatory mediators
 Myocardial fibrosis

ABSTRACT

Aims: The consumption of highly refined carbohydrates increases systemic inflammatory markers, but its potential to exert direct myocardial inflammation is uncertain. Herein, we addressed the impact of a high-refined carbohydrate (HC) diet on mice heart and local inflammation over time.

Main methods: BALB/c mice were fed with a standard chow (control) or an isocaloric HC diet for 2, 4, or 8 weeks (HC groups), in which the morphometry of heart sections and contractile analyses by invasive catheterization and Langendorff-perfused hearts were assessed. Cytokines levels by ELISA, matrix metalloproteinase (MMP) activity by zymography, *in situ* reactive oxygen species (ROS) staining and lipid peroxidation-induced TBARS levels, were also determined.

Key findings: HC diet fed mice displayed left ventricular hypertrophy and interstitial fibrosis in all times analyzed, which was confirmed by echocardiographic analyses of 8HC group. Impaired contractility indices of HC groups were observed by left ventricular catheterization, whereas *ex vivo* and *in vitro* indices of contraction under isoprenaline-stimulation were higher in HC-fed mice compared with controls. Peak levels of TNF- α , TGF- β , ROS, TBARS, and MMP-2 occur independently of HC diet time. However, a long-lasting local reduction of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was found, which was linearly correlated to the decline of systolic function *in vivo*.

Significance: Altogether, the results indicate that short-term consumption of HC diet negatively impacts the balance of anti-inflammatory defenses and proinflammatory/profibrotic mediators in the heart, which can contribute to HC diet-induced morphofunctional cardiac alterations.

1. Introduction

The association of carbohydrate intake with cardiovascular diseases (CVD) has been overshadowed by the premise that dietary fats are the main factor associated with early cardiovascular death [1]. More recently, large population studies implicate sugar as playing a major role in cardiovascular deaths and put high-refined sugar at the top of the

discussion about reducing consumption of processed foods [2–4]. It was highlighted that high-refined carbohydrate intake, but not dietary fats, was progressively associated with the relative cardiovascular risk of death [2,4]. Nonetheless, the consumption of ultra-processed foods has exponentially increased in the last decades [1,5]. Processed foods are enriched with refined carbohydrates, which makes them the main dietary source of this type of sugar [6].

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Av Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

E-mail address: cas@icb.ufmg.br (S.B.A. Cau).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156192>

Received 21 December 2022; Accepted 24 March 2023

Available online 11 April 2023

1043-4666/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

3) **Título:** Vascular Inflammation in Hypertension: Targeting Lipid Mediators Unbalance and Nitrosative Stress

DOI: 10.2174/1573402116666191220122332

Review

➤ [Curr Hypertens Rev. 2021;17\(1\):35-46. doi: 10.2174/1573402116666191220122332.](#)

Vascular Inflammation in Hypertension: Targeting Lipid Mediators Unbalance and Nitrosative Stress

Alexandre S Bruno ¹, Patricia das Dores Lopes ¹, Karla C M de Oliveira ¹, Anizia K de Oliveira ¹, Stefany B de Assis Cau ¹

Affiliations + expand

PMID: 31858899 DOI: [10.2174/1573402116666191220122332](#)

Abstract

Arterial hypertension is a worldwide public health threat. High Blood Pressure (BP) is commonly associated with endothelial dysfunction, nitric oxide synthases (NOS) unbalance and high peripheral vascular resistance. In addition to those, inflammation has also been designated as one of the major components of BP increase and organ damage in hypertension. This minireview discusses vascular inflammatory triggers of high BP and aims to fill the existing gaps of antiinflammatory therapy of hypertension. Among the reasons discussed, enhanced prostaglandins rather than resolvins lipid mediators, immune cell infiltration and oxidative/nitrosative stress are pivotal players of BP increase within the inflammatory hypothesis. To address these inflammatory targets, this review also proposes new concepts in hypertension treatment with non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), nitric oxide-releasing NSAIDs (NO-NSAIDs) and specialized proresolving mediators (SPM). In this context, the failure of NSAIDs in hypertension treatment seems to be associated with the reduction of endogenous NO bioavailability, which is not necessarily an effect of all drug members of this pharmacological class. For this reason, NO-releasing NSAIDs seem to be safer and more specific therapy to treat vascular inflammation in hypertension than regular NSAIDs.

Keywords: Hypertension; NF-κB; NO-NSAIDs; NSAIDs; cyclooxygenases; iNOS; vascular inflammation.

3.2 Trabalhos publicados como colaborador

- 1) **Título:** Plasmin and plasminogen prevent sepsis severity by reducing neutrophil extracellular traps and systemic inflammation

DOI: 10.1172/jci.insight.166044



RESEARCH ARTICLE

Plasmin and plasminogen prevent sepsis severity by reducing neutrophil extracellular traps and systemic inflammation

Juliana P. Vago,^{1,2,3} Isabella Zaidan,¹ Luiza O. Perucci,⁴ Larissa Froede Brito,¹ Livia C.R. Teixeira,¹ Camila Meirelles Souza Silva,⁵ Thaís C. Miranda,¹ Eliza M. Melo,⁶ Alexandre S. Bruno,⁷ Celso Martins Queiroz-Junior,⁸ Michelle A. Sugimoto,^{1,6} Luciana P. Tavares,⁶ Laís C. Grossi,¹ Isabela N. Borges,⁸ Ayda Henriques Schneider,⁵ Nagyung Baik,³ Ayda H. Schneider,⁵ André Talvani,⁴ Raphael G. Ferreira,⁵ José C. Alves-Filho,⁵ Vandack Nobre,⁸ Mauro M. Teixeira,⁶ Robert J. Parmer,⁹ Lindsey A. Miles,³ and Lirlândia P. Sousa¹

¹Signaling in Inflammation Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, and

²Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA. ⁴Department of Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil. ⁵Department of Pharmacology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. ⁶Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ⁷Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ⁸Hospital of Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ⁹Department of Medicine, Veterans Administration San Diego Healthcare System and University of California, San Diego, California, USA.

Sepsis is a lethal syndrome characterized by systemic inflammation and abnormal coagulation. Despite therapeutic advances, sepsis mortality remains substantially high. Herein, we investigated the role of the plasminogen/plasmin (Plg/Pla) system during sepsis. Plasma levels of Plg were significantly lower in mice subjected to severe compared with nonsevere sepsis, whereas systemic levels of IL-6, a marker of sepsis severity, were higher in severe sepsis. Plg levels correlated negatively with IL-6 in both septic mice and patients, whereas plasminogen activator inhibitor-1 levels correlated positively with IL-6. Plg-deficient mice were susceptible to severe sepsis.

- 2) **Título:** Inhibition of calcium/calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$)—Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) axis reduces in vitro and ex vivo arrhythmias in experimental Chagas disease

DOI: 10.1096/fj.202101060R



RESEARCH ARTICLE |  Free to Read

Inhibition of calcium/calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$)— Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) axis reduces in vitro and ex vivo arrhythmias in experimental Chagas disease

Artur Santos-Miranda, Alexandre D. Costa, Julliane V. Joviano-Santos, Paula Rhana, Alexandre Santos Bruno, Peter Rocha, Stefany Bruno Cau, Leda Q. Vieira ... [See all authors](#) ▾

First published: 27 September 2021 | <https://doi.org/10.1096/fj.202101060R> | Citations: 5

Funding information

This work was supported by the State Funding of Sao Paulo [FAPESP #2019/21304-4 to DRC], Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - PRONEX to LQV and JSC) and CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to JSC (Grants #312474/2017-2 and #437969/2018-5) and to DRC (#304257/2020-6). ASM holds a Fellowship from FAPESP [grant #2018/22830-9]; JVJS holds a Fellowship from FAPESP [grant #2018/20777-3]

 PDF  TOOLS  SHARE