

Natalia de Menezes Lopes

**Bases celulares e efeitos do tratamento com metotrexato
associado a nanopartículas lipídicas sobre as alterações
cardiovasculares da endotoxemia induzida por LPS em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante
Maranhão

São Paulo, 2022

Natalia de Menezes Lopes

**Bases celulares e efeitos do tratamento com metotrexato
associado a nanopartículas lipídicas sobre as alterações
cardiovasculares da endotoxemia induzida por LPS em ratos**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante
Maranhão

São Paulo, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lopes, Natalia de Menezes
Bases celulares e efeitos do tratamento com
metotrexato associado a nanopartículas lipídicas
sobre as alterações cardiovasculares da endotoxemia
induzida por LPS em ratos / Natalia de Menezes
Lopes. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Endotoxemia 2.Nanopartículas
3.Angiogênese 4.Hipóxia celular 5.Insuficiência
cardíaca 6.Remodelamento cardíaco 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-357/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Normatização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referencias: adaptado de *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedicatória

Aos meus pais, Rosana e Edison, pelo amor incondicional e pelo investimento, incentivo, força e coragem. Essa conquista também é de vocês!

À Dra. Maria Carolina Guido, pela idealização deste incrível trabalho e pela confiança em me deixar torná-lo realidade.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela oportunidade de ter feito parte da sua jornada, pela confiança depositada em mim e por todos os ensinamentos ao longo destes anos, serei eternamente grata! Obrigada por permitir que essa conquista tão importante para mim fosse realizada em seu laboratório e sob sua orientação.

À Dra. Maria Carolina Guido, minha co-orientadora e amiga, pelo apoio intelectual e emocional, pelas discussões teóricas, pelas risadas, pelos choros, pelo suor, pela dedicação, pelas comemorações, prêmios, congressos, enfim... por todos os momentos que vivemos juntas e que nunca serão esquecidos. Tenho imensa admiração por você e lembre-se sempre que esse trabalho é tão seu quanto meu!

Às minhas amigas e queridas companheiras de jornada, Dra. Camila Inagaki, Dalila Pinheiro e Roberta Vanalli. Sem vocês esse trabalho não teria acontecido da mesma maneira, seja pelo apoio emocional, pelos momentos de descontração ou pelas incansáveis horas compartilhadas no biotério e nas infinitas análises. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos co-autores: Victor Debbas por todos os ensinamentos, paciência e cuidado, sem você esse trabalho não seria possível; Leonardo Jensen, pelas análises ecocardiográficas que renderam boas conversas e pela parceria de congresso internacional.

À equipe do Laboratório de Metabolismo e Lípidos: Dra. Priscila Carvalho, não só pelo suporte na realização desse trabalho, mas também pelas risadas e descontração; Dra. Aleksandra Morikawa, por ter confiado no meu potencial ao me apresentar essa oportunidade e por ter feito parte de todos esses anos do meu crescimento profissional; à querida Andreia Prado, pelo carinho e cuidado de sempre e por ter garantido que essa matrícula fosse realizada

mesmo em um dos momentos mais difíceis da minha vida; Dra. Fátima Rodrigues, pelos abraços carinhosos e conselhos cuidadosos de sempre; à querida Debora Deus, pelos cuidados físicos e emocionais ao longo dessa jornada e pelas conversas profundas e engrandecedoras; e ao querido Wanderley Gomes, pelo carinho e pelas palavras de força e coragem que fizeram a diferença diariamente nestes anos.

À Prof. Dra. Ludhmila Abrahão Hajjar, pelo apoio, confiança e por ter dado imenso incentivo a esse trabalho desde o princípio.

Às queridas Neusa Dini, Luana Guedes, Monica Souto, Val Ferreira, Sidnei Silva e Juliana Lattari, pelo apoio à realização desse sonho e pelo carinho e bons momentos de Comissão de Pós-Graduação.

Aos funcionários da Divisão de Pesquisa e Experimentação Animal do InCor, pelo auxílio e cuidado com os animais.

E principalmente à minha família, Rosana, Edison e Cassius, por me darem a base para chegar até aqui, por acreditarem sempre no meu potencial e pela compreensão nos momentos de ausência, nos fins de semana e feriados de trabalho, no cansaço e na ansiedade vividos durante essa jornada. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

“Take these broken wings and learn to fly

All your life

You were only waiting for this moment to arise”

The Beatles

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – adenosina deaminase

ADK – adenosina quinase

AICAR – 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo

ALT – alanina aminotransferase

AMP – monofosfato de adenosina

apoE – apolipoproteína E

AST – alanina aminotransferase

BAX – proteína X associado a Bcl-2

Bcl-2 – linfoma de célula B

CD3 – linfócito T

CD68 – macrófago

cDNA – DNA complementar

CT – grupo controle

DC – débito cardíaco

DD – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DS – diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

DT – tempo de desaceleração do ventrículo esquerdo

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid

eNOS – óxido nítrico-sintase endotelial

ERK 1/2 – extracelular-signal-regulated kinase 1/2

ERP – espessura relativa de parede do ventrículo esquerdo

FAC – variação fracional da área do ventrículo esquerdo

FC – frequência cardíaca

FE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo

Fen – fração de encurtamento do ventrículo esquerdo

FVC – fração de volume do colágeno do ventrículo esquerdo

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GGT – gama glutamil transferase

HDL-c – lipoproteína de alta densidade

HE – hematoxilina-eosina

HIF-1 α – fator induzível por hipóxia tipo 1 alfa

i.p. – intraperitoneal

IAM – infarto agudo do miocárdio

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico-sintase induzida

IFN- γ – interferon-gama

LDL – lipoproteínas de baixa densidade

LDE – nanopartícula lipídica

LPS – lipopolissacarídeos

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos

MMP – metaloproteinase

MTX – metotrexato

mVE – massa do ventrículo esquerdo

não-HDL-c – colesterol não HDL

NF-kB – fator nuclear kappa B

NO – óxido nítrico

PP – espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo

qRT-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SIRS – resposta inflamatória sistêmica secundária

SIV – espessura do septo interventricular

SOFA score – Sequential Organ Failure Assessment

SV – *stroke volume*

TG – triglicérides

TGF- β – fator transformação de crescimento tipo beta

TLR – toll-like receptor

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TRIV – tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo

UHPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

VE – ventrículo esquerdo

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Vol D – volume diastólico do ventrículo esquerdo

Vol S – volume sistólico do ventrículo esquerdo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura dos lipopolissacarídeos	23
Figura 2.	A resposta da infecção à endotoxina	25
Figura 3.	Mecanismos de ação do metotrexato e receptores de adenosina	34
Figura 4.	Peso relativo do coração e diâmetro de miócitos	61
Figura 5.	Expressão proteica de marcadores apoptóticos	62
Figura 6.	Expressão proteica e gênica de marcadores inflamatórios	64
Figura 7.	Expressão gênica de marcadores de perfil oxidativo	65
Figura 8.	Expressão proteica de metaloproteinases	66
Figura 9.	Expressão proteica de troponina I	67
Figura 10.	Expressão proteica de perfil fibrótico	69
Figura 11.	Expressão proteica de marcadores pró e antiangiogênicos	71
Figura 12.	Expressão proteica de marcador de hipóxia celular	72
Figura 13.	Expressão proteica de receptores de adenosina e enzimas catabólicas	74
Figura 14.	Correlações entre a expressão de marcadores pró-angiogênicos e as respostas celulares	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diferenças entre os consensos sobre a definição de sepse	20
Tabela 2.	Descrição das identificações das TaqMan utilizadas para expressão gênica por qRT-PCR	48
Tabela 3.	Descrição dos anticorpos primários utilizados para os ensaios de expressão proteica por Western blot	51
Tabela 4.	Peso corporal de ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX	54
Tabela 5.	Hemograma em ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX	55
Tabela 6.	Função hepática, função renal e lactato de ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX	57
Tabela 7.	Perfil lipídico em ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX	58
Tabela 8.	Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX	60
Tabela 9.	Correlação entre a expressão dos marcadores pró-angiogênicos e as respostas celulares em ratos endotoxêmicos tratados com MTX e LDEMTX	76

RESUMO

Disfunções cardíacas são uma das mais importantes causas de mortalidade na sepse e estão associadas à desregulação do sistema imune e diminuição da perfusão miocárdica. Mostramos em estudos anteriores que, em diversos modelos experimentais, o metotrexato (MTX) associado à nanopartículas lipídicas (LDE) é capaz de modular a resposta imune e estimular a angiogênese no miocárdio. Com isso, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do LDEMTX sobre a disfunção cardíaca em ratos com endotoxemia. Vinte ratos Wistar foram induzidos à endotoxemia por injeções intraperitoneais de lipopolissacarídeos (LPS, 10mg/kg, duas doses com intervalo de 24 horas) e alocados em três grupos: LPS-LDEMTX, injetado i.p. com 1mg/kg de MTX associado à LDE; LPS-MTX, injetado com 1mg/kg da versão comercial MTX; LPS-LDE, injetado apenas com LDE. Um grupo de cinco animais controle (CT) sem endotoxemia também foi estudado. A análise ecocardiográfica foi realizada 48 horas após a primeira dose de LPS. Os animais foram eutanasiados para análise morfométrica e da expressão gênica e proteica de marcadores do ventrículo esquerdo (VE). Os animais LPS-LDE desenvolveram disfunção diastólica, a qual foi prevenida tanto no grupo LPS-LDEMTX quanto LPS-MTX. Apenas o grupo LPS-LDEMTX desenvolveu hipertrofia compensatória do VE. Em LPS-LDEMTX, a hipóxia celular foi acentuadamente menor e o processo angiogênico maior que em LPS-MTX e LPS-LDE, representados pela expressão de fator induzível por hipóxia 1 α , fator de crescimento vascular endotelial e angiopoietina 1/2, respectivamente. A biodisponibilidade de adenosina intracelular aumentou no grupo LPS-LDEMTX, o qual apresentou maior expressão de receptores de adenosina. Apenas o grupo LPS-MTX apresentou toxicidade hepática. O tratamento com LDEMTX e com MTX comercial preveniram a disfunção diastólica na endotoxemia, mas apenas LDEMTX foi capaz de modular outros parâmetros benéficos e prevenir toxicidades, sendo um candidato a futuros estudos clínicos para a terapêutica da sepse.

Palavras-chave: Endotoxemia, nanopartícula lipídica, angiogênese, hipóxia celular, disfunção cardíaca.

ABSTRACT

Cardiac dysfunction is a major cause of death in sepsis and is associated with dysregulation of the immune system and decreased myocardial perfusion. Previously, we showed in several experimental models that methotrexate (MTX) carried in lipid core nanoparticles (LDE) can modulate the immune response and increase myocardial angiogenesis. The aim was to test the effects of LDEMTX in rats with endotoxemia. Twenty Wistar rats were induced endotoxemia by I.P. injection of lipopolysaccharide (LPS, 10mg/kg twice in 24h interval) and allocated to 3 groups: LPS-LDEMTX, injected I.P. with 1mg/kg MTX associated with LDE; LPS- MTX injected with conventional 1mg/kg MTX; LPS-LDE, injected with LDE only. A five-rat control group (CT) without endotoxemia was also studied. Echocardiography was performed 48h after endotoxemia induction. Then, animals were euthanized for analysis of morphometry and gene and protein expression of the left ventricle (LV). LPS-LDE developed LV diastolic dysfunction that was prevented in both LPS- LDEMTX and LPS-MTX groups. LPS-LDEMTX, but not LPS-MTX, developed compensatory LV hypertrophy. In LPS-LDEMTX cellular hypoxia was markedly lower and angiogenesis was higher than in LPS-MTX and LPS-LDE, indicated by expression of hypoxia-inducible factor 1 α , vascular endothelial growth factor and angiopoietin 1/2, respectively. Intracellular adenosine bioavailability was increased in LPS-LDEMTX group that showed higher expression of adenosine receptors. LPS- MTX but not LPS-LDEMTX showed hepatic toxicity. In conclusion, both LDEMTX and conventional MTX prevented diastolic dysfunction in endotoxemia, but LDEMTX was also capable of improving several other parameters and had no toxicity and is a candidate for future clinical studies on sepsis therapeutics.

Key words: Endotoxemia, lipid nanoparticle, angiogenesis, cellular hypoxia, cardiac dysfunction.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	Definição e epidemiologia da sepse	18
1.2	Fisiopatologia	22
1.3	Disfunção cardíaca associada à endotoxemia	26
1.4	Tratamentos	29
1.4.1	Manejo da sepse	29
1.4.2	LDE	31
1.4.3	Metotrexato	33
1.4.4	LDEMTX	36
2.	JUSTIFICATIVA	39
3.	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo primário	40
3.2	Objetivos secundários	40
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Modelo animal	41
4.2	Desenho experimental	41
4.3	Síntese de derivado de MTX, preparação da LDE e associação com MTX	42
4.4	Perfil bioquímico	43
4.5	Ecocardiografia	44
4.6	Peso relativo do coração	45
4.7	Morfometria	45
4.8	Expressão gênica por qRT-PCR	46

4.9	Expressão proteica por Western Blot	48
4.10	Análise estatística	53
5.	RESULTADOS	54
5.1	Peso corporal e mortalidade	54
5.2	Perfil hematológico	54
5.3	Função hepática, função renal e lactato	55
5.4	Perfil lipídico	56
5.5	Ecocardiografia	58
5.6	Peso relativo do coração e diâmetro dos miócitos	61
5.7	Marcadores pró-apoptóticos	62
5.8	Processo inflamatório	63
5.9	Perfil oxidativo	65
5.10	Metaloproteinases	66
5.11	Troponina I	67
5.12	Fibrose miocárdica	68
5.13	Angiogênese	70
5.14	Hipóxia celular	72
5.15	Mecanismos de sinalização de adenosina	73
5.16	Correlação entre marcadores pró-angiogênicos e respostas celulares	75
6.	DISCUSSÃO	78
7.	CONCLUSÃO	89
8.	REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição e epidemiologia da sepse

A sepse é definida como disfunção de órgãos, em resposta a uma infecção, que compromete a sobrevivência dos indivíduos acometidos. A doença é caracterizada pelo desequilíbrio na resposta imune, com ativação e alterações atípicas de células, resultando na secreção exacerbada de mediadores responsáveis por desencadear o dano tecidual (Singer et al, 2016).

O primeiro consenso para definição da sepse limitava a sepse à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) combinada a uma infecção, excluindo quaisquer graus de disfunção de órgãos, os quais eram englobados pela definição de sepse grave. A evolução da sepse grave era descrita como choque séptico, um estado em que a sepse resultava em hipotensão persistente, apesar da fluidoterapia adequada (Bone et al, 1992). Quase dez anos depois, tornou-se necessário realizar um segundo consenso, que não alterou as definições, mas ampliou a lista de sintomas e critérios para a identificação clínica da sepse (Levy et al, 2003). As limitações do uso dos critérios do consenso Sepse-2 ainda eram evidentes na prática clínica, porém, uma revisão destes critérios só veio a ser realizada em 2016. Em Sepsis-3, a definição de sepse foi reavaliada para uma disfunção de órgãos causada por infecção e incluindo o SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment) para determinar o grau dessa disfunção e buscar aprimorar, não só a definição da doença, mas também o manejo do paciente séptico na clínica. Além disso, o consenso eliminou a definição de sepse grave e categorizou o choque séptico como um estágio secundário à sepse,

no qual observamos um comprometimento celular, circulatório e metabólico tão profundo que é necessária a intervenção com vasopressores para manutenção da pressão arterial igual ou maior a 65mmHg e os níveis de lactato abaixo de 2mmol/L (Singer et al, 2016). A comparação dos principais tópicos de cada consenso pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Diferenças nas definições de sepse entre os consensos Sepse-1 (1991), 2 (2001) e 3 (2016).

	Sepse	Sepse grave	Choque séptico
Sepsis-1, 1991	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) + infecção	Sepse + evidências de disfunção de órgãos	Sepse + hipotensão persistente após ressuscitação de fluidos
Sepsis-2, 2001	Definição não foi alterada, apenas foram acrescentados sintomas e sinais para identificação da sepse	Definição não foi alterada	Definição não foi alterada
Sepsis-3, 2016	Disfunção de órgãos que compromete a sobrevivência, em resposta a uma infecção	Eliminada	Consequência da sepse + hipotensão persistente que requer vasopressores para manter PAM>65mmHg e lactato sérico >2mmol/L

Em uma análise dos dados do Global Burden of Disease de 2017, foram reportados 11 milhões de casos de sepse, responsáveis por quase 20% das causas de mortalidade global (Rudd et al, 2020; Global Burden of Disease, 2017). Apesar da melhora na identificação e manejo do paciente crítico, a taxa de mortalidade permanece preocupante e atinge aproximadamente 50% daqueles que apresentam disfunção ou choque séptico (Gauer et al, 2020; Evans et al, 2018). A longo prazo, o prognóstico da sepse é frequentemente desfavorável, com 30% dos sobreviventes

desenvolvendo disfunções e danos cognitivos (Thompson et al, 2019). Apesar de ser uma síndrome que afeta indivíduos a nível global, há diferenças relevantes na sobrecarga da sepse entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Os países subdesenvolvidos, além de enfrentarem maiores índices de doenças infecciosas, lidam com padrões de comorbidades muito variáveis e com recursos limitados para prevenção e tratamento (Cheng et al, 2008; Lewis et al, 2019; Baelani et al, 2011). Ainda nestes países, o uso do SOFA é raro para a realidade da emergência, o que leva à identificação tardia da doença, problema já recorrente nestes países (Machado et al, 2016). Em estudo observacional, com análise do banco de dados brasileiros realizada para o período de 2010 a 2019, mostrou-se que o número de mortes registradas por sepse atingiu 463 mil e que há predominância de mortalidade nos pacientes acima de 60 anos. Os casos de sepse atingiram quase 1.100.000 indivíduos e, durante todo o período avaliado, não houve declínio das taxas de mortalidade (Almeida et al, 2022).

De acordo com o Instituto Latino-Americano de Sepse, o Brasil tem uma das maiores taxas mundiais de mortalidade por sepse, atingindo 46%. É importante destacar que o sistema hospitalar brasileiro ainda enfrenta dificuldades em realizar o diagnóstico precoce do paciente crítico, como reportado em um estudo observacional, que relata que os pacientes de hospitais da rede pública brasileira apresentaram maior número de órgãos em disfunção e menor probabilidade de diagnóstico precoce, além de 52,4% de mortalidade em comparação aos 41,6% das instituições privadas (Conde et al, 2013). Esse é apenas um dos indicativos de que o ônus da sepse é uma questão relevante da política de saúde pública no Brasil (ILAS, 2020).

1.2 Fisiopatologia

A sepse pode ser desencadeada por diferentes agentes infecciosos sendo que, na maioria dos casos, prevalecem as infecções causadas por bactérias Gram-negativas, as quais se difundem intermitentemente na corrente sanguínea do hospedeiro e podem causar infecções secundárias (Holmes et al, 2021; Vincent et al, 2018). Endotoxinas da membrana extracelular dessas bactérias Gram-negativas, os lipopolissacarídeos (LPS) são responsáveis pelas interações entre bactéria e hospedeiro, sendo essenciais para o desenvolvimento dos danos hemodinâmicos, hematológicos e metabólicos causados pela infecção. Em sua estrutura, LPS apresenta um núcleo de oligossacarídeos, uma cadeia lateral oxigenada e uma região lipídica A, através da qual o patógeno é reconhecido (Garcia-Vello et al, 2021).

O LPS é um componente do padrão clássico de reconhecimento de patógenos, identificado por receptores específicos que ativam a sinalização da resposta imune e inflamatória do hospedeiro. Em geral, células capazes de identificar a presença de LPS no sangue, têm seus receptores ativados por concentrações muito baixas e, portanto, altos níveis de LPS são capazes de desencadear respostas exacerbadas e desreguladas no organismo (Yamamoto et al, 2011). Esses receptores, chamados toll-like (TLR), são glicoproteínas transmembranas que reconhecem esses padrões e ativam mecanismos de sinalização, que iniciam diversas respostas sistêmicas (Figura 1) (Drosatos et al, 2015).

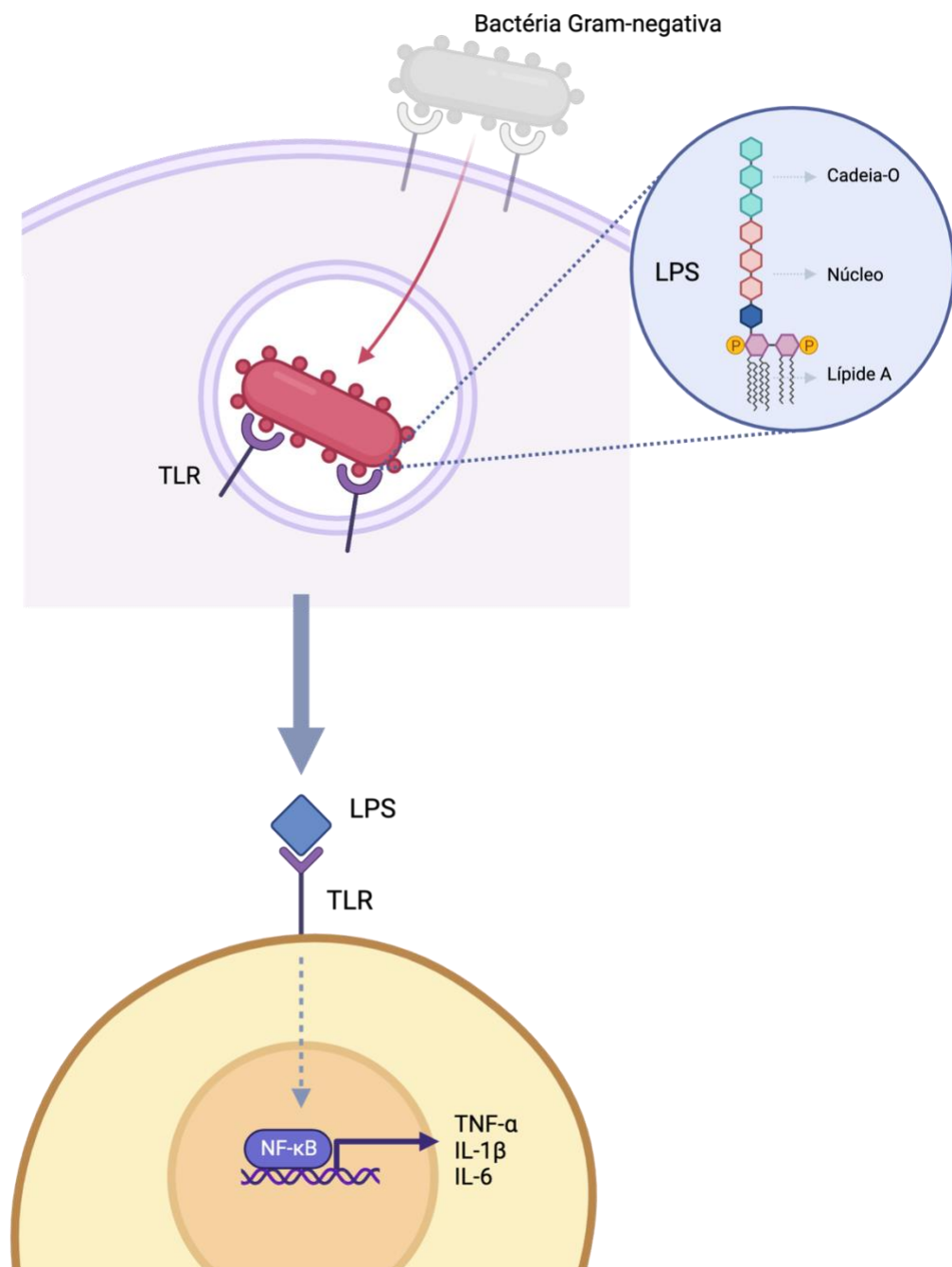


Figura 1 – Modelo simplificado da estrutura dos lipopolissacarídeos e sinalização celular – O LPS é um componente da membrana extracelular das bactérias Gram-negativas e é reconhecido por receptores TLR. Uma vez reconhecido por estes receptores, o LPS sinaliza mecanismos celulares que resultam na translocação do NF-κB para o núcleo, ativando a secreção de citocinas pró-inflamatórias que dão início a outros mecanismos envolvidos na endotoxemia. Criado em Biorender.com.

O desenvolvimento da endotoxemia está envolvido na patogênese de diversas doenças de caráter inflamatório, como cardiovasculares, obesidade e diabetes (Pussinen et al, 2022). A endotoxemia é caracterizada pela alta complexidade dos mecanismos associados ao seu desenvolvimento, os quais atuam de maneira sistêmica e sua compreensão exige um olhar para os micro e macro ambientes envolvidos, desde sinalizações celulares até disfunções teciduais e de órgãos. Dentre os efeitos sistêmicos da endotoxemia, as respostas inflamatórias são frequentemente estudadas, visto que podem ter efeitos duais no organismo. Inicialmente, a inflamação auxilia na identificação e eliminação do patógeno, mas no contexto da endotoxemia, o desequilíbrio prolongado da resposta imune e inflamatória pode resultar em danos teciduais, os quais podem ou não ser reversíveis (Pena et al, 2014; Hotchkiss et al, 2013).

O início da endotoxemia se dá quando o sistema imune é ativado pelo reconhecimento do LPS pelos receptores TLR (Figura 1) (Rivera et al, 2016; Boyd et al, 2014). A partir desta ligação é iniciada uma cascata de sinalização, que ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B), responsável pela regulação da expressão de diversos mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL) pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6). Estas citocinas, juntamente com NF- κ B, constituem um mecanismo de *feedback*, no qual contribuem para a ativação de NF- κ B que induz novamente a expressão das citocinas. Além disso, estas citocinas são responsáveis pela ativação de mecanismos de proliferação e migração celular, expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, ativação de vias de coagulação e de células imunes para a fagocitose de LPS (Kumar et al, 2000; 2001).

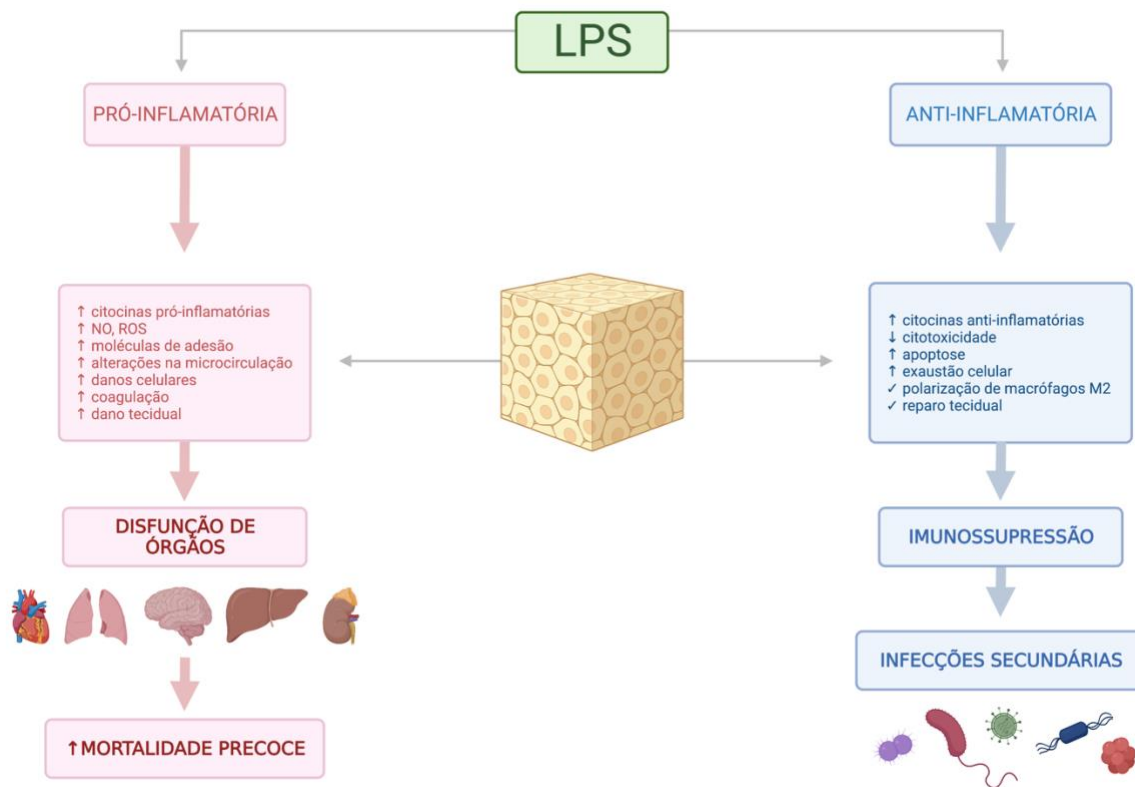


Figura 2 – Efeitos sistêmicos da endotoxemia – Após a sinalização inicial do LPS a nível celular, são ativadas respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. O desenvolvimento de ambas as respostas a nível celular desencadeia respostas teciduais que evoluem para respostas sistêmicas. No perfil pró-inflamatório, o aumento das citocinas pró-inflamatórias e da produção de NO e ROS estimulam danos celulares e respostas endoteliais, como o aumento da expressão de moléculas de adesão, da coagulação e alterações microcirculatórias, com consequente dano tecidual. Em conjunto, esses mecanismos ativados levam à disfunção de órgãos e ao aumento da mortalidade precoce na endotoxemia ou sepse. Já a resposta anti-inflamatória desencadeia mecanismos que, apesar de reduzirem citotoxicidade, ativarem a polarização de macrófagos de fenótipo M2 e o reparo tecidual através do aumento de citocinas anti-inflamatórias, levam a um estado de imunossupressão, o qual aumenta a suscetibilidade do organismo a infecções secundárias. Criado com Biorender.com.

Uma vez que a inflamação sistêmica se instala, o organismo se encaminha para um estado de imunossupressão, caracterizado pela paralisação do sistema imune em resposta à “tempestade” de citocinas anti e pró-inflamatórias. A partir desse estado,

a perfusão tecidual e a microcirculação são prejudicadas, com redução do volume intravascular e desenvolvimento da disfunção de órgãos vitais (Figura 2) (Van der Poll et al, 2021; Chousterman et al, 2017).

1.3 Disfunção cardíaca associada à endotoxemia

Dentre as consequências do desenvolvimento da endotoxemia e da sepse, distúrbios no fluxo sanguíneo que alteram a hemodinâmica e a integridade da microcirculação são frequentes (Collet et al, 2019). Quanto maior o dano causado à microcirculação, pior o prognóstico, visto que essa disfunção pode resultar em aumento de hipóxia, alterações mitocondriais e morte celular, estando diretamente relacionada ao aumento do risco de morte em pacientes endotoxêmicos (Bezemer et al, 2012). É essencial destacar que pacientes que desenvolvem disfunção cardiovascular devido à sepse enfrentam taxas de mortalidade de 70 a 90% em comparação a 20% de taxa dos pacientes que não desenvolvem danos cardiovasculares (Kakihana et al, 2016; Parrillo et al, 1990).

A disfunção cardíaca associada à endotoxemia é um mecanismo já elucidado em modelos experimentais e estudos clínicos, sendo uma das mais relevantes complicações desta síndrome (Rudiger & Singer, 2007; Sturgess et al, 2010; Pulido et al, 2012; Vieillard-Baron 2008). Alguns estudos experimentais mostraram que a ocorrência da depressão miocárdica está geralmente associada a estágios iniciais do insulto infeccioso, tendo relação direta com o prognóstico dos animais (Rudiger & Singer, 2013). Em modelo de sepse com camundongos, foi comprovada a relação da melhora da função cardíaca com o aumento da taxa de sobrevivência (Li et al, 2012).

Em 1984, Parker mostrou que pacientes sobreviventes da sepse apresentaram diminuição da fração de ejeção e aumento no volume diastólico final, enquanto os não-sobreviventes apresentavam fração de ejeção e volume diastólico normais. Essas alterações observadas nos indivíduos sobreviventes foram consideradas adaptativas e reversíveis, como observado no período entre 7^o e 10^o dias após o choque séptico. Apesar do impacto desta descoberta para o entendimento do desenvolvimento da depressão miocárdica na sepse, outros estudos não reproduziram estes resultados. Em análise de 67 pacientes sépticos por um período de 3 anos, a taxa de disfunção do ventrículo esquerdo (VE) nos pacientes atingiu 60%. Apesar de validar as descobertas de Parker com relação à prevalência da disfunção em pacientes críticos, este estudo mostrou que não houve diferença na fração de ejeção inicial entre sobreviventes e não-sobreviventes (Vieillard-Baron et al, 2008). Da mesma forma, em outro estudo com 45 pacientes, houve incidência de disfunção cardíaca nos pacientes internados, sem diferença na fração de ejeção em relação ao status de sobrevivência. Ainda, esse estudo associou a prevalência de disfunção com a presença de marcadores de disfunção endotelial (Furian et al, 2012). Em mais duas meta-análises, não houve validação da força da fração de ejeção como preditor de mortalidade na sepse (Huang et al, 2013; Sevilla et al, 2014).

Ao longo dos anos, diversos mecanismos foram estudados por sua possível associação à disfunção cardíaca associada à endotoxemia, como o inflamatório, apoptótico e o metabólico. Sabemos que, inicialmente, o dano tecidual resulta em alterações oxidativas e hipovolemia, levando à pressão arterial desregulada e, conseqüentemente, a um aumento do débito cardíaco. Sendo assim, há um comprometimento da autorregulação do fluxo coronariano, podendo desenvolver isquemia miocárdica com conseqüente redução de contratilidade e relaxamento

(Hollenberg & Singer, 2021; Romero et al, 2011). Em estudo experimental, ratos sépticos apresentaram queda da pressão de perfusão coronariana na região subendocárdica do VE imediatamente após a injeção do LPS. Essa hipoperfusão foi determinante para o desenvolvimento da fibrose miocárdica e da disfunção ventricular esquerda dos animais. Além disso, foi constatado um intenso processo de morte celular e inflamação, ativação de metaloproteinases (MMP), aumento de estresse oxidativo e de hipertrofia cardíaca associado à doença (Guido et al, 2012). Também, Soriano e colaboradores mostraram que quanto menor o fluxo coronariano, maior a hipoperfusão do VE e, conseqüentemente, maior a porcentagem de mortalidade em pacientes em choque sépticos internados em UTI (Soriano et al, 2014). Além do fluxo coronariano, é possível associar citocinas e outros mediadores inflamatórios à depressão miocárdica resultante da endotoxemia. A infecção acarreta uma resposta imune através da secreção de citocinas, que afetam diretamente o tecido cardíaco com alterações endoteliais e vasculares. TNF- α , IL-1 β , IL-6 e óxido nítrico (NO) estão entre os principais envolvidos nessas alterações (Peng et al, 2003; Zhao et al, 2006).

Em maioria, os pacientes acometidos por endotoxemias que desenvolvem disfunção cardíaca, apresentam comprometimentos a longo prazo e, como mencionado, sabemos que essa disfunção é desencadeada pela combinação de fatores imunológicos, micro circulatórios, de coagulação, endoteliais e oxidativos (Pulido et al, 2012). No entanto, os efeitos das alterações cardíacas, assim como de outros órgãos acometidos pela sepse, ainda são pouco abordados por estudos experimentais e clínicos (Shih et al, 2017). Com isso, torna-se essencial abordar as implicações da disfunção cardíaca pós-sepse, compreendendo os mecanismos envolvidos para desenvolver terapêuticas direcionadas.

1.4 Tratamentos

1.4.1 Manejo da sepse

Atualmente, o manejo do paciente crítico e o tratamento das alterações sistêmicas associadas à sepse baseiam-se em restabelecer a estabilidade hemodinâmica do indivíduo e controlar a infecção (Surviving Sepsis Campaign 2021; Global Burden Disease, 2017; Gauer et al, 2020). Por ser uma síndrome, faz-se necessária a abordagem terapêutica multimodal, o que requer uma avaliação rigorosa dos pacientes de maneira precoce (Pant et al, 2021). Baseado nas recomendações com fortes evidências científicas do Surviving Sepsis Campaign, a primeira medida de tratamento seria o uso da norepinefrina como agente de primeira linha para restabelecer a pressão arterial. Por fim, como terapias adicionais, o estudo sugere o uso de insulina para controle glicêmico em casos acima de 180mg/dL, o uso de heparina de baixo peso molecular para a profilaxia de tromboembolismo venoso e, em casos específicos de choque cardiogênico, o uso da dobutamina ou da epinefrina para aumentar a contratilidade cardíaca. Apesar de ainda haver evidências precárias relacionadas ao uso desses agentes inotrópicos na sepse, na prática clínica são utilizados após a administração inicial da norepinefrina e antes do vasodilatador, garantindo sequencialmente o controle de pressão arterial, o estímulo da contratilidade cardíaca e a redução de pós-carga com segurança (Evans et al, 2021).

Os antibióticos, tratamentos padrão para a endotoxemia, enfrentam uma barreira importante em sua ação, considerando que aproximadamente 80% das mortes estão relacionadas à resistência da infecção por baixa efetividade do tratamento (Schrag et al, 2013). A administração de antibióticos é recomendada no momento inicial do desenvolvimento da doença, preferencialmente dentro de 1 hora

da identificação, deixando uma janela estreita para a realidade da emergência, que geralmente recebe estes pacientes em um momento tardio da doença ou já em choque séptico (Levy et al, 2015; Coz et al, 2017). Além disso, a ação potente dessa classe de fármacos desencadeia respostas celulares que podem ser onerosas quando somadas às ativadas no organismo infectado (Popescu et al, 2020).

Apesar de diversos estudos clínicos randomizados terem avaliado a eficácia e segurança do uso de corticosteróides na sepse, ainda não há fortes evidências para seu uso pela controvérsia dos resultados destes estudos. Em uma meta-análise, 50 estudos clínicos foram incluídos e não foi observado efeito benéfico dos corticosteróides sobre a mortalidade precoce ou tardia (Liang et al, 2021). No entanto, o estudo descreve discreta redução de mortalidade em internados na unidade de terapia intensiva, redução do período de utilização de vasopressores e reversão do choque entre 7 e 28 dias. Com relação a mecanismos envolvidos no choque séptico, os corticosteróides podem ter efeitos benéficos através da redução da formação de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), o que reverteria a resistência a catecolaminas, comum no choque (Vincent et al, 2000).

Com relação à inflamação e outros mecanismos modulados pela cascata de citocinas ativada em resposta à infecção, o uso de antiinflamatórios e imunomoduladores passou a ser considerado (Hunt et al, 2019). Estudos mostram que a administração de imunoterapias é capaz de reduzir a mortalidade na sepse (Hotchkiss et al, 2015; Venet et al, 2018). Dentre os agentes terapêuticos estudados estão os inibidores ou moduladores de TNF- α , que em alguns estudos apresentaram resultados benéficos com relação à mortalidade, mas com limitações em pacientes com perfis inflamatórios específicos (Panaceck et al, 2004). Em oposição, outros

estudos falharam em reproduzir os benefícios da imunomodulação de TNF- α sobre a mortalidade (Abraham et al, 2001). A falta de especificidade celular e da biodisponibilidade de alguns desses agentes abriu espaço para o desenvolvimento de novas abordagens para viabilizar seu uso.

1.4.2 LDE

O *drug targeting*, que é a concentração do fármaco em seu sítio de ação, é uma opção mais adequada para o uso de agentes terapêuticos, sendo capaz de aumentar a captação do fármaco por tecidos altamente proliferativos ou inflamatórios sem que ela aumente em tecidos normais. Com isso, a terapia direcionada garante menor toxicidade, maior especificidade e ainda reduz os custos do tratamento (Bulgarelli et al, 2013).

Em trabalhos desenvolvidos a partir de 1992, Maranhão e colaboradores apresentaram, em projeto pioneiro, nanopartículas lipídicas que mimetizam a estrutura e composição química das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Maranhão et al, 1992; 1993; 1994). Essa nanopartícula foi denominada LDE, por possuir semelhança estrutural com a LDL nativa e pela apolipoproteína E (apoE) que adere a essas nanopartículas. Elas são capazes de concentrar-se em células neoplásicas e, com isso, carrear quimioterápicos especificamente a essas células. Essa foi a primeira demonstração de direcionamento de partículas sólidas artificiais para sítios de ação. As nanopartículas são produzidas sem proteína, porém a estrutura e composição lipídica da LDE, de maneira geral, são semelhantes às LDL, o que permite que, em contato com a corrente circulatória, adquiram apolipoproteínas

presentes em lipoproteínas plasmáticas. A apo E é reconhecida por receptores da LDL e isto permite que a partícula seja captada pelas células pelo mesmo processo de captação da LDL, a endocitose mediada pelo receptor da LDL (Maranhão et al 1993; 1997).

Os receptores de LDL encontram-se acentuadamente expressos em células de caráter altamente proliferativo e sob ação inflamatória, como as neoplásicas (Maranhão et al, 1994; Ho et al, 1978). Esse fenômeno é decorrente da aceleração da mitose destas células que demanda lípidos para atender à síntese de novas membranas exigida pela duplicação celular. Isso resulta em captação aumentada da LDL nativa e da LDE por essas células. Os quimioterápicos de ação terapêutica, ao serem associados à LDE, são captados junto com as nanopartículas após injeção na corrente circulatória e concentram-se assim em células de tecidos-alvo (Maranhão et al, 1994).

Com relação à alta captação destas nanopartículas, documentou-se a captação da LDE em pacientes com carcinoma de mama e ovário. Esta captação foi cinco e dez vezes maior que no tecido normal correspondente, respectivamente (Graziani et al, 2002; Ades et al, 2001). Em dados baseados em cinética plasmática, estimou-se que a concentração da LDE em células de leucemia mielocítica aguda foi de cerca de 50 vezes maior (Maranhão et al, 1994).

Quanto à estabilidade da partícula, ensaios *in vitro* com linhagens celulares (Rodrigues et al, 2002; Valduga et al, 2003), estudos de farmacocinética em animais (Rodrigues et al, 2005) e em pacientes (Maranhão et al, 2002), mostraram que o fármaco transportado pelas nanopartículas não se dissociou delas na circulação, permanecendo na LDE até a entrada nas células, fator indispensável para obtenção

do efeito “drug-targeting”. Com isso, garantiu-se a estabilidade das preparações LDE-quimioterápicos.

Estudos experimentais mostraram que este processo de veiculação reduziu drasticamente a toxicidade dos quimioterápicos (Dorlhiac-Llacer et al, 2001), de cinco a dez vezes em ensaios de determinação de doses letais (Valduga et al, 2003; Rodrigues et al, 2002). Em modelos experimentais, a associação dos quimioterápicos com a LDE intensificou a ação terapêutica tumoral dos fármacos (Rodrigues et al, 2005; Lo Prete et al, 2006). Em pacientes oncológicos, os efeitos do uso de quimioterápicos em sua versão comercial podem levar estes pacientes a óbito, além da ação destes fármacos ser limitada, principalmente em indivíduos com neoplasias malignas avançadas. Os ensaios clínicos nestes pacientes comprovaram a segurança do uso destes fármacos em preparações com a LDE, mesmo em altas doses, confirmando a menor ou até a neutralização de seus efeitos tóxicos (Maranhão et al, 2002).

1.4.3 Metotrexato

O metotrexato (MTX) é um agente antiproliferativo e imunossupressor utilizado no tratamento de diversas doenças por ser um composto da classe dos anti-folatos, ou seja, um inibidor da diidrofolato redutase. Desta forma, ele interfere na síntese do timidilato, de nucleotídeos (purinas e pirimidinas) e de aminoácidos (Cronstein et al, 2020). Além disso, o MTX também inibe a atividade da 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) transformilase, promovendo assim o acúmulo de AICAR e conseqüente aumento de adenosina (Figura 3).

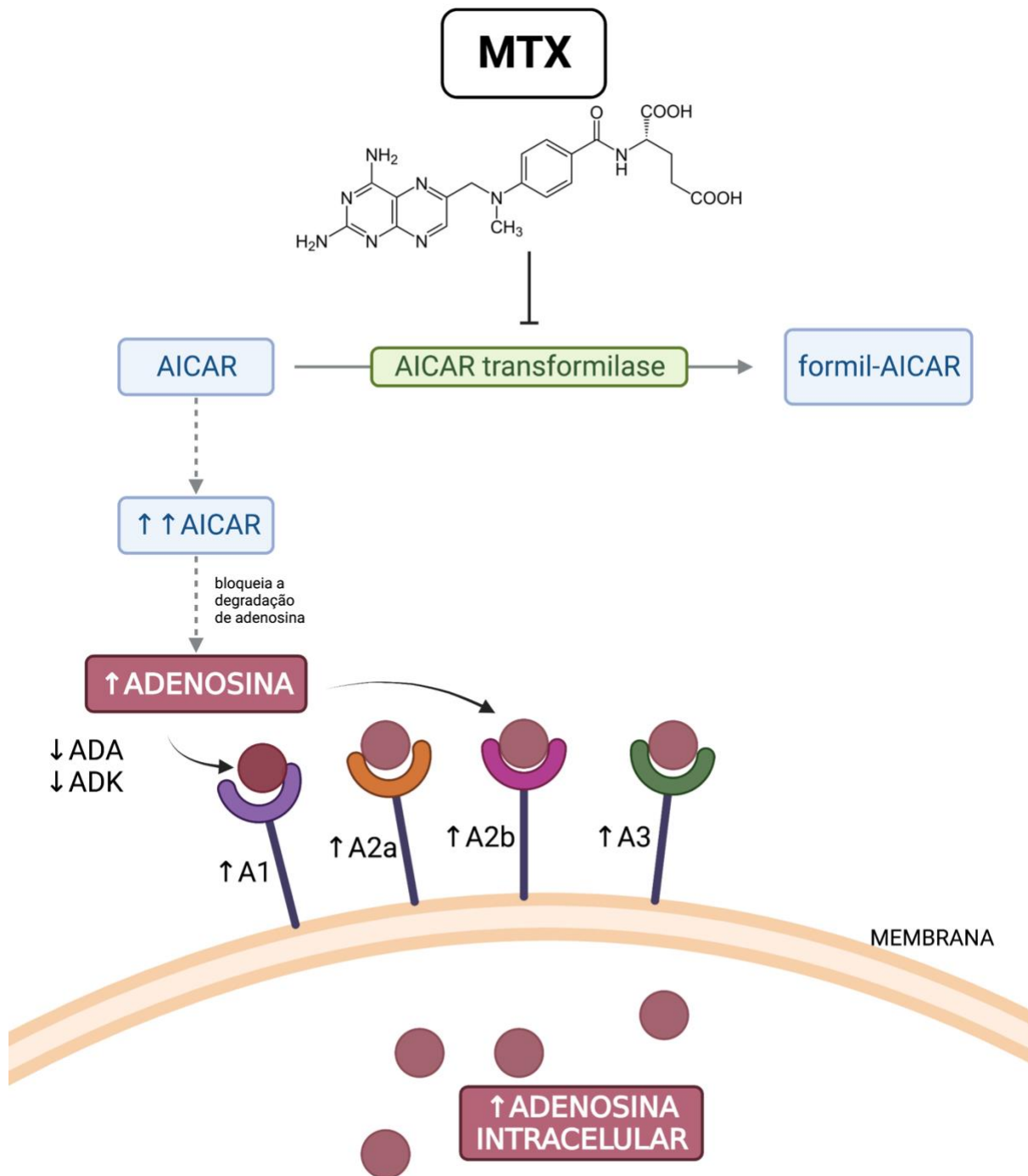


Figura 3 – Mecanismos de ação do metotrexato e receptores de adenosina – O MTX, além de outros mecanismos, atua como um inibidor de AICAR transformilase, enzima que catalisa AICAR em formil-AICAR. Com a inibição dessa enzima, os níveis de AICAR aumentam e a degradação da adenosina é bloqueada, aumentando os níveis extracelulares de adenosina. Em consequência, há estímulo dos receptores de adenosina A1, A2a, A2b e A3 e aumento da biodisponibilidade de adenosina intracelular. Criado com Biorender.com.

A adenosina é uma purina endógena de meia-vida extremamente curta, mas que possui funções de sinalização extracelular relevantes (Santiago et al, 2020), principalmente no contexto da sepse (Nemeth et al, 2006; Ledderose et al, 2016; Meriño et al, 2020) e de nosso estudo. Essa purina atua em diversos sistemas, como cardiovascular (Headrick et al, 2013), pulmonar (Van Linden et al, 2007), renal (Truong et al, 2016) e imune (Cekic et al, 2016). Em condições fisiológicas, os níveis de adenosina se resumem a baixas concentrações, porém, em condições de hipóxia, inflamação e estresse, há um aumento dos níveis dessa molécula, o que confere proteção ao dano tecidual. A hipóxia celular é um estímulo potente da liberação de adenosina, que ultrapassa membranas para manter os níveis intra e extracelular equivalentes (Feoktistov et al, 2004). Com relação à disfunção cardíaca na sepse, a adenosina tem efeitos cardioprotetores, visto sua ação vasodilatadora e antiplaquetária (Headrick & Lasley, 2009; Cohen & Downey, 2011). Em concordância com estes mecanismos, uma análise de estudos observacionais que totalizou 66334 indivíduos mostrou que o MTX, quando administrado em doses entre 13 e 15 mg, é capaz de reduzir o risco de doença cardiovascular em 21%. Ainda, o MTX reduziu o risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) em 18% nos pacientes com inflamação sistêmica (Micha et al, 2011).

Os receptores de adenosina são acoplados à proteína G e podem ser encontrados em diversos tipos celulares, atuando como um sistema de sensores de dano tecidual (Fredholm et al, 2011). O dano e a ativação da inflamação estimulam a síntese e liberação de adenosina, a qual é recrutada para suprimir a resposta imunológica (Nascimento et al, 2021). O efeito da adenosina é dependente do desenvolvimento da doença e da afinidade de cada receptor (Csóka et al, 2018).

Como o receptor A1 tem alta afinidade pela adenosina e está associado a atividades pró-inflamatórias, essas atividades predominam em momentos com baixa dose de adenosina. Quando os níveis plasmáticos de adenosina estão mais altos, outros receptores predominam e suas atividades também, funcionando assim como um *feedback* negativo ao sistema imune (Haskó et al, 2004). Dentre os mecanismos que esses receptores modulam, estão a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, polarização do fenótipo macrofágico de M1 para M2 (Fig. 2) e o aumento da produção de fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Haskó & Cronstein, 2013; Poth et al, 2013; Valladares et al, 2008).

Com relação à toxicidade do MTX, ela é relativamente baixa quando comparada a outros agentes antineoplásicos, porém, em altas doses, ainda confere diversos efeitos colaterais, como a toxicidade hepática, renal e doenças pulmonares crônicas (Huenekens et al, 1994). Atualmente, o MTX é eminentemente utilizado no tratamento de doenças de caráter inflamatório, proliferativo e autoimunes, o que o torna um agente atraente para o tratamento da sepse.

1.4.4 LDEMTX

Em estudo de Maranhão e colaboradores (2008), coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol foram submetidos a injeção com LDE marcada com radioativos, mostrando que as nanopartículas se concentraram nas lesões ateroscleróticas, reproduzindo o que já havia sido observado em tumores. A LDE marcada radioativamente foi captada 2 vezes mais nas aortas de coelhos com placas ateroscleróticas quando comparado às aortas de coelhos alimentados com dieta

comum. Resultados semelhantes foram obtidos com o tratamento da LDEMTX (Bulgarelli et al, 2013). O aumento do número de macrófagos na íntima e a proliferação das células musculares lisas foram menores pelo tratamento com LDEMTX, e esses efeitos foram consequência do efeito inibitório dessas drogas sobre fatores pró-inflamatórios, como a IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF- κ B e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. A partir destes achados, estabeleceu-se experimentalmente um novo tratamento para a aterosclerose.

Outro estudo realizado com coelhos com artrite induzida, mostrou o potencial da LDEMTX em não só aumentar a captação do fármaco em 2,5 vezes mais na região inflamada, como também reduzir os efeitos inflamatórios, como infiltração de células imunes e extravasamento proteico (Mello et al, 2013). Em modelo de transplante, coelhos que receberam o tratamento com LDEMTX apresentaram redução da estenose coronariana e do recrutamento macrofágico à região transplantada, em 20% e 80%, respectivamente. Houve atenuação da necrose celular e redução da expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios e de adesão celular (Fiorelli et al, 2017).

Em estudo com ratos induzidos ao IAM por ligadura da artéria coronária descendente anterior, testamos a preparação LDEMTX administrada intraperitonealmente. Na avaliação realizada 6 semanas após o infarto, verificou-se que o tratamento resultou em 40% de melhora da função ventricular, na redução da área de infarto e redução do infiltrado inflamatório do VE (Maranhão et al, 2017). A LDEMTX apresentou ação pró-angiogênica através da expressão de VEGF, o que contribuiu para a redução da hipóxia celular. Além da ativação de mecanismos anti-

inflamatórios e anti-fibróticos, houve redução de morte celular tanto por apoptose quanto por necrose e dos níveis de estresse oxidativo. Estes mecanismos foram ativados através da modulação dos receptores A1, A2a, A2b e A3 de adenosina pelo MTX, aumentando a biodisponibilidade de adenosina intracelular e resultando na melhora da função cardíaca e redução do tamanho da região do infarto nestes animais.

Recentemente, publicamos o efeito do tratamento com LDEMTX em aneurisma de aorta de camundongos com síndrome de Marfan. LDEMTX foi capaz de prevenir a dilatação e dissecação da aorta ascendente e descendente e do arco aórtico destes animais, enquanto o grupo MTX não alterou a dilatação e dissecação aórtica. O tratamento com o quimioterápico LDEMTX também reduziu o processo inflamatório, apoptótico e fibrótico. Ao analisar a modulação de receptores de adenosina, os animais tratados com LDEMTX tiveram os níveis do receptor A2a aumentados (Guido et al, 2022).

Em suma, o MTX é um quimioterápico antineoplásico de ação antiproliferativa e anti-inflamatória e a nova formulação LDEMTX representa uma inovação radical para o tratamento da endotoxemia, da sepse e do choque séptico. Os resultados positivos obtidos em nossos estudos anteriores, projetam ação farmacológica eficiente sobre os principais fatores geradores da sepse, mostrando a grande eficácia e reduzida toxicidade destas preparações em neoplasias e doenças cardiovasculares. Assim, tornou-se eminente estudar os efeitos desta preparação em modelo experimental de ratos com disfunção cardíaca associada à endotoxemia induzida por LPS.

2. JUSTIFICATIVA

Como vimos, a disfunção ventricular associada à endotoxemia é caracterizada pela modulação de mecanismos celulares que, ao serem continuamente ativados, resultam em desequilíbrios sistêmicos. O controle desses mecanismos é uma possível estratégia terapêutica que tem sido pouco explorada, principalmente pelas limitações no diagnóstico precoce e na especificidade do tratamento. Dessa forma, o uso da LDEMTX, que tem a capacidade de aumentar a eficácia terapêutica e neutralizar a toxicidade do MTX, pode ser promissor para prevenir as complicações cardiovasculares resultantes da sepse.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da LDEMTX sobre a disfunção ventricular esquerda em ratos com endotoxemia induzida por LPS e investigar os mecanismos modulados pelo tratamento.

3.2 Objetivos Secundários

- a) Análise da expressão de marcadores de apoptose, perfil oxidativo, inflamação, MMPs, troponina I, hipertrofia cardíaca e fibrose miocárdica, para compreensão do impacto do tratamento com LDEMTX;
- b) Avaliação da toxicidade do MTX e da LDEMTX no tratamento de animais endotoxêmicos;
- c) Estabelecer bases experimentais para um novo e mais eficiente tratamento para a endotoxemia;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo animal

Para a realização desse estudo, foram utilizados machos Wistar Kyoto, pesando entre 230 a 300 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com no máximo 4 animais por gaiola, em ambiente climatizado, com ciclo claro:escuro 12:12h, receberam ração comercial (Nuvital, Colombo, Brazil) e água *ad libitum*. Os animais permaneceram durante todo o experimento no Biotério da Divisão Experimental do InCor-HC-FMUSP, sob responsabilidade da veterinária Dra Edna Aparecida Diniz Paulo.

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo The Universities Federation for Animal Welfare. O protocolo experimental foi aprovado pela Cappesq-HCFMUSP (nº 1374/2020).

4.2 Desenho experimental

Após o período de adaptação dos animais no biotério, 25 ratos foram randomizados e alocados em 4 grupos experimentais:

- 1) LPS-LDEMTX (n=7): animais submetidos a indução da endotoxemia tratados com LDEMTX;

- 2) LPS-MTX (n=6): animais submetidos a indução da endotoxemia tratados com MTX em sua formulação comercial;
- 3) LPS-LDE (n=7): animais submetidos a indução da endotoxemia tratados apenas com a LDE;
- 4) CT (controle, n=5): animais saudáveis que receberam injeção de solução fisiológica.

A endotoxemia foi induzida por 2 injeções intraperitoneais (i.p.) de LPS na dose de 10mg/Kg com intervalo de 24 horas entre ambas as injeções. O tratamento dos animais foi realizado 1 hora após a segunda dose de LPS, na dose de 1mg/Kg ip.

24 horas após a segunda injeção de LPS, os animais foram submetidos a ecocardiografia do VE, foi coletado sangue para os ensaios de perfil bioquímico e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia por dose letal de anestésico tiopental sódico (100mg/Kg i.p.; Cristália, Itapira, Brasil).

4.3 Síntese do derivado de MTX, preparação da LDE e associação com a LDEMTX

MTX em sua formulação comercial (Fagron, Rotterdam, Netherlands) foi submetido à reação de derivatização de modo a aumentar seu potencial lipofílico e melhorar sua associação com a LDE. Para isso, o MTX foi diluído em dimetilsulfóxido e foram adicionados carbonato de césio e brometo de dodecila. Após 24 horas de agitação em temperatura ambiente, a reação foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC) (Nexera X2 Shimadzu, MO, EUA) para a determinação da taxa de conversão do MTX. Em seguida, adicionou-se água à reação e o produto foi

extraído por clorofórmio. A fase orgânica foi submetida a sucessivas lavagens com solução saturada de cloreto de sódio e foi seca com sulfato de magnésio. O produto foi filtrado e concentrado por rota evaporador (Rotavapor R-300, Buchi, Switzerland). Finalmente, o derivado do MTX foi precipitado em metanol, filtrado e seco em dissecador à vácuo (Moura et al, 2011).

A LDE foi preparada a partir de uma mistura de lípides constituída por fosfatidilcolina (Lipoid, Ludwigshafen, Germany), colesterol esterificado (Aesar, MA, USA), colesterol não esterificado (Fabrichem, Connecticut, USA) e triglicérides (TG) (Sasol Germany GmbH, Hamburg, Germany) (Maranhão et al, 1993). A emulsificação dos lípides, com ou sem o derivado do MTX, foi realizada adicionando-se Tris-HCl em um homogeneizador de alta pressão Emulsiflex C5 (Avestin Inc., Ottawa, Canada). O tamanho da partícula (50-70nm) foi analisado por espalhamento de luz dinâmico a 90° usando o equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern, Malvern, United Kingdom). A porcentagem de associação do derivado do MTX com a LDE foi analisada novamente por UHPLC (Nexera X2, Shimadzu, Duisburg, Germany) utilizando o método isocrático de coluna de sílica C18 e acetonitrila (90:10 v/v), a 254nm. As nanopartículas (apenas LDE e LDEMTX) foram esterilizadas em filtro de policarbonato 0,22µm (Merck Millipore, MA, EUA) em fluxo laminar e armazenada a 4°C em frascos de vidro estéreis.

4.4 Perfil bioquímico

Imediatamente após a eutanásia, amostras de sangue foram coletadas pela veia cava inferior dos animais para dosagem do perfil hematológico, lactato, marcadores de função hepática e renal e lípides séricos. Sangue e plasma foram enviados para o

laboratório – LIM03 (Laboratório de Investigação Médica) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para os ensaios laboratoriais.

Para análise do perfil hematológico e do lactato, as amostras de sangue foram coletadas em tubo com anticoagulante EDTA. Pelo método automatizado Poch 100iV Diff Sysmex-Roche (Roche, Basel, Switzerland), analisamos os seguintes parâmetros: eritrócitos, hematócrito, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas. Quando necessário, foi realizado estudo morfológico de extensão sanguínea corada com corante panóptico para confirmação de resultado.

Para análise de marcadores de função hepática e renal e lípidos séricos foi coletado sangue em tubo com anticoagulante heparina. O plasma foi obtido por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos (COBAS c111 - Roche, Basel, Switzerland). Os seguintes parâmetros foram analisados pelo método enzimático colorimétrico automatizado: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), uréia, creatinina, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), colesterol não HDL (não-HDL-c) e TG.

4.5 Ecocardiografia

A ecocardiografia do VE foi realizada ao final do protocolo experimental, ou seja, 24 horas após a segunda injeção de LPS e seguiu as recomendações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Lang et al, 2005).

Os animais foram anestesiados com isoflurano a 2%, foram submetidos à tricotomia e posicionados em decúbito lateral esquerdo. As imagens foram obtidas usando um sistema Vevo 2100 (Visual Sonics, Toronto, Canadá) equipado com uma

sonda de 40 MHz. A avaliação estrutural e funcional do VE foi medida pelo modo-M com doppler colorido.

Os parâmetros ecocardiográficos avaliados e calculados foram: diâmetro diastólico (DD) e sistólico (DS); volume diastólico (Vol D) e sistólico (Vol S); espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior (PP); espessura relativa de parede (ERP); massa do VE (mVE); fração de ejeção (FE) e de encurtamento (Fen); Variação fracional da área (FAC); Onda E/A; tempo de desaceleração (DT) e de relaxamento isovolumétrico (TRIV); frequência cardíaca (FC), débito cardíaco (DC) e *stroke volume* (SV).

Todas as medidas foram analisadas em três ciclos cardíacos representativos de cada animal e foram realizadas às cegas pelo pesquisador responsável.

4.6 Peso relativo do coração

Após a retirada de sangue, o coração foi removido, limpo e pesado. O peso relativo do coração foi obtido pela normalização pelo peso corporal final dos animais (mg/Kg).

4.7 Morfometria

Uma fatia transversal do miocárdio na porção equatorial dos ventrículos foi processada em parafina e dela foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura.

Para a avaliação da hipertrofia do VE, analisou-se o diâmetro dos miócitos. Foram utilizados cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), sob aumento de 400x. Foram selecionados apenas miócitos da parede livre do VE com disposição longitudinal e núcleos ovalados e centralizados (Guido et al, 2004; 2007).

Para a avaliação da fibrose miocárdica foram utilizados cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson, sob aumento de 200x. A fibrose foi estimada pela fração de volume do colágeno (FVC, %), calculada pela razão percentual entre a área de tecido corado positivamente para colágeno, em azul, e a área total do miocárdio (Guido et al, 2004; 2007).

4.8 Expressão gênica por qRT-PCR

Após a retirada da fatia equatorial do miocárdio, fragmento (~1 mg de tecido) do ápice dos VE foram retirados e conservados em solução de RNAlater® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese e sua concentração determinada por espectrofotômetro através do aparelho NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Uma alíquota de RNA foi utilizada para a transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa do RNA e obtenção do DNA complementar (cDNA) adicionou-se o mix de SuperScript® VILO™ (SuperScript® VILO™ MasterMix, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ao RNA que foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a 25°C, por 60 minutos a 42°C e, por fim, por 5 minutos

a 85°C. No final, os cDNAs sintetizados foram diluídos em tampão Tris-EDTA e armazenados a -20°C.

A expressão gênica foi analisada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e o sistema de emissão de luz selecionado para o estudo foi o sistema TaqMan (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (Tabela 2).

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis quando apresentaram desvio padrão menor que 0,4 ou quando apresentaram diferença de Ct < 1. Em cada reação utilizou-se o reagente TaqMan Gene Expression Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), o reagente TaqMan Gene Expression Assays 20x (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) específico para cada gene alvo a ser analisado, e o cDNA. As condições de termociclagem da reação seguiram os parâmetros de fábrica do aparelho ajustados para um pré-aquecimento a 50°C, denaturação a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos de denaturação e 60°C por 1 minuto de anelamento dos primers e extensão.

A quantificação da expressão gênica bruta foi calculada através do método Ct comparativo demonstrado pelo algoritmo $2^{-\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). O valor de ΔCt foi calculado pela diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. O gene normalizador utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

A expressão gênica no VE de ratos endotoxêmicos foram analisadas pelo:

- Processo inflamatório: IL-1 β , IL-6 e IL-10;
- Perfil oxidativo: óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS);

A Tabela 2 descreve as identificações das TaqMan utilizadas para expressão gênica por qRT-PCR.

Tabela 2. Descrição das identificações das TaqMan utilizadas para expressão gênica por qRT-PCR.

Gene	Identificação da TaqMan (Assay ID)
eNOS	Rn02132634_s1
iNOS	Rn00561646_m1
GAPDH	Rn01775763_g1
IL-1 β	Rn00580432_m1
IL-6	Rn01410330_m1
IL-10	Rn00563409_m1

eNOS, óxido nítrico-sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico-sintase induzida; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; IL, interleucina.

4.9 Expressão proteica por Western blot

Fragmentos (~1 mg de tecido) dos ápices dos VE foram colocados em tampão RIPA com os inibidores de proteases aprotinina, leupeptina e fluoreto-fenil-metil-sulfonil (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) para homogeneização em Polytron. As amostras foram agitadas e centrifugadas para a coleta do sobrenadante que contém as proteínas totais. As proteínas foram quantificadas em triplicata pelo método de Bradford 595nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em leitor de

multiplacas (Victor X3, Perkin Elmer, CA, USA). 50 µg de proteínas foi adicionado ao tampão de amostra Laemmli 3x (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). A porcentagem de poliacrilamida foi escolhida de acordo com o peso molecular da proteína alvo. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e foram coradas com Ponceau S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para verificação da eficácia da transferência das proteínas do gel para a membrana.

As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% por 2 horas e foram incubadas com os anticorpos primários por 12 horas sob agitação à 4°C e, em seguida, foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Calbiochem, CA, EUA). A detecção foi realizada usando o método de quimioluminescência. As imagens foram capturadas e analisadas pelo sistema Amersham Image 600 Imaging (Amersham GE, CT, EUA). O normalizador utilizado foi o GAPDH e os resultados foram expressos em porcentagem em relação às médias do grupo CT.

A expressão proteica no VE de ratos endotoxêmicos foram estudados por:

- Apoptose: caspase 9, proteína X associado a Bcl-2 (BAX), linfoma de célula B (Bcl-2);

- Processo inflamatório: linfócito T (CD3); macrófago (CD68), MCP-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e NFκB;

- Metaloproteinases: MMP-2 e MMP-9;

- Troponina I;

- Fibrose miocárdica: fator transformação de crescimento tipo beta (TGF-β) e colágeno tipo 1 e colágeno tipo 3;

- Angiogênese: VEGF, angiopoietina 1/2 e angiostatina
- Hipóxia celular: fator induzível por hipóxia tipo 1 alfa (HIF-1 α);
- Adenosina: receptores A1, A2a, A2b e A3 de adenosina, adenosina deaminase (ADA) e adenosina quinase (ADK).

A Tabela 3 descreve a marca, nº do catálogo, o peso molecular e a diluição dos anticorpos primários utilizados para os ensaios de expressão proteica por Western blot.

Tabela 3. Descrição dos anticorpos primários utilizados para os ensaios de expressão proteica por Western blot.

Anticorpo primário	Marca do anticorpo	Número de catálogo	Peso molecular (KDa)	Diluição
Anti-adenosine A1 receptor	Abcam	Ab82477	36	1:1.000
Anti-adenosine A2a receptor	Abcam	Ab3461	36	1:1.000
Anti-adenosine A2b receptor	Abcam	Ab135865	37	1:1.000
Anti-adenosine A3 receptor	Abcam	Ab197650	36	1:1.000
Anti-adenosine deaminase	Calbiochem	Ab176	41	1:1.000
Anti-adenosine kinase	Abcam	Ab38010	41	1:1.000
Anti-angiopoietina 1/2	Abcam	Ab65835	65	1:1.000
Anti-angiostatina	Abcam	Ab2904	50	1:1.000
Anti-BAX	Abcam	Ab7977	26	1:500
Anti-Bcl-2	Abcam	Ab59348	26	1:1.000
Anti-colágeno tipo 1	Abcam	Ab90395	139	1:1,000
Anti-colágeno tipo 3	Abcam	Ab7778	138	1:500
Anti-caspase 9	Sigma-Aldrich	C7729	35	1:1.000
Anti-CD3	Abcam	Ab5690	23	1:500
Anti-CD68	Abcam	Ab125212	35	1:1.000
Anti-GAPDH	Millipore	CB1001	36	1:10.000
Anti-HIF-1 α	Sigma-Aldrich	SAB2702132	93	1:1.000
Anti-MCP-1	Abcam	Ab25124	25	1:1.000
MMP-2	Abcam	Ab37150	72	1:1.000
MMP-9	Abcam	Ab38898	82	1:1.000
Anti-NF κ B	Abcam	Ab16502	64	1:1.000
Anti-TGF β	Abcam	Ab92486	44	1:1.000
Anti-TNF- α	Abcam	Ab1793	17	1:1.000

Anti-troponina I	Abcam	Ab10231	24	1:1.000
Anti-VEGF	Abcam	Ab46154	23	1:1.000

BAX, proteína X associado a Bcl-2; Bcl-2, linfoma de célula B; CD3, linfócito T; CD68, macrófago; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HIF-1 α , fator induzível por hipóxia tipo 1 alfa; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos tipo 1; MMP, metaloproteinase; NFkB, fator nuclear kappa B; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

4.10 Análise estatística

Os dados estão expressos em médias \pm SEM. Para verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para os dados aprovados no teste de normalidade, usamos ANOVA-one way complementada pelo pós-teste de Tukey. Para os dados que não passaram da normalidade, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. A regressão linear foi utilizada para testar potenciais relações entre os marcadores pró-angiogênicos, VEGF e Angiopietina 1/2, com as respostas celulares obtidas pela análise ecocardiográfica, morfométrica, de expressão gênica e proteica do VE. As análises estatísticas foram realizadas com os softwares estatísticos GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software Inc., CA, EUA) e SPSS v.22 (IBM Software).

5. RESULTADOS

5.1 Peso corporal e mortalidade

A Tabela 4 mostra o peso corporal dos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTEX. Não houve diferença no peso inicial dos animais, no entanto, houve perda de peso de ~10 vezes nos animais LPS-LDE, LPS-MTX e LPS-LDEMTEX em comparação ao grupo CT ($p < 0,001$).

Tabela 4: Peso corporal de ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTEX.

	CT	LPS-LDE	LPS-MTX	LPS-LDEMTEX
Peso inicial (g)	249 ± 14	306 ± 12	255 ± 12	253 ± 11
Peso final (g)	237 ± 2	265 ± 10	220 ± 11 ^a	211 ± 7 ^a
Varição de peso (g)	4 ± 1	-41 ± 3 ^b	-35 ± 1 ^b	-36 ± 4 ^b

CT, controle; LPS, lipopolissacarídeos; MTX, metotrexato; LDE, nanopartícula lipídica; a, $p < 0,01$ vs LPS-LDE; b, $p < 0,001$ vs CT.

5.2 Perfil hematológico

Com o intuito de avaliarmos a toxicidade hematológica do MTX, determinou-se o perfil hematológico nos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTEX. Ratos endotoxêmicos mostraram aumento na contagem de monócitos ($p < 0,01$) e diminuição na contagem de plaquetas ($p < 0,001$) em comparação ao grupo CT. O

tratamento com MTX e LDEMTX não alterou a contagem de monócitos e plaquetas em relação ao grupo LPS-LDE (Tabela 5).

Não houve diferença na contagem de eritrócitos, hematócritos, leucócitos, neutrófilos e linfócitos nos grupos CT, LPS-LDE, LPS-MTX e LPS-LDEMTX (Tabela 5).

Tabela 5. Hemograma em ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX.

	CT	LPS-LDE	LPS-MTX	LPS-LDEMTX
Eritrócitos (milhões/mm ³)	6,6 ± 0,2	6,9 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,4
Hematócritos (%)	36 ± 5	41 ± 1	39 ± 2	40 ± 2
Leucócitos (mil/mm ³)	5,9 ± 0,6	8,2 ± 1,0	6,8 ± 0,9	8,4 ± 1,2
Neutrófilos (mil/mm ³)	1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,9 ± 0,3
Linfócitos (mil/mm ³)	4,5 ± 0,4	3,9 ± 0,9	3,5 ± 0,4	4,2 ± 0,7
Monócitos (mil/mm ³)	0,18 ± 0,04	2,36 ± 0,23 ^a	1,68 ± 0,29 ^b	2,27 ± 0,45 ^a
Plaquetas (mil/mm ³)	791 ± 51	61 ± 18 ^c	37 ± 11 ^c	38 ± 3 ^c

CT, controle; LPS, lipopolissacarídeos; MTX, metotrexato; LDE, nanopartícula lipídica. a, p<0,01 vs CT; b, p<0,05 vs CT; c, p<0,001 vs CT.

5.3 Função hepática, função renal e lactato

A toxicidade do MTX também foi determinada pela função hepática, pela função renal e pelo lactato de animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX. Não houve diferença no perfil hepático e no nível de creatinina e do lactato entre os grupos CT e LPS-LDE. Entretanto, apenas os níveis de uréia foram maiores no grupo LPS-LDE quando comparados à CT (p<0,001).

O tratamento com MTX e com LDEMTX diminuíram o nível de uréia em comparação ao grupo LPS-LDE ($p < 0,05$) e em relação ao grupo CT ($p < 0,05$), respectivamente. A LDEMTX não apresentou toxicidade hepática, enquanto, que o tratamento com MTX apresentou relevante toxicidade, sendo esta demonstrada pelo aumento no nível de AST em comparação aos grupos CT ($p < 0,05$) e LPS-LDEMTX ($p < 0,05$) e no nível de GGT em comparação ao grupo CT ($p < 0,05$). Nos grupos LPS-MTX e LPS-LDEMTX não houve alteração dos níveis de ALT, creatinina e lactato em comparação aos grupos CT e LPS-LDE, (Tabela 6).

Tabela 6. Função hepática, função renal e lactato de ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX.

	CT	LPS-LDE	LPS-MTX	LPS-LDEMTX
<u>Função hepática</u>				
ALT (U/L)	47 ± 10	37 ± 10	34 ± 4	36 ± 6
AST (U/L)	77 ± 6	153 ± 28	193 ± 46 ^a	77 ± 6 ^b
GGT (U/dL)	8 ± 1	14 ± 2	22 ± 7 ^a	10 ± 1
<u>Função renal</u>				
Uréia (mg/dL)	51 ± 3	88 ± 6 ^c	67 ± 3 ^d	72 ± 4 ^d
Creatinina (mg/dL)	0,27 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,37 ± 0,03
Lactato (mg/dL)	66 ± 12	66 ± 7	46 ± 2	56 ± 3

CT, controle; LPS, lipopolissacarídeos; MTX, metotrexato; LDE, nanopartícula lipídica; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase. a p<0,05 vs CT; b p<0,05 vs LPS-MTX; c, p<0,001 vs CT; d, p<0,05 vs LPS-LDE.

5.4 Perfil lipídico

Com o intuito de verificar os níveis séricos de lípidos decorrentes da administração da LDE, o perfil lipídico foi avaliado em animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX. Comparado a CT, houve menor nível sérico de colesterol total (p<0,05) e de TG (p<0,01) no grupo LPS-LDE. O tratamento com MTX e com LDEMTX aumentou o nível sérico de HDL-c, mas não alterou o nível sérico de TG que permaneceu baixo assim como no grupo LPS-LDE. Além disso, o tratamento

com LDEMTX diminuiu o não-HDL-c ($p < 0,05$) quando comparado também ao grupo LPS-LDE (Tabela 7).

Tabela 7. Perfil lipídico em ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX.

	CT	LPS-LDE	LPS-MTX	LPS-LDEMTX
Colesterol total (mg/dL)	78 ± 7	55 ± 3 ^a	64 ± 4	61 ± 4
HDL-c (mg/dL)	40 ± 6	23 ± 3	45 ± 3 ^b	42 ± 7 ^b
não-HDL-c (mg/dL)	9 ± 2	20 ± 6	7 ± 2	3 ± 1 ^b
TG (mg/dL)	146 ± 32	59 ± 5 ^c	55 ± 6 ^c	56 ± 2 ^d

CT, controle; LPS, lipopolissacarídeos; MTX, metotrexato; LDE, nanopartícula lipídica; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; não-HDL-c, colesterol não HDL; TG, triglicérides. a, $p < 0,05$ vs CT; b, $p < 0,05$ vs LPS-LDE; c, $p < 0,01$ vs CT; d, $p < 0,001$ vs CT.

5.5 Ecocardiografia

A Tabela 8 mostra a avaliação ecocardiográfica dos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e com LDEMTX. Comparado a CT, o grupo LPS-LDE apresentou redução da cavidade do VE e disfunção diastólica, representado pelo menor diâmetro e volume diastólico do VE ($p < 0,05$) e pela onda E/A ($p < 0,05$), respectivamente.

O tratamento com MTX e com LDEMTX foram eficazes, pois preservaram o diâmetro e volume diastólico e a função diastólica do VE para valores semelhantes ao grupo CT. Entretanto, em comparação aos grupos CT, LPS-LDE e LPS-MTX, o

tratamento com LDEMTX aumentou a hipertrofia do VE, representada pelo aumento da espessura do septo interventricular, da parede posterior e da massa do VE.

Não houve diferença da função sistólica, representada pela fração de ejeção, fração de encurtamento e da variação fracional da área, da frequência cardíaca, do débito cardíaco e do *stroke volume* do VE nos animais CT, LPS-LDE, LPS-MTX e LPS-LDEMTX (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação ecocardiográfica do ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos após tratamento com MTX ou LDEMTX.

	CT	LPS-LDE	LPS-MTX	LPS-LDEMTX
DD (mm/g)	3,34 ± 0,03	2,68 ± 0,11 ^a	3,28 ± 0,14 ^b	3,40 ± 0,11 ^b
Vol D (µL/g)	1,32 ± 0,03	1,05 ± 0,06 ^a	1,21 ± 0,05	1,25 ± 0,06
DS (mm/g)	2,01 ± 0,22	1,79 ± 0,14	1,99 ± 0,09	1,95 ± 0,16
Vol S (µL/g)	4,63 ± 1,08	4,01 ± 0,59	3,91 ± 0,24	3,75 ± 0,66
SIV (mm/g)	5,01 ± 0,37	5,55 ± 0,19	6,14 ± 0,15 ^a	7,29 ± 0,25 ^{c,d,e}
PP (mm/g)	5,64 ± 0,06	6,07 ± 0,26	6,82 ± 0,41	8,79 ± 0,68 ^{b,f,g}
mVE (mg/g)	298 ± 11	284 ± 13	306 ± 14	375 ± 17 ^{b,f,h}
ERP	0,33 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,51 ± 0,06
FE (%)	66 ± 7	63 ± 4	68 ± 2	69 ± 4
Fen (%)	39 ± 6	35 ± 3	39 ± 1	41 ± 3
FAC (%)	52 ± 5	49 ± 3	58 ± 1	54 ± 2
Onda E/A	1,86 ± 0,12	1,24 ± 0,06 ^g	1,49 ± 0,10	1,51 ± 0,15
TRIV (ms)	19,7 ± 1,3	21,7 ± 0,8	22,0 ± 1,5	21,0 ± 1,3
DT (ms)	29,7 ± 3,1	26,4 ± 2,7	30,0 ± 3,3	22,4 ± 2,6
FC (bat/min)	393 ± 34	392 ± 10	380 ± 28	383 ± 16
DC (mL/min)	180 ± 27	165 ± 17	150 ± 14	169 ± 5
SV (µL)	191 ± 26	181 ± 15	171 ± 11	178 ± 7

CT, controle; LPS, lipopolissacarídeos; MTX, metotrexato; LDE, nanopartícula lipídica; DD, diâmetro diastólico; Vol D, volume diastólico; DS, diâmetro sistólico; Vol S, volume sistólico; SIV, espessura do septo interventricular; PP, espessura da parede posterior; mVE, massa do ventrículo esquerdo; ERP, espessura relativa de parede (ERP); FE, fração de ejeção; Fen, fração de encurtamento; FAC, variação fracional da área; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico; DT, tempo de desaceleração; FC, frequência cardíaca; DC, débito cardíaco; SV, *stroke volume*. a, p<0,05 vs CT; b, p<0,01 vs LPS-LDE; c, p<0,001 vs CT; d, p<0,001 vs LPS-LDE; e, p<0,01 vs LPS-MTX; f, p<0,01 vs CT; g, p<0,05 vs CT; h, p<0,05 vs LPS-MTX.

5.6 Peso relativo do coração e diâmetro dos miócitos

O peso relativo do coração e o diâmetro dos miócitos foram avaliados em animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 4).

Não houve diferença no peso relativo do coração e no diâmetro dos miócitos do VE entre os grupos CT e LPS-LDE. Entretanto, os animais endotoxêmicos tratados com LDEMTX aumentaram o peso relativo do coração em comparação ao grupo CT ($p < 0,05$) e o diâmetro dos miócitos em comparação aos grupos CT ($p < 0,05$), LPS-LDE ($p < 0,01$) e LPS-MTX ($p < 0,01$).

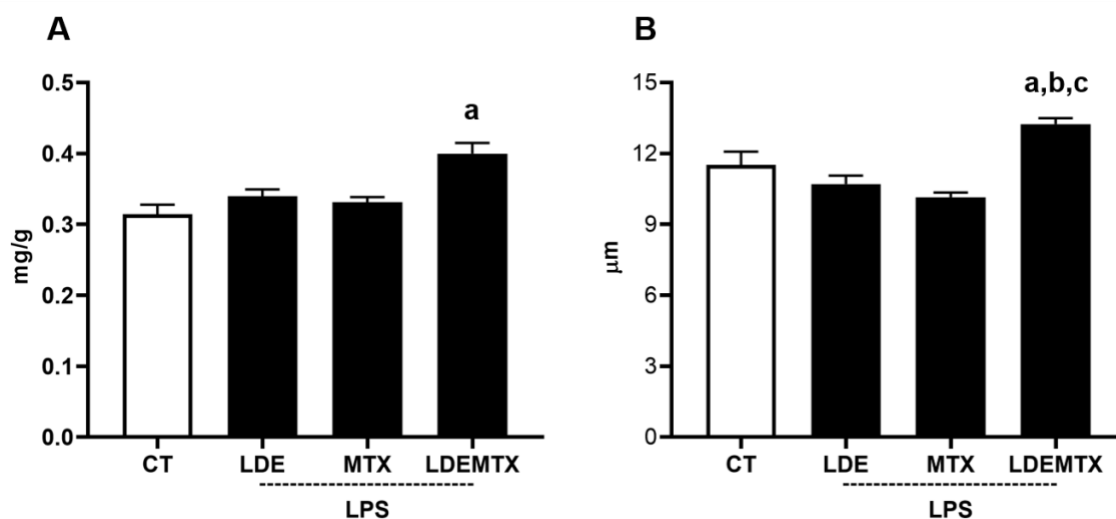


Figura 4. Peso relativo do coração (A) e diâmetro dos miócitos do ventrículo esquerdo (B) de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão. a $p < 0,05$ vs CT; b $p < 0,01$ vs LPS-LDE; c $p < 0,01$ LPS-MTX.

5.7 Marcadores pró-apoptóticos

A expressão proteica dos marcadores pró-apoptóticos caspase 9 e BAX/Bcl-2 foram avaliadas em animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 5).

Não houve diferença entre os grupos CT, LPS-LDE, LPS-MTX e LPS-LDEMTX quanto a expressão proteica dos marcadores pró-apoptóticos caspase 9 ($p=0,66$) e BAX/Bcl-2 ($p=0,32$).

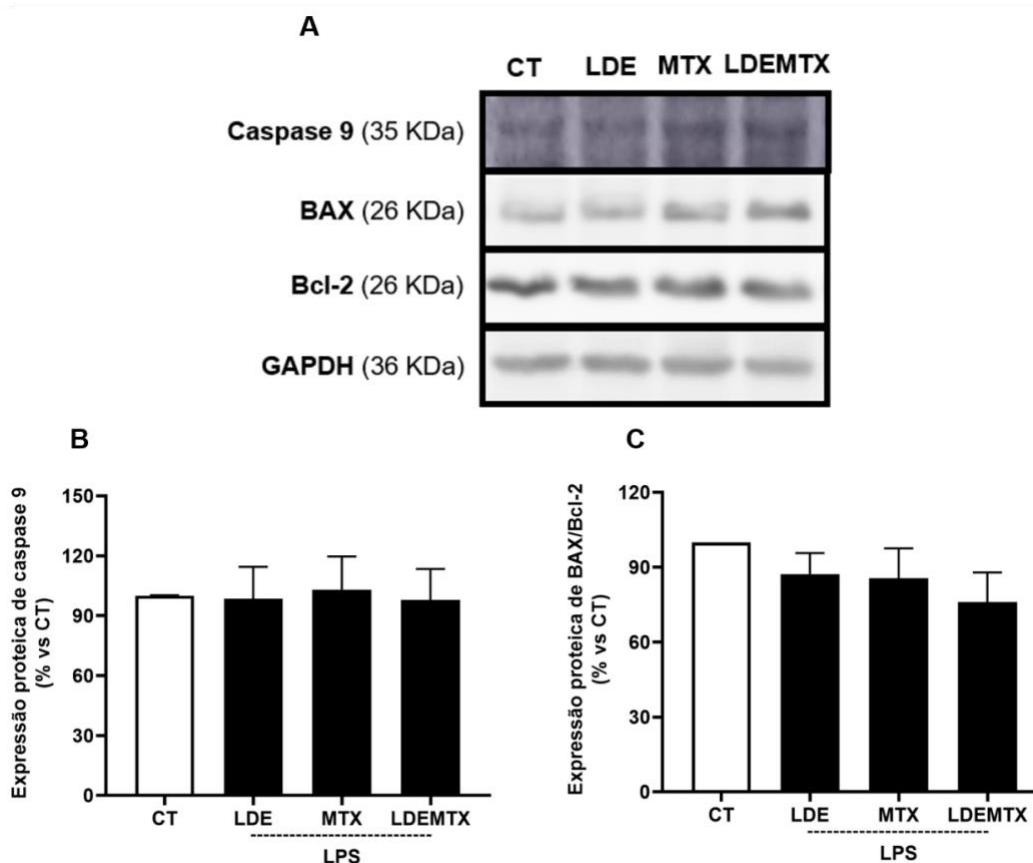


Figura 5. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de caspase 9 (B) e de BAX/Bcl-2 (C) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores da expressão proteica foram normalizados pela expressão proteica do GAPDH. Os

resultados foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão (n=5-7 por grupo).

5.8 Processo inflamatório

A expressão gênica e proteica dos marcadores pró-inflamatórios CD3, CD68, MCP-1, TNF- α , NFkB, IL-1 β e IL-6 e do marcador anti-inflamatório IL-10 foram avaliadas em animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 6).

Não houve diferença na expressão proteica dos marcadores CD3, CD68, MCP-1, TNF- α e NFkB entre os grupos CT e LPS-LDE. Entretanto, os animais endotoxêmicos tratados com LDEMTX obtiveram um aumento na expressão proteica de CD68, em comparação aos grupos CT ($p < 0,01$) e LPS-MTX ($p < 0,05$).

Não houve diferença na expressão gênica das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e da anti-inflamatória IL-10 entre os grupos CT e LPS-LDE. Entretanto, o tratamento com MTX e com LDEMTX aumentou a expressão gênica das interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 em comparação à CT.

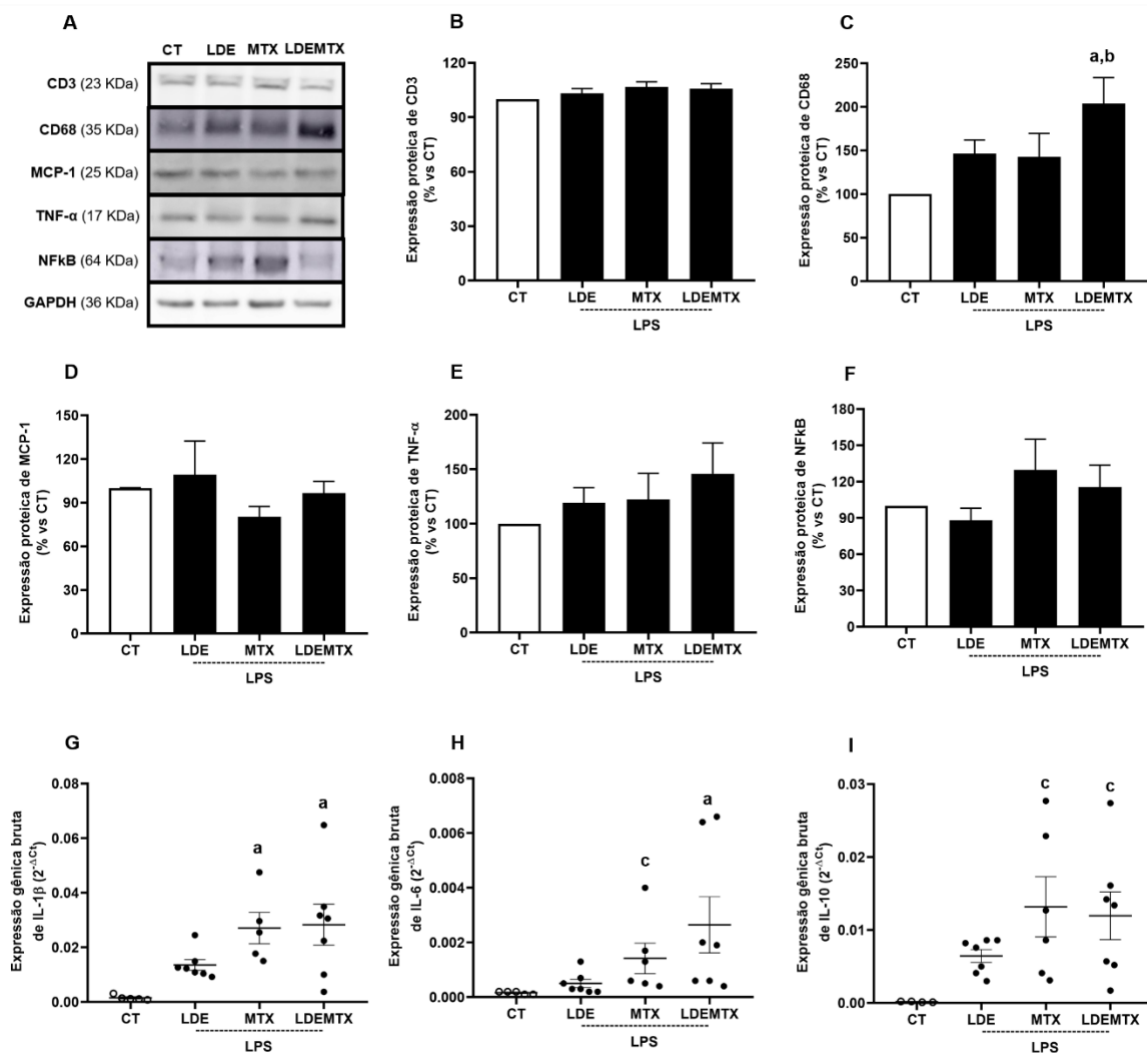


Figura 6. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de CD3 (B), CD68 (C), MCP-1 (D), TNF- α (E) e NFkB (F) e de expressão gênica por qRT-PCR de IL-1 β (G), IL-6 (H) e IL-10 (I) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores foram normalizados pela expressão do GAPDH. Os resultados proteicos foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT e os resultados gênicos foram expressos pelos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão (n=5-7 por grupo). a $p < 0,01$ vs CT; b $p < 0,05$ vs LPS-MTX; c $p < 0,05$ CT.

5.9 Perfil oxidativo

O perfil oxidativo foi avaliado pela expressão gênica dos marcadores eNOS e iNOS nos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 7).

Não houve diferença na expressão gênica do eNOS e iNOS entre os grupos CT e LPS-LDE. O tratamento com MTX e com LDEMTX aumentou a expressão gênica do eNOS ($p < 0,05$; $p < 0,05$) em comparação ao grupo LPS-LDE. Apenas o tratamento com MTX aumentou a expressão gênica do iNOS ($p < 0,01$) em comparação ao grupo CT.

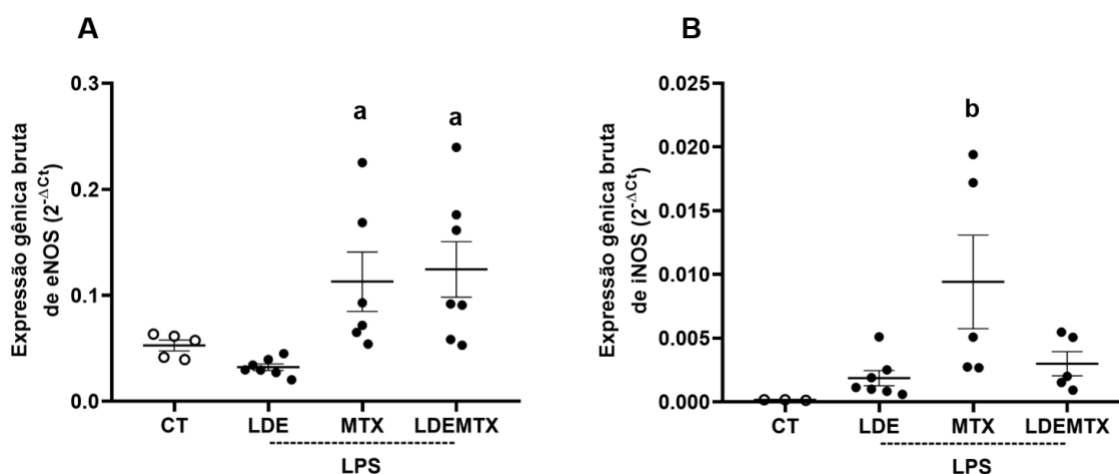


Figura 7. Gráficos de expressão gênica por qRT-PCR de eNOS (A) e iNOS (B) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores foram normalizados pela expressão do GAPDH. Os resultados gênicos foram expressos pelos valores de $2^{-\Delta Ct}$. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão ($n = 5-7$ por grupo). a $p < 0,05$ vs LPS-LDE; b $p < 0,01$ vs CT.

5.10 Metaloproteinases

A expressão proteica das MMP-2 e MMP-9 foram avaliadas nos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 8). Não houve diferença entre os grupos CT, LPS-LDE, LPS-MTX e LPS-LDEMTX quanto a expressão proteica das MMP-2 ($p=0,69$) e MMP-9 ($p=0,92$).

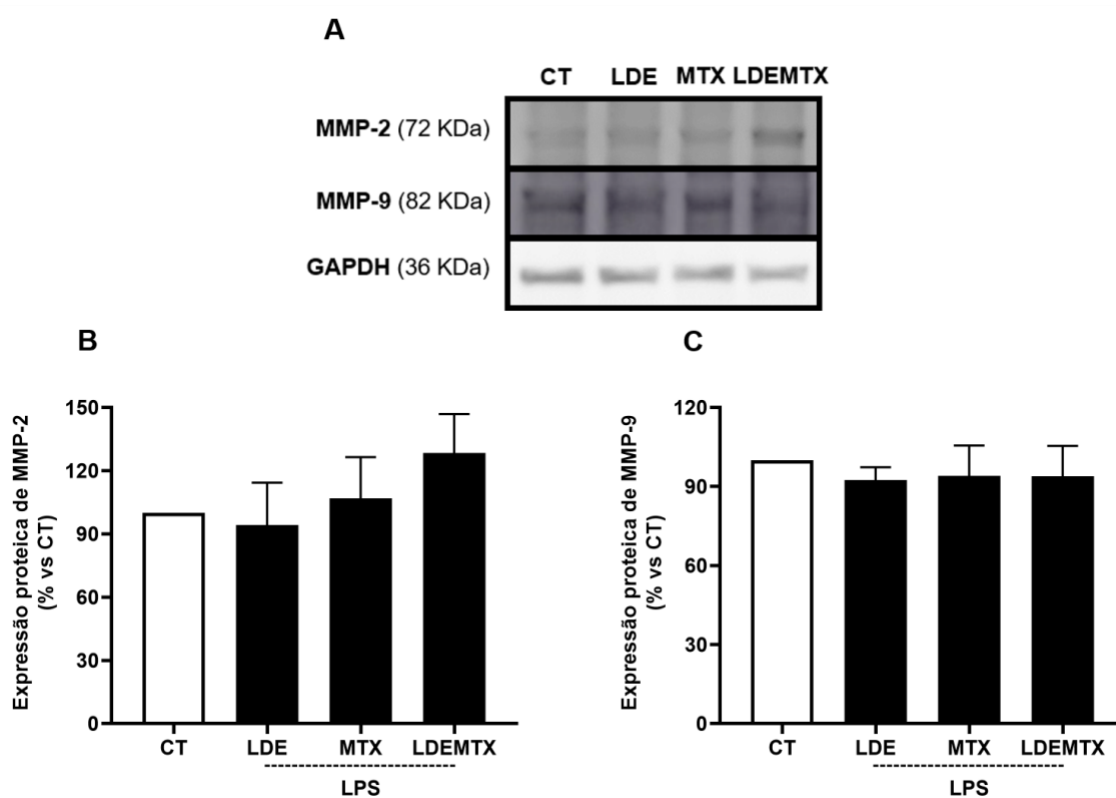


Figura 8. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de MMP-2 (B) e de MMP-9 (C) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores da expressão proteica foram normalizados pela expressão proteica do GAPDH. Os resultados foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão ($n=5-7$ por grupo).

5.11 Troponina I

A expressão proteica da troponina I foi avaliada nos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 9). Não houve diferença entre os grupos CT, LPS-LDE, LPS-MTX e LPS-LDEMTX quanto a expressão proteica da troponina I ($p=0,67$).

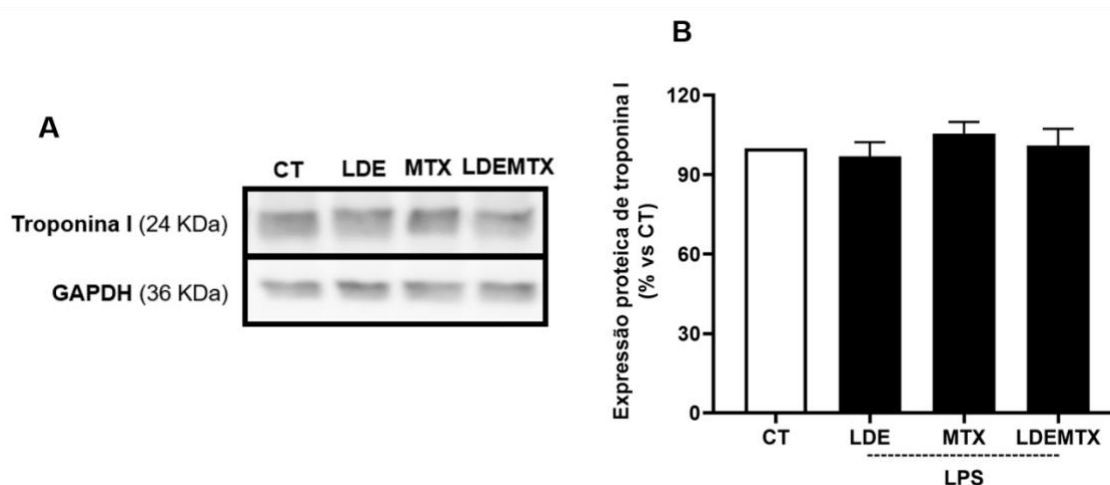


Figura 9. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de troponina I (B) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores da expressão proteica foram normalizados pela expressão proteica do GAPDH. Os resultados foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão ($n=5-7$ por grupo).

5.12 Fibrose miocárdica

A fibrose miocárdica foi avaliada pela expressão proteica do fator pró-fibrótico TGF- β e dos colágenos tipo 1 e tipo 3 e pela análise morfométrica da FVC nos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 10). Não houve diferença entre os grupos CT, LPS-LDE, LPS-MTX e LPS-LDEMTX quanto a expressão proteica do TGF- β ($p=0,07$), do colágeno tipo 1 ($p<0,34$) e do colágeno tipo 3 ($p<0,64$).

A Figura 10-E mostra imagens representativas de cortes histológicos corados por Tricrômio de Masson, sendo que a coloração azul representa a fibrose miocárdica. Não houve diferença na porcentagem de fibrose subendocárdica do VE nos animais CT e LPS-LDE e nos animais endotoxêmicos tratados com MTX e com LDEMTX.

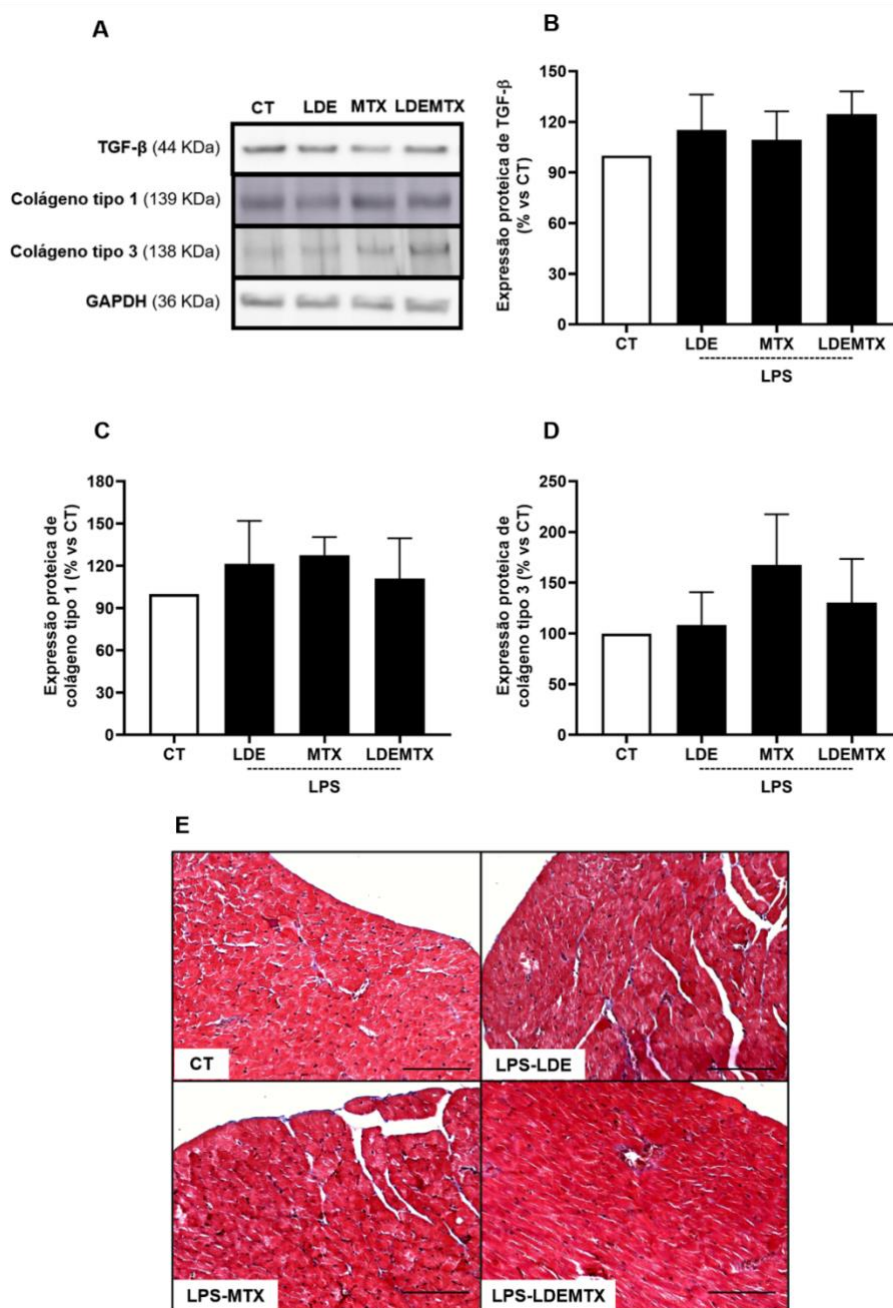


Figura 10. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de TGF-β (B), colágeno tipo 1 (C) e colágeno tipo 3 (D) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores foram normalizados pela expressão proteica do GAPDH e os resultados foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT. Imagens representativas (E) de cortes histológicos corados por Tricrômio de Masson, sob aumento de 200x, sendo que a coloração azul representa a fibrose miocárdica. A

barra de escala corresponde a 200µm. Os dados estão expressos pela média ± erro padrão (n=5-7 por grupo).

5.13 Angiogênese

A expressão proteica da angiogênese foi avaliada pelos fatores pró-angiogênicos VEGF e angiopoietina 1/2 e pelo fator anti-angiogênico angiostatina nos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 11).

Não houve diferença entre os grupos CT e LPS-LDE quanto a expressão proteica do VEGF, angiopoietina 1/2 e angiostatina. Entretanto, animais endotoxêmicos tratados com LDEMTX aumentou a expressão proteica do VEGF em comparação aos grupos CT ($p<0,01$), LPS-LDE ($p<0,01$) e LPS-MTX ($p<0,001$) e da angiopoietina 1/2 em comparação ao LPS-MTX ($p<0,01$).

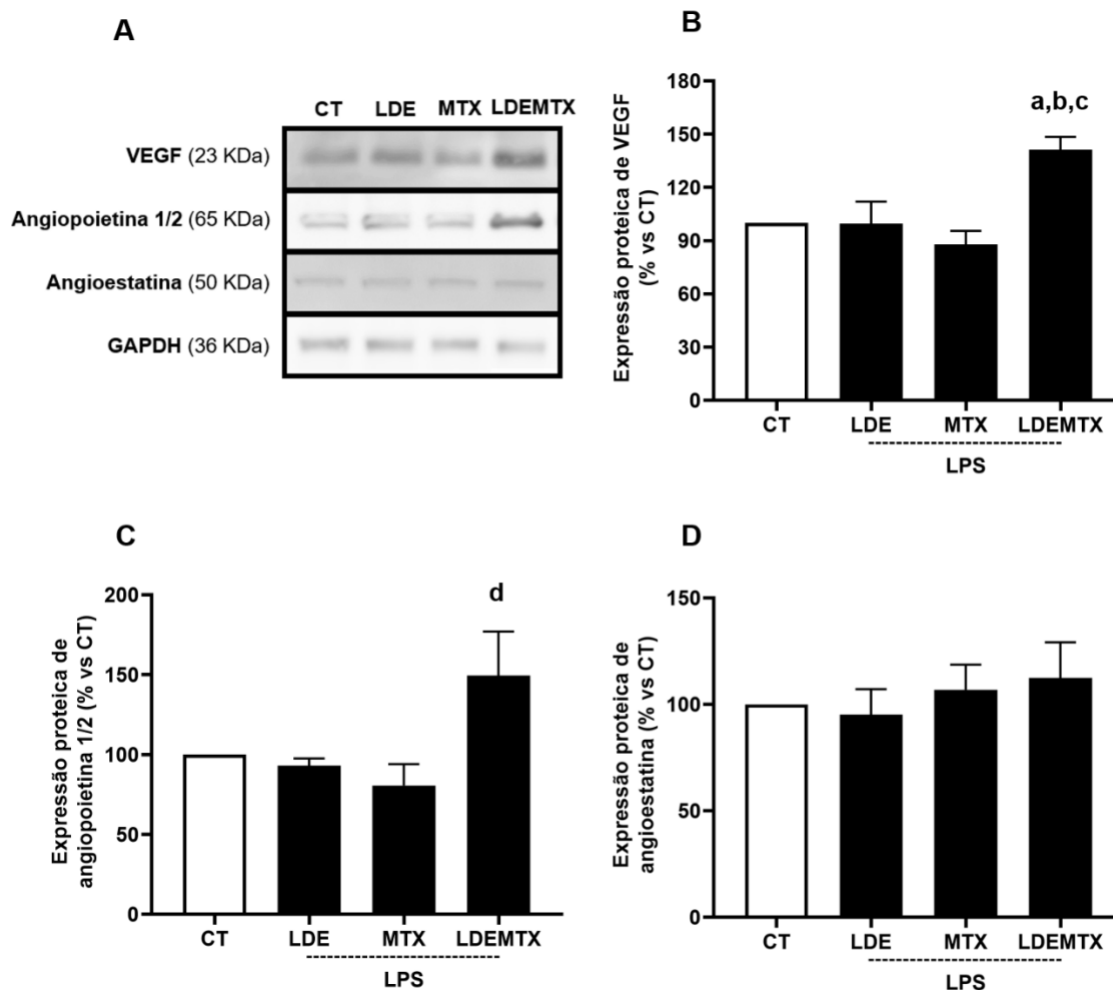


Figura 11. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de VEGF (B), angiopoietina 1/2 (C) e angiostatina (D) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTEX. Os valores da expressão proteica foram normalizados pela expressão proteica do GAPDH. Os resultados foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão (n=5-7 por grupo). a $p < 0,05$ vs CT; b $p < 0,01$ vs LPS-LDE; c $p < 0,001$ LPS-MTX; d $p < 0,01$ vs LPS-MTX.

5.14 Hipóxia celular

A expressão proteica da hipóxia celular foi avaliada pelo fator HIF-1 α nos animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 12).

Comparado ao grupo CT, houve maior expressão proteica do HIF-1 α no grupo LPS-LDE ($p < 0,01$). O tratamento com LDEMTX em ratos endotoxêmicos diminuiu a expressão proteica do HIF-1 α em comparação ao grupo LPS-LDE ($p < 0,05$).

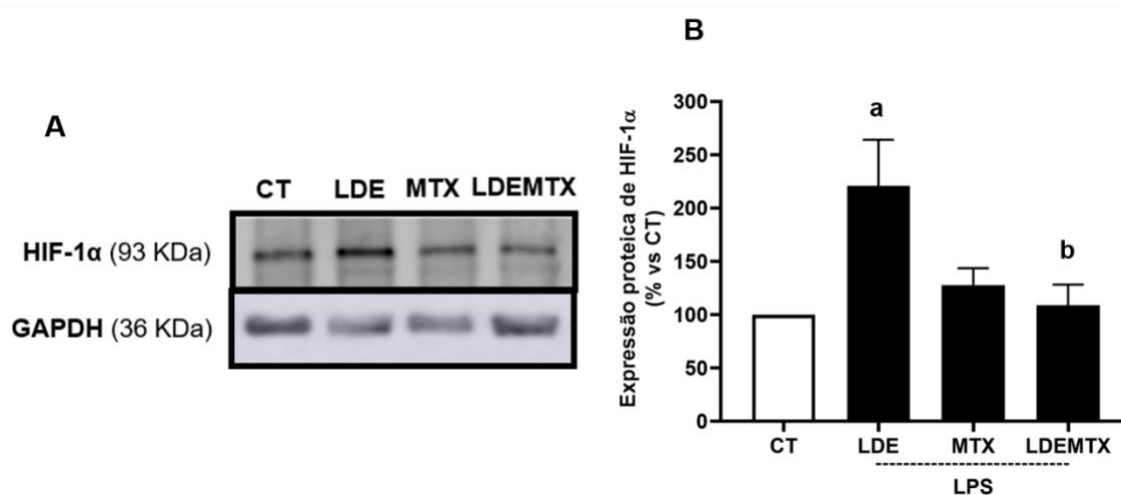


Figura 12. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de HIF-1 α (B) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores da expressão proteica foram normalizados pela expressão proteica do GAPDH. Os resultados foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão ($n=5-7$ por grupo). a $p < 0,01$ vs CT; b $p < 0,05$ vs LPS-LDE.

5.15 Mecanismo de sinalização da adenosina

As ações farmacológicas do MTX estão diretamente associadas ao aumento da biodisponibilidade da adenosina intracelular. Uma forma indireta de quantificarmos a adenosina é através da expressão de seus receptores, A1, A2a, A2b e A3, e pelas enzimas ADK e ADA (Figura 3). A expressão proteica dos receptores de adenosina A1, A2a, A2b e A3 e das enzimas ADK e ADA foram avaliadas em animais CT e LPS, após tratamento com MTX e LDEMTX (Figura 13).

Não houve diferença na expressão proteica dos receptores de adenosina A1, A2a, A2b e A3 e das enzimas ADK e ADA entre os grupos CT e LPS-LDE. Entretanto, apenas o grupo LPS-LDEMTX aumentou a expressão proteica dos receptores A1 ($p < 0,05$) e A2b ($p < 0,05$) em comparação ao grupo CT e do receptor A3 em comparação ao grupo CT ($p < 0,01$) e LPS-LDE ($p < 0,05$). O tratamento com MTX e com LDEMTX não alteram a expressão do receptor A2a ($p = 0,36$) de adenosina e nem as enzimas ADK ($p = 0,50$) e ADA ($p = 0,15$).

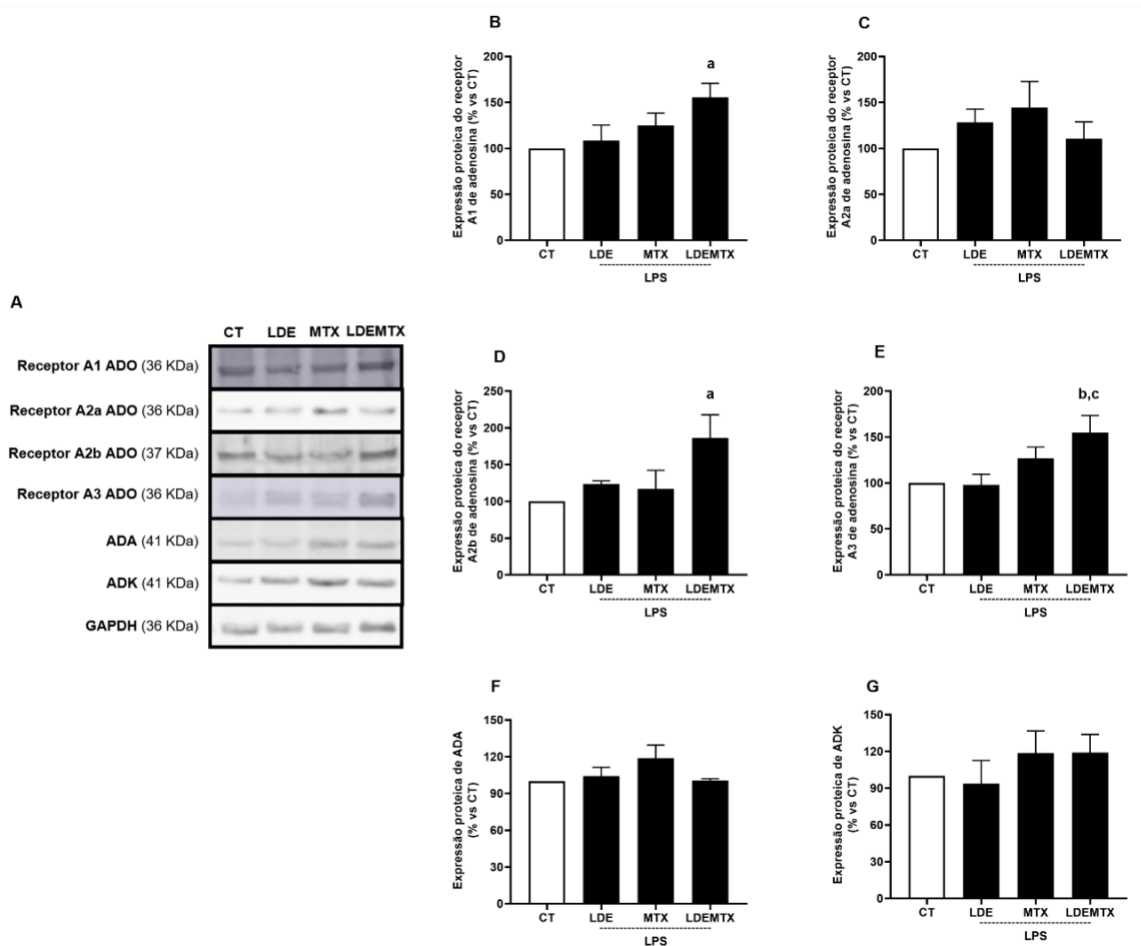


Figura 13. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot dos receptores A1 (B), A2a (C), A2b (D) e A3 (E) de adenosina e das enzimas ADA (F) e ADK (G) no ventrículo esquerdo de ratos controle (CT) e endotoxêmicos (LPS) após tratamento com MTX ou LDEMTX. Os valores da expressão proteica foram normalizados pela expressão proteica do GAPDH. Os resultados foram expressos pela porcentagem da média do grupo CT. Os dados estão expressos pela média \pm erro padrão (n=5-7 por grupo). a $p < 0,05$ vs CT; b $p < 0,01$ vs CT, c $p < 0,05$ vs LPS-LDE.

5.16 Correlação entre marcadores pró-angiogênicos e respostas celulares

Para determinarmos se os mecanismos angiogênicos estão envolvidos nas respostas celulares dos animais endotoxêmicos tratados ou não com MTX ou LDEMTX, foi realizada a correlação de Pearson entre os marcadores VEGF e angiopoietina 1/2 com a expressão de CD68, IL-1 β , IL-6, IL-10, eNOS, iNOS, HIF-1 α , peso relativo do coração, hipertrofia dos miócitos, espessura do septo interventricular e da parede posterior e da massa do VE (Tabela 9).

A expressão proteica dos marcadores pró-angiogênicos VEGF e angiopoietina 1/2 correlacionaram positivamente com a expressão proteica do CD68, com o peso relativo do coração, com a hipertrofia dos miócitos, com a espessura do septo interventricular e da parede posterior e com a massa do VE. Além disso, o VEGF e a angiopoietina 1/2 correlacionaram negativamente com a expressão proteica do HIF-1 α (Tabela 9 e Figura 13).

Tabela 9. Correlação entre a expressão dos marcadores pró-angiogênicos e as respostas celulares em ratos endotoxêmicos tratados com não com MTX e LDEMTX.

	VEGF		Angiopietina 1/2	
	r ²	p	r ²	p
CD68 (%)	0,477	0,009	0,348	0,046
IL-1 β (%)	0,001	0,926	0,048	0,472
IL-6 (%)	0,018	0,562	0,002	0,890
IL-10 (%)	0,002	0,826	0,003	0,552
eNOS (%)	0,018	0,537	0,075	0,364
iNOS (%)	0,017	0,547	0,137	0,214
HIF-1 α (%)	-0,350	0,026	-0,367	0,048
PC (mg/g)	0,179	0,049	0,422	0,031
Miócito (μ m)	0,545	<0,0001	0,382	0,032
SIV (mm/g)	0,192	0,047	0,324	0,047
PP (mm/g)	0,337	0,029	0,376	0,034
mVE (mg/g)	0,277	0,012	0,310	0,044

VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; CD68, macrófagos; IL, interleucina, eNOS, óxido nítrico-sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico-sintase induzida; HIF-1 α , fator induzível por hipóxia tipo 1 alfa; PC, peso relativo do coração; Miócito, hipertrofia dos miócitos; SIV, espessura do septo interventricular; PP, espessura da parede posterior; mVE, massa do ventrículo esquerdo.

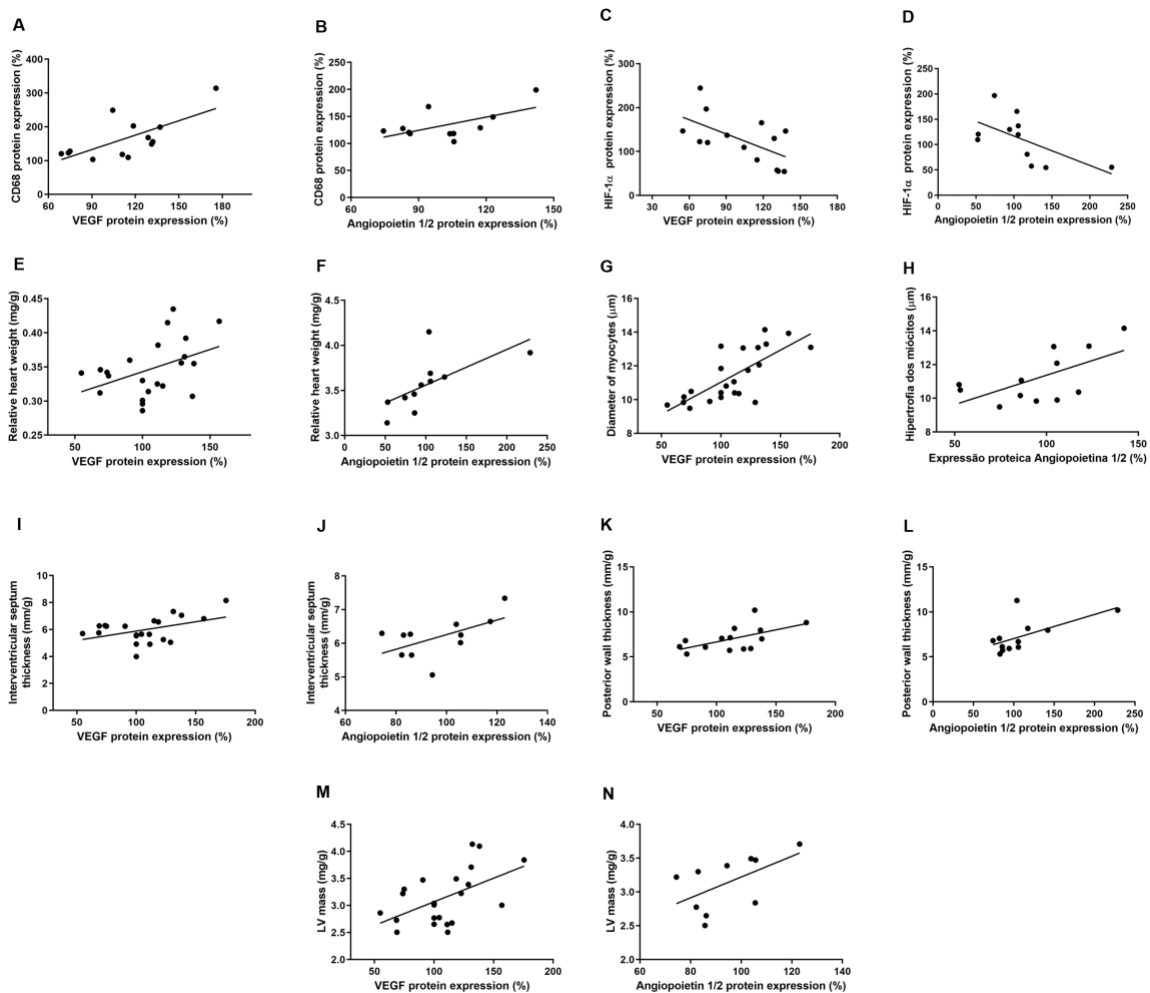


Figura 14. Gráficos de correlação entre a expressão proteica dos marcadores pró-angiogênicos VEGF (A, C, E, G, I, K e M) e angiopoietina 1/2 (B, D, F, H, J, L e N) com a resposta celular obtida pelo CD68, peso relativo do coração, diâmetro dos miócitos, espessura do septo interventricular, espessura da parede posterior, massa do ventrículo esquerdo e HIF-1 α .

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o tratamento com a LDEMTX foi efetivo em prevenir o desenvolvimento da disfunção diastólica em ratos induzidos à endotoxemia por injeção de LPS. O tratamento com LDEMTX aumentou o processo angiogênico, reduziu hipóxia celular, estimulou hipertrofia compensatória do VE e evitou qualquer tipo de desenvolvimento de toxicidade. A ausência de disfunção diastólica também foi observada nos animais tratados com MTX comercial, mas o MTX falhou em estimular a angiogênese, reduzir hipóxia ou desenvolver hipertrofia. Além disso, o tratamento com MTX resultou em toxicidade hepática e aumento da expressão de iNOS, que contribuiu para aumento dos níveis de estresse oxidativo no VE.

O LPS é comumente utilizado em modelos de indução de endotoxemia e sepse em ratos e camundongos e, apesar de não reproduzir em totalidade o cenário clínico da doença, ainda é um método menos invasivo para estudar os efeitos sistêmicos da infecção bacteriana (Lewis et al, 2016; Korneev et al, 2014). O modelo experimental utilizado em nosso estudo foi adaptado do modelo clássico de endotoxemia por LPS, no qual utiliza-se uma dose única de 10-20mg/kg i.p. e observa-se o comprometimento sistólico e diastólico após 90 minutos (Soriano et al, 2014). Em estudo piloto, tentamos reproduzir o modelo de Soriano, mas não obtivemos disfunção cardíaca pela análise ecocardiográfica em 24h após injeção de LPS. Assim, fez-se necessário adaptar o modelo inicial para o utilizado no presente estudo e, com duas injeções de LPS com intervalo de 24h entre as doses, obtivemos disfunção diastólica através da redução de onda E/A, observada na ecocardiografia. Em ratos induzidos à endotoxemia por LPS, o surgimento de disfunção está descrito tanto para sistólica quanto para diastólica (Tao et al, 2004; Yang et al, 2002). Em nosso grupo

LPS-LDE, o fato de não termos observado o desenvolvimento de uma disfunção sistólica pode estar associado ao tempo de seguimento de nosso estudo, à dose de LPS utilizada para induzir endotoxemia ou a especificidades da linhagem de animais utilizada.

Sabemos que na sepse está estabelecido que a hipoperfusão e a diminuição do fluxo coronariano estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de fibrose do tecido subendocárdico, o que leva à disfunção cardíaca. Além disso, em modelos de lesão cardíaca, a diminuição do processo angiogênico está relacionada ao aumento da hipóxia celular (Guido et al, 2012; Lorigados et al, 2015; Maranhão et al, 2017). De fato, ratos LPS-LDE apresentaram aumento significativo da hipóxia celular no VE, observados através da maior expressão de HIF-1 α . Nos animais LPS-LDEMTX, mostramos que o tratamento foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hipóxia celular, com níveis de HIF-1 α menores, e estimular a angiogênese, visto o aumento na expressão de VEGF e angiopoietina 1/2.

Na falência cardíaca, há inadequação do processo angiogênico, o que contribui para o remodelamento patológico, promovendo a transição de uma hipertrofia compensatória para disfuncional do VE (Shiojima et al, 2005; Frey et al, 2003). Em modelos experimentais de IAM, o estímulo de angiogênese pode prevenir o desenvolvimento de hipertrofia em resposta a isquemia e perda de tecido muscular (Maranhão et al, 2017). Não houve o desenvolvimento de hipertrofia do VE nos animais LPS-LDE, mas o tratamento com LDEMTX foi capaz de estimular a hipertrofia através do aumento da expressão de VEGF e angiopoietina 1/2. Acreditamos que a hipertrofia do VE dos animais tratados com LDEMTX se trata de um mecanismo

compensatório, visto que os animais não desenvolveram disfunção diastólica do VE. Também relacionado à maior expressão de VEGF nestes animais, vimos que houve um aumento na expressão gênica de eNOS, que é ativado *downstream* à via de regulação de VEGF, e resulta no aumento de NO endotelial, responsável pelo aumento da taxa de sobrevivência de células endoteliais (Feliens et al, 2005; Gentile et al, 2013). Em resumo, observamos um estímulo angiogênico, que resultou em aumento da expressão de eNOS e na prevenção do aumento de HIF-1 α nos animais tratados com LDEMTX. Por outro lado, apesar de os animais tratados com MTX em sua versão comercial terem apresentado aumento de eNOS, também observamos o aumento de iNOS, estimulado por TNF- α na sepse.

Considerando os possíveis mecanismos de ação do MTX relacionados à angiogênese e hipóxia, e baseados em resultados de estudos anteriores de nosso laboratório (Maranhão 2017; Guido 2022), estudamos os efeitos da modulação de receptores de adenosina e da consequente alteração na biodisponibilidade da adenosina no VE de nossos animais. A adenosina tem efeitos diretos na isquemia celular, contribuindo para a reperfusão tecidual por ser um potente vasodilatador, com efeitos pró-angiogênicos (Adair et al 2005, Gessi et al 2010). Em modelo experimental de IAM, mostramos que a administração de LDEMTX foi responsável pela melhora da função e por menor tamanho de infarto. Esses efeitos se deram pelo aumento de receptores A1, A2a, A2b e A3, responsáveis pelo aumento de adenosina intracelular, diretamente relacionada ao aumento de VEGF e diminuição de hipóxia celular (Maranhão et al, 2017). Em animais endotoxêmicos, está descrito efeitos anti-inflamatórios da adenosina, indicando que este nucleosídeo é capaz de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL1 β , IL-6 e interferon-gama

(IFN- γ) através do aumento de IL-10. Alguns estudos relacionam agonistas de receptores A2 e A3 com este aumento dos níveis de IL-10. Além disso, outros estudos mostraram que a adenosina é capaz de estimular mudanças no perfil macrofágico de pró-inflamatório para anti-inflamatório e pró-angiogênico (Ferrante et al, 2013; Pinhal-Einfield et al, 2003; Ramanathan et al, 2009).

Em nosso estudo, o aumento da expressão dos receptores de adenosina, com exceção do receptor A2a, foi observado no grupo LPS-LDEMTX, mas não em LPS-MTX. O fato de o MTX associado à LDE ser captado por células-alvo em quantidades muito maiores (Moura et al, 2011) elucidada o aumento dos receptores, não observada no tratamento com MTX comercial. O aumento da biodisponibilidade intracelular de adenosina resultante da modulação dos receptores por LDEMTX pode estimular diversos mecanismos. Uma lista extensa de estudos mostrou que tanto em situações pré quanto pós-isquêmicas, todos os receptores estão envolvidos na melhora da disfunção cardíaca e de apoptose no coração (Cohen & Downey, 2008, 2011; Headrick & Lasley, 2009; Morrison et al, 2000).

O receptor A1 está envolvido no estímulo pró-angiogênico e é um potente alvo terapêutico para a prevenção da hipertrofia descompensatória em resposta à sobrecarga cardíaca (Puhl et al, 2016; Liao et al, 2003). Além disso, em estudo pioneiro, o receptor A1 foi descrito como mediador da liberação do fator pró-angiogênico VEGF (Clark et al, 2007). Corroborando com estudos que descrevem o receptor A1 como responsável pela prevenção da transição de hipertrofia compensatória para patológica em modelo de sobrecarga de pressão (Puhl et al, 2015), o aumento da expressão proteica de A1 pós-tratamento com LDEMTX em

nossos animais pode ter contribuído para o aumento dos mecanismos pró-angiogênicos (representados por VEGF e angiopoietina 1/2) e consequente desenvolvimento de hipertrofia compensatória, que possivelmente preveniu a disfunção cardíaca nesses animais. A correlação entre o aumento dos fatores pró-angiogênicos VEGF e angiopoietina 1/2 e o aumento da hipertrofia do VE, confirma a associação desses mecanismos e, portanto, o estímulo da angiogênese pode ser considerado um alvo terapêutico para o tratamento da endotoxemia e da sepse.

Quanto ao receptor A2a, há estudos que relacionam sua expressão aumentada com a prevenção da secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumento do dano tecidual resultante (Lukashev et al, 2004; Ohta & Sitkovsky, 2001). Camundongos nocaute para A2ar tiveram mortalidade reduzida, enquanto em outro estudo sugeriu-se a melhora da taxa de sobrevivência somente ao administrar antagonistas de A2ar na fase tardia da doença. Estes dados sugerem que a ativação de A2ar na sepse é dependente do tempo de desenvolvimento da doença e, por este motivo, possivelmente não observamos diferenças na expressão deste receptor em nossos animais.

A2br, outro receptor envolvido na modulação vasodilatadora e anti-inflamatória da adenosina, também está envolvido no aumento da capacidade fagocitária de macrófagos e no aumento da secreção de eNOS em células endoteliais da microvasculatura, através da expressão de VEGF (Németh et al, 2005). Nossos dados corroboram com a literatura, visto o aumento de expressão de A2b nos animais endotoxêmicos tratados com LDEMTX, os quais apresentam modulação de VEGF, angiopoietina 1/2, IL-10 e eNOS.

Por fim, o receptor A3 tem papel cardioprotetor na sepse, envolvido na reperfusão isquêmica, além de aumentar a expressão de VEGF (Cross et al, 2002; Maddock et al, 2003). Em modelo de sepse por ligadura cecal, foi mostrado que o nocaute do receptor A3 resultou no aumento da mortalidade dos animais (Lee et al, 2006). Em nosso modelo, o aumento de receptor A3, observado nos animais tratados com LDEMTX, pode estar relacionado ao aumento de VEGF e angiopoietina 1/2, o que contribuiu para a diminuição da hipóxia celular.

O aumento dos níveis de adenosina intracelular via receptor A2b ativa resposta anti-inflamatória através da secreção de IL-10. Esta interleucina é um autorregulador da resposta imune, responsável pela indução da polarização macrófaga de fenótipo M1, pro-inflamatório, para M2 que, além de aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, aumenta a produção de marcadores angiogênicos, como a VEGF (Ferrante et al, 2013). Apesar de não haver estudos que correlacionem a expressão de IL-10 com a polarização de macrófagos na sepse, em modelo de IAM foi observado que camundongos tratados com infusão de IL-10 apresentaram aumento de expressão de genes associados ao perfil M2 de macrófagos. Houve melhora no microambiente do VE por redução de resposta pro-inflamatória e ativação de mecanismos reparativos (Jung et al, 2017). Ainda, o tratamento com LDEMTX em coelhos com aterosclerose aumentou a expressão de IL-10, assim como em modelo de enxerto coronário e em transplante cardíaco (Bulgarelli et al, 2013, Barbieri et al, 2017 e Fiorelli et al, 2017). De acordo com nossos resultados, sugere-se que ratos endotoxêmicos tratados com LDEMTX tiveram aumento de adenosina intracelular, provavelmente via aumento da expressão de receptor A2b. Esse aumento contribuiu para a ativação da expressão gênica de IL-10, a qual é associada à polarização de

macrófagos para o perfil M2, diretamente envolvidos na atividade pro-angiogênica. Esta hipótese foi confirmada pela correlação observada entre o aumento da expressão do marcador de presença de macrófagos, CD68, com o aumento de VEGF e angiopoietina 1/2. Apesar de nosso modelo também estar representando a hipótese de que a adenosina seja responsável pela inibição de iNOS e concomitante estímulo de eNOS em diferentes regiões (Conlon et al, 2005), ainda precisamos de mais estudos para compreender os mecanismos envolvidos no VE destes animais.

A indução da endotoxemia nos animais não aumentou estatisticamente a expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e IL-6 em comparação aos grupos LPS-LDE e CT, mas ambos os tratamentos com LDEMTX e MTX aumentaram a expressão das duas citocinas. Esse efeito pode estar relacionado ao papel controverso do receptor A3 de adenosina em sua contribuição para a resposta inflamatória, sendo capaz de diminuir apoptose de células inflamatórias e, por outro lado, capaz de diminuir TNF- α , IFN- γ e IL-12, pela via de sinalização celular da via de quinases ERK 1/2 (Salvatore et al, 2000). Em alguns de nossos estudos anteriores, a LDEMTX reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias em modelos experimentais (Barbieri et al, 2017; Bulgarelli et al, 2013; Pepineli et al, 2021). No entanto, os resultados aqui apresentados não foram suficientes para descrever uma relação entre a modulação de processo inflamatório e a melhora da função cardíaca nos animais LPS-LDEMTX, sendo necessário realizar estudos adicionais para esta compreensão, como a análise de expressão de microRNAs envolvidos na regulação da expressão gênica e inibição da tradução proteica destas interleucinas.

Com relação ao perfil hematológico observado na sepse e na endotoxemia, modelos experimentais e estudos clínicos relatam alterações hematológicas, tais como leucocitose, neutrocitose e monocitose (Aird, 2003; Goyette et al, 2004; Hasjim et al 2022). Nossos resultados mostraram que os animais LPS-LDE apresentaram monocitose e trombocitopenia em comparação ao grupo CT, mas a contagem de leucócitos e neutrófilos não foi alterada pela endotoxemia. É importante destacar que essas alterações hematológicas podem ser transientes e suas alterações podem ser observadas em diferentes fases da infecção aguda (Aird 2003; Manzoni, 2015). Por outro lado, o fato de não ocorrerem alterações hematológicas relevantes após o tratamento com LDEMTX ou MTX indica que os tratamentos preveniram mielotoxicidades.

As alterações metabólicas e bioquímicas são frequentes em animais sépticos. Com relação ao perfil lipídico destes animais, geralmente são observados aumento nos níveis de TG e redução dos níveis de colesterol total, HDL-c e não-HDL-c (Levels et al, 2003). Estas variações são resultado da atuação de mediadores pró-inflamatórios, os quais induzem lipólise e síntese de ácidos graxos (Fraunberger et al, 1999; Murch et al, 2007). As lipoproteínas têm um papel importante na regulação do sistema imune e da resposta inflamatória, agindo como marcadores de prognóstico e atuando de maneira relevante na fisiopatologia da doença (Thompson et al, 2006). Os tratamentos com LDEMTX e MTX normalizaram os níveis de colesterol total e HDL-c, sugerindo que ambos apresentam ação metabólica benéfica. No entanto, os níveis de TG permaneceram em baixas concentrações, podendo estar relacionado à diminuição do consumo de ração por estes animais, o que pode ter levado à redução do consumo de gorduras ou à degradação intensiva de TG pela lipoproteína lipase.

Considerando o perfil bioquímico, os modelos de endotoxemia experimental e na sepse clínica comumente apresentam lesões hepáticas, documentadas pelo aumento de ALT, AST e GGT (Gray et al, 2022; Aygun et al, 2018); e renais, pelo aumento de uréia e creatinina (Mehta et al, 2002; Doi et al, 2009). A indução da endotoxemia em nossos animais não alterou os níveis de enzimas hepáticas, como observado no grupo LPS-LDE em relação ao grupo CT. No entanto, houve alteração renal no grupo LPS-LDE, apesar de não haver alteração nos níveis de creatinina. Vale ressaltar que o tratamento com MTX comercial ocasionou toxicidade hepática, indicada pelo aumento dos níveis de AST e GGT. Esse efeito não foi observado no tratamento com LDEMTX, o que pode ser resultado da capacidade da LDE em reduzir a toxicidade do MTX. Outro indicador importante da gravidade da sepse é o lactato, um marcador de estresse metabólico, cujos altos níveis estão diretamente relacionados ao aumento na mortalidade (Van Wyngene et al, 2018) e é considerado um critério para a definição de choque séptico (Singer et al, 2016). Nossos animais injetados com LPS, no entanto, não apresentaram nenhuma alteração em seus níveis de lactato, que também não foram modulados pelos tratamentos com LDEMTX e MTX. Possivelmente, as alterações dos níveis de lactato foram observadas em momentos mais iniciais do nosso modelo adaptado (Liu et al, 2017), fazendo necessárias análises séricas em outros seguimentos para compreensão dos efeitos ao longo da indução da endotoxemia.

O tratamento com MTX em sua versão comercial resultou em um aumento do mRNA de IL-1 β , IL-6, IL-10 e de eNOS e iNOS, além de preservar a função diastólica do VE dos animais endotoxêmicos. Inicialmente, acreditávamos que esta função preservada no tratamento com MTX seria resultado da modulação de adenosina

intracelular, como observado em LDEMTX. No entanto, não obtivemos nenhum aumento de receptores ou enzimas envolvidas na via de sinalização da adenosina. Trabalhos experimentais de nosso laboratório, em IAM (Maranhão et al, 2017), aneurisma de aorta (Guido et al, 2022), infecção aguda de pulmão, retalho cutâneo e miocardiopatia do VE (dados não publicados), já apresentaram dados substanciais que mostram que o MTX utilizado em baixas doses não foi capaz de modular a expressão de adenosina nessas patologias. É possível que outro mecanismo esteja contribuindo para o aumento das ILs e NOS, os quais modulariam respostas celulares subsequentes que estariam associadas à melhora de função do VE. Através somente do levantamento bibliográfico, não foi possível identificar qual seria este outro mecanismo que justificaria os resultados obtidos e, portanto, mais estudos se fazem necessários para elucidar este feito. Assim como para LDEMTX, também sugerimos estudos para a compreensão dos microRNAs envolvidos na regulação dos mecanismos de ação do fármaco e principalmente na compreensão do momento em que esses microRNAs alteram as expressões gênica e proteica.

Como sabemos, os modelos experimentais de endotoxemia induzida por LPS podem não refletir o cenário da clínica da sepse. Nos modelos atuais, observamos frequentemente uma abordagem mais aguda da infecção, quando citocinas são produzidas nos momentos iniciais do insulto e os sintomas subsequentes não são completamente estudados (Buras et al, 2005, Saito et al, 2003). Ainda, este modelo reflete os efeitos de uma infecção de origem única, enquanto a sepse pode se tratar de insultos de múltiplos agentes, além de resultar em infecções nosocomiais (Stortz et al, 2017). Como em nosso experimento piloto não pudemos observar o desenvolvimento de disfunção cardíaca com uma dose única de LPS em 24 horas,

adaptamos nosso modelo para a administração de 2 doses, com análise ecocardiográfica em 48h após a primeira dose. Nossas análises podem representar um cenário um pouco menos agudos de sintomas e mecanismos do que os relatados na literatura, impedindo que obtenhamos evidências do efeito completo da LDEMTX, como por exemplo da expressão de lactato, troponina I, MMPs, de marcadores apoptóticos e principalmente de fatores inflamatórios, de fases comparáveis à clínica da sepse.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que tanto o tratamento com LDEMTX quanto com MTX em sua versão comercial foram efetivos na prevenção do desenvolvimento da disfunção diastólica em ratos injetados com LPS, resultado que abre a possibilidade de um novo tratamento para a terapêutica da sepse. As vantagens da escolha do LDEMTX para futuros estudos pré-clínicos e clínicos é clara, visto que a toxicidade observada no tratamento com MTX não foi reproduzida em LDEMTX. Além disso, LDEMTX promoveu o desenvolvimento de hipertrofia compensatória, assim como estimulou angiogênese e diminuiu hipóxia celular, não observados em MTX.

8. REFERÊNCIAS

Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med.* 2001;29(3):503–10.

Adair TH. Growth regulation of the vascular system: An emerging role for adenosine. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(2 58-2):283–96.

Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen JS, Pinotti JA, et al. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol.* 2001;82(1):84–7.

Aird WC. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78(7):869-81. doi: 10.4065/78.7.869.

Almeida NRC, Pontes GF, Jacob FL, Deprá JVS, Porto JPP, Lima FR, et al. Análise de tendência de mortalidade por sepse no Brasil e por regiões de 2010 a 2019. *Rev Saude Publica.* 2022; 56:25. doi.org/10.11606/s1518-8787.2022056003789.

Aygun F, Kirkoc R, Aygun D, Cam H. Gamma Glutamyl Transferase and Uric Acid Levels Can Be Associated with the Prognosis of Patients in the Pediatric Intensive Care Unit. *Children* 2018; 30;5(11):147. doi: 10.3390/children5110147.

Baelani I, Jochberger S, Laimer T, Otieno D, Kabutu J, Wilson I, et al. Availability of critical care resources to treat patients with severe sepsis or septic shock in Africa: A self-reported, continent-wide survey of anaesthesia providers. *Crit Care.* 2011;15(1):1–12.

Barbieri LR, Lourenço-Filho DD, Tavares ER, Carvalho PO, Gutierrez PS, Maranhão RC, Stolf NAG. Influence of Drugs Carried in Lipid Nanoparticles in Coronary Disease of Rabbit Transplanted Heart. *Ann Thorac Surg.* 2017; 104(2):577-583. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.12.044.

Bezemer R, Bartels SA, Bakker J, Ince C. Clinical review: Clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill—where do we stand? *Crit Care* 2012; 16: 224.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-874.

Boyd JH, Russell JA, Fjell CD. The meta-genome of sepsis: Host genetics, pathogens, and the acute immune response. *J Innate Immun.* 2014;6(3):272–83.

Bulgarelli A. et al. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nano emulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013; 27(6):531-9.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(10):854–65.

Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):177–92.

Cheng AC, West TE, Limmathurotsakul D, Peacock SJ. Strategies to reduce mortality from bacterial sepsis in adults in developing countries. *PLoS* 2008; Med 5:e175

Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):517–28.

Clark AN, Youkey R, Liu X, et al. A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ Res.* 2007;101(11):1130-1138. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.150110

Cohen M V., Downey JM. Adenosine: Trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(3):203–15.

Cohen M V., Downey JM. Ischemic postconditioning: From receptor to end-effector. *Antioxidants Redox Signal.* 2011;14(5):821–31.

Collet, M., Huot, B., Barthélémy, R., Damoiseil, C., Payen, D., Mebazaa, A., & Chousterman, B. G. Influence of systemic hemodynamics on microcirculation during sepsis. *Journal of critical care.* 2019; 52, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2019.05.002>

Conde KAP, Silva E, Silva CO, Ferreira E, Freitas FGR, Castro I, et al. Differences in Sepsis Treatment and Outcomes between Public and Private Hospitals in Brazil: A Multicenter Observational Study. *PLoS One.* 2013;8(6).

Conlon BA, Ross JD, Law WR. Advances in understanding adenosine as a plurisystem modulator in sepsis and the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Front Biosci.* 2005;10(SUPPL. 2):2548–65.

Coz Yataco A, Jaehne AK, Rivers EP. Protocolized Early Sepsis Care Is Not Only Helpful for Patients: It Prevents Medical Errors. *Crit Care Med.* 2017 Mar;45(3):464-472.

Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2020;16(3):145–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-020-0373-9>

Cross HR, Murphy E, Black RG, Auchampach J, Steenbergen C. Overexpression of A(3) adenosine receptors decreases heart rate, preserves energetics, and protects ischemic hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283(4):H1562-8. doi: 10.1152/ajpheart.00335.2002.

Csoka B, Nemeth ZH, Duerr CU, Fritz JH, Pacher P, Hasko G. Adenosine receptors differentially regulate type 2 cytokine production by IL-33-activated bone marrow cells, ILC2s, and macrophages. *FASEB J.* 2018;32(2):829–37.

Doi K, Yuen PS, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Schnermann J, Star RA. Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(6):1217-21. doi: 10.1681/ASN.2008060617.

Dorlhiac-Llacer pe. et al. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. *Braz J MedBiol Res.* 2001; 34(10):1257-63.

Drosatos K. Pathophysiology of Sepsis-Related Cardiac Dysfunction: Driven by Inflammation, Energy Mismanagement, or Both? *Curr Heart Fail Rep.* 2015 April; 12(2): 130–140. doi:10.1007/s11897-014-0247-z.

Evans L; Rhodes A; Alhazzani W; Antonelli M; Coopersmith C et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Critical Care Medicine:* Nov2021; Vol49:11:e1063-e1143. doi: 10.1097/CCM.0000000000005337

Evans T. Diagnosis and management of sepsis. *Clin Med.* 2018;18 (2):146–149. doi:10.7861/clinmedicine.18-2-146

Feliers D, Chen X, Akis N, Choudhury GG, Madaio M, Kasinath BS. VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* 2005; 68(4):1648-59. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00575.x.

Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ Res* 2003; 92:485–492. [PubMed: 12600879]

Ferrante, C.J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G. et al. The Adenosine-Dependent Angiogenic Switch of Macrophages to an M2-Like Phenotype is Independent of

Interleukin-4 Receptor Alpha (IL-4R α) Signaling. *Inflammation*. 2013; 36, 921–931. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9621-3>

Fiorelli AI, Lourenço-Filho DD, Tavares ER, Carvalho PO, Marques AF, Gutierrez PS, Maranhão, RC, Stolf N. Methotrexate associated to lipid core nanoparticles improves cardiac allograft vasculopathy and the inflammatory profile in a rabbit heart graft model. *Braz Journ of Med and Biol Res*. 2017; 50(10), e6225. doi:1590/1414-431X20176225

Fredholm BB. Physiological and pathophysiological roles of adenosine. *Sleep Biol Rhythms*. 2011;9(SUPPL.1):24–8.

Frey N, Olson EN. Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003; 65:45–79.

Furian T, Aguiar C, Prado K, et al. Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: relation to endothelial function and mortality. *J Crit Care*. 2012; 27(3):319.e9-319.e3.19E15. doi:10.1016/j.jcrc.2011.06.017

Garcia-Vello, P., Di Lorenzo, F., Zucchetta, D., Zamyatina, A., De Castro, C., & Molinaro, A. Lipopolysaccharide lipid A: A promising molecule for new immunity-based therapies and antibiotics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2021; 107970. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107970

Gauer R, Forbes D, Boyer N. Sepsis: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2020;101(7):409–418.

GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789–1858. doi:10.1016/S0140-6736(18)32279-7.

Gentile C, Muise-Helmericks RC, Drake CJ. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblast and embryonic endothelial cell proliferation. *Dev Biol.* 2013; 373(1):163-75. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.10.020.

Gessi S, Fogli E, Sacchetto V, Merighi S, Varani K, Preti D, et al. Adenosine modulates HIF-1 α , VEGF, IL-8, and foam cell formation in a human model of hypoxic foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(1):90–7.

Gomes FLT, Maranhão RC, Tavares ER, Carvalho PO, Higuchi ML, Mattos FR, Pitta FG, Hatab SA, Kalil-Filho R, Serrano CV Jr. Regression of Atherosclerotic Plaques of Cholesterol-Fed Rabbits by Combined Chemotherapy With Paclitaxel and Methotrexate Carried in Lipid Core Nanoparticles. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2018; 23(6):561-569. doi: 10.1177/1074248418778836.

Goyette RE, Key NS, Ely EW. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. *Semin Respir Crit Care Med.* 2004; 25(6):645-59. doi: 10.1055/s-2004-860979.

Gray CC, Biron-Girard B, Wakeley ME, Chung CS, Chen Y, Quiles-Ramirez Y, Tolbert JD, Ayala A. Negative Immune Checkpoint Protein, VISTA, Regulates the CD4⁺ Treg Population During Sepsis Progression to Promote Acute Sepsis Recovery and Survival. *Front Immunol.* 2022; 13:861670. doi: 10.3389/fimmu.2022.861670.

Graziani SR. et al. Uptake of a cholesterol rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol.* 2002; 85:493-7.

Guido MC, Clemente CF, Moretti AI, Barbeiro HV, Debbas V, Caldini EG, Franchini KG, & Soriano FG. Small interfering RNA targeting focal adhesion kinase prevents cardiac dysfunction in endotoxemia. *Shock.* 2012; 37 (1), 77–84. doi: 10.1097/SHK.0b013e31823532ec

Guido MC, de Carvalho Frimm C, Koike MK, Cordeiro FF, Moretti AI, Godoy LC. Low coronary driving pressure is associated with subendocardial remodelling and left

ventricular dysfunction in aortocaval fistula. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007; 34(11), 1165–1172. doi:1111/j.1440-1681.2007.04689.x

Guido MC, Koike MK, Frimm Cde C. Low coronary perfusion pressure is associated with endocardial fibrosis in a rat model of volume overload cardiac hypertrophy. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004; 59(5):228-35. doi: 10.1590/s0041-87812004000500002.

Guido MC, Lopes NM, Albuquerque CI, Tavares ER, Jensen L, Carvalho PO, Tavoni TM, Dias, RR, Pereira L, Laurindo FR, Maranhão RC. Treatment With Methotrexate Associated with Lipid Core Nanoparticles Prevents Aortic Dilation in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Frontiers in Cardiovasc Med*. 2022; 9,893774. doi:3389/fcvm.2022.893774

Hasjim BJ, Grigorian A, Stopenski S, Swentek L, Sun B, Livingston JK, Williams B, Nastanski F, Nahmias J. Moderate to severe leukocytosis with vasopressor use is associated with increased mortality in trauma patients. *J Intensive Care Soc*. 2022; 23(2):117-123. doi: 10.1177/1751143720975316.

Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol*. 2013; 4:85.

Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*. 2004;25(1):33–9.

Headrick JP, Ashton KJ, Rose'Meyer RB, Peart JN. Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions, and interactions. *Pharmacol Ther*. 2013;140(1):92–111. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.002>

Headrick JP, Lasley RD. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;193(193):189–214.

Ho Y, Smith R, Brown M, Goldstein J. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 1978;52(6):1099–114.

Hollenberg SM, Singer M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2021;18(6):424–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-020-00492-2>.

Holmes CL, Anderson MT, Mobley HLT, Bachman MA. Pathogenesis of Gram-negative bacteremia. *Clin Microbiol Rev* 2021; 34: e00234-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00234-20>.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(3):260 – 268.

Hotchkiss RS, Sherwood ER. Immunology. getting sepsis therapy right. *Science* 2015; 347(6227):1201–2. doi: 10.1126/science.aaa8334

Huang SJ, Nalos M, McLean AS. Is early ventricular dysfunction or dilatation associated with lower mortality rate in adult severe sepsis and septic shock? A meta-analysis. *Crit Care*. 2013;17(3):R96. Available from: <http://ccforum.com/content/17/3/R96>

Huennekens FM. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Adv Enzyme Regul*. 1994; 34:397-419.

Hunt A. Sepsis: An overview of the signs, symptoms, diagnosis, treatment and pathophysiology. *Emerg Nurse*. 2019;27(5):32–41.

Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR, Lindsey ML. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol*. 2017; 112(3):33. doi: 10.1007/s00395-017-0622-5.

Kakahana Y, Ito T, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *J Intensive Care*. 2016; 4:22. Published 2016 Mar 23. doi:10.1186/s40560-016-0148-1

Korneev K.V., Kondakova A.N., Arbatsky N.P., Novototskaya-Vlasova K.A., Rivkina E.M., Anisimov A.P., Kruglov A.A., Kuprash D.V., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Drutskaya M.S. Distinct biological activity of lipopolysaccharides with different lipid A acylation status from mutant strains of *Yersinia pestis* and some members of genus *Psychrobacter*. *Biochemistry (Moscow)*. 2014; 79, 1333–1338.

Kumar A., et al. Myocardial dysfunction in septic shock: Part I. Clinical manifestation of cardiovascular dysfunction. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*; 2001.

Kumar A., et al. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin*. 2000; 187(1):5–17

Landesberg G, Gilon D, Meroz Y, Georgieva M, Levin PD, Goodman S, et al. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Eur Heart J*. 2012;33(7):895-903.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(12):1440–63.

Ledderose C, Bao Y, Kondo Y, Fakhari M, Slubowski C, Zhang J, et al. Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review. *Clin Ther [Internet]*. 2016;38(5):1054–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.04.002>

Lee HT, Kim M, Joo JD, Gallos G, Chen JF, Emala CW. A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 291(4): R959-69. doi: 10.1152/ajpregu.00034.2006.

Levels JH, Lemaire LC, van den Ende AE, van Deventer SJ, van Lanschot JJ. Lipid composition and lipopolysaccharide binding capacity of lipoproteins in plasma and lymph of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure. *Crit Care Med* 2003;31(6):1647-1653

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29: 530–38.

Levy MM, Rhodes A, Phillips GS, et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med*. 2015 Jan;43(1):3-12.

Lewis A.J., Seymour C.W., Rosengart M.R. Current murine models of sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt)*. 2016; 17, 385–393.

Lewis JM, Feasey NA, Rylance J. Aetiology and outcomes of sepsis in adults in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2019; 23:212

Li C, Hua F, Ha T, Singh K, Lu C, Kalbfleisch J, et al. Activation of Myocardial Phosphoinositide-3-Kinase p110 α Ameliorates Cardiac Dysfunction and Improves Survival in Polymicrobial Sepsis. *PLoS One*. 2012;7(9):1–13.

Liang H, Song H, Zhai R, Song G, Li H, Ding X, et al. Corticosteroids for Treating Sepsis in Adult Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol*. 2021;12(August).

Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left

ventricular pressure-overload model. *Circulation research*. 2003; 93(8), 759–766. doi: 1161/01.RES.0000094744.88220.62.

Liu B, Sun Y, Xu J, Wang X, Sun Y. Angiotensin-1 alleviates LPS-induced inflammatory injury by up-regulation of miR-126 in pancreas cell line HPDE6-C7. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(12):11450–60.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2001; 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Lo Prete AC et al. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nano-emulsion. *J Pharm Pharmacol*. 2006 Jun; 58(6):801-8.

Lorigados CB, Ariga SK, Batista TR, Velasco IT, Soriano FG. Endotoxaemic myocardial dysfunction: the role of coronary driving pressure in subendocardial perfusion. *Critical care and resuscitation: journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine*. 2015; 17 (1), 12–22. PMID: 25702757.

Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Targeting hypoxia--A(2A) adenosine receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Drug Discov Today*. 2004; 9(9):403-9. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03044-2.

Machado FR, De Assunção MSC, Cavalcanti AB, Japiassú AM, De Azevedo LCP, Oliveira MC. Getting a consensus: Advantages and disadvantages of Sepsis 3 in the context of middle-income settings. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2016;28(4):361–5.

Maddock HL, Gardner NM, Khandoudi N, Brill A, Broadley KJ. Protection from myocardial stunning by ischaemia and hypoxia with the adenosine A3 receptor agonist, IB-MECA. *Eur J Pharmacol*. 2003; 477(3):235-45. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.08.024.

Manzoni P. Hematologic Aspects of Early and Late-Onset Sepsis in Preterm Infants. *Clin Perinatol.* 2015; 42(3):587-95. doi: 10.1016/j.clp.2015.04.012.

Maranhão RC, Guido MC, de Lima AD, Tavares ER, Marques AF, Tavares de Melo MD, Nicolau, JC, Salemi VM, Kalil-Filho, R. Methotrexate carried in lipid core nanoparticles reduces myocardial infarction size and improves cardiac function in rats. *International journal of nanomedicine.* 2017; 12, 3767–3784. doi:2147/IJN.S129324

Maranhão RC. et al. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo, and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002; 49:487-98.

Maranhão RC. et al. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25(10):1003-7.

Maranhão RC. et al. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. *Lipids.* 1993; 28:691-6.

Maranhão RC. et al. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. *Lipids.* 1997; 32:627-33.

Maranhão RC. et al. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994; 54:1-7.

Mehta RL, Pascual MT, Gruta CG, Zhuang S, Chertow GM. Refining predictive models in critically ill patients with acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(5):1350-7. doi: 10.1097/01.asn.0000014692.19351.52.

Mello SB, Tavares ER, Bulgarelli A, Bonfá E, Maranhão RC. Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: anti-inflammatory effect upon

antigen-induced arthritis. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8:443-9. doi: 10.2147/IJN.S29392.

Meriño M, Martín SS, Sandaña P, Herlitz K, Aguayo C, Godoy A, et al. Deletion of the adenosine A2A receptor increases the survival rate in a mice model of polymicrobial sepsis. *Purinergic Signal*. 2020;16(3):427–37.

Micha R, Imamura F, Wyler Von Ballmoos M, Solomon DH, Hernán MA, Ridker PM, et al. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2011;108(9):1362–70.

Morrison RR, Jones R, Byford AM, Stell AR, Peart J, Headrick JP, et al. Transgenic overexpression of cardiac A1 adenosine receptors mimics ischemic preconditioning. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2000;279(3 48-3).

Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:2285–95. doi: 10.2147/IJN.S18039

Murch O, Collin M, Hinds CJ, Thiemermann C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med*. 2007;33(1):13–24.

Nascimento DC, Viacava PR, Ferreira RG, Damaceno MA, Pineros AR, Melo PH, et al. Sepsis expands a Cd39(+) plasmablast population that promotes immunosuppression Via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. *Immunity* 2021; 54(9):2024–41 e8. doi: 10.1016/j. immunity.2021.08.005

Németh ZH, Csóka B, Wilmanski J, Xu D, Lu Q, Ledent C, et al. Adenosine A 2A Receptor Inactivation Increases Survival in Polymicrobial Sepsis. *J Immunol*. 2006;176(9):5616–26.

Németh ZH, Lutz CS, Csóka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through

an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol.* 2005; 175(12):8260-70. doi: 10.4049/jimmunol.175.12.8260.

Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 2001; 414(6866):916-20. doi: 10.1038/414916a.

Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit. Care Med.* 2004; 32(11), 2173–2182

Pant A, Mackraj I, Govender T. Advances in sepsis diagnosis and management: a paradigm shifts towards nanotechnology. *J Biomed Sci.* 2021;28(1):6. doi:10.1186/s12929-020-00702-6

Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med.* 1984;100(4):483-90.

Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, et al. Septic Shock in Humans Advances in the Understanding of Pathogenesis, Cardiovascular Dysfunction, and Therapy. *Ann Intern Med* [Internet]. 1990;113(3):227–42. Available from: <http://annals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/journals/aim/19709>.

Pena OM, Hancock DG, Lyle NH, et al. An Endotoxin Tolerance Signature Predicts Sepsis and Organ Dysfunction at Initial Clinical Presentation. *EBioMedicine.* 2014;1(1):64-71. doi: 10.1016/j.ebiom.2014.10.003.

Peng T, Lu X, Lei M, Moe GW, Feng Q. Inhibition of p38 MAPK decreases myocardial TNF-alpha expression and improves myocardial function and survival in endotoxemia. *Cardiovasc Res.* 2003;59(4):893–900.

Pepineli R, Santana AC, Silva FMO, Tavoni TM, Stolf NAG, Noronha IL, Maranhão RC. Use of paclitaxel carried in lipid nanoparticles to treat aortic allograft transplantation in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2021; 73(8):1092-1100. doi: 10.1093/jpp/rgab066.

Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A2A receptors. *Am J Pathol*. 2003;163(2):711–21.

Popescu CR, Cavanagh MMM, Tembo B, et al. Neonatal sepsis in low-income countries: epidemiology, diagnosis and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(5):443–452. doi:10.1080/14787210.2020.1732818

Poth JM, Brodsky K, Ehrentraut H, Grenz A, Eltzschig HK. Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic or inflammatory disease. *J Mol Med*. 2013;91(2):183–93.

Puhl SL, Kazakov A, Müller A, Fries P, Wagner DR, Böhm M, et al. Adenosine A1 receptor activation attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in response to α 1-adrenoceptor stimulation in vivo. *Br J Pharmacol*. 2016;173(1):88–102.

Puhl SL, Kazakov A, Müller A, Fries P, Wagner DR, Böhm M, Maack C, Devaux Y. Adenosine A1 receptor activation attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in response to α 1 -adrenoceptor stimulation in vivo. *Br J Pharmacol*. 2016; 173(1):88-102. doi: 10.1111/bph.13339.

Pulido JN, Afessa B, Masaki M, Yuasa T, Gillespie S, Herasevich V, et al. Clinical spectrum, frequency and significance of myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(7):620-8.

Pussinen PJ, Kopra E, Pietiäinen M, et al. Periodontitis and cardiometabolic disorders: The role of lipopolysaccharide and endotoxemia. *Periodontol 2000*. 2022;89(1):19-40. doi:10.1111/prd.12433

Ramanathan M, Luo W, Csóka B, Haskó G, Lukashev D, Sitkovsky M V., et al. Differential regulation of HIF-1 α isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A_{2A} receptor agonists. *J Leukoc Biol.* 2009;86(3):681–9.

Rodrigues DG, Covolan CC, Coradi ST, Barboza R, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54(6):765-772. doi:10.1211/0022357021779104

Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibañez OCM, et al. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: In vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(6):565–76.

Rodrigues DG. et al. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005. 55(6):565-76.

Romero-Bermejo F, Ruiz-Bailen M, Gil-Cebrian J, Huertos-Ranchal M. Sepsis-induced Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev.* 2011;7(3):163–83.

Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020;395(10219):200–211. doi:10.1016/S0140-6736(19)32989-7

Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med.* 2007;35(6):1599-1608. doi: 10.1097/01.CCM.0000266683.64081.02

Rudiger A, Singer M. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(2):187-195

Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev.* 2003;124(10–12):1047–58.

Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA. Disruption of the A3 adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;275(6):4429–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.6.4429>

Santiago AR, Madeira MH, Boia R, Aires ID, Rodrigues-Neves AC, Santos PF, et al. Keep an eye on adenosine: Its role in retinal inflammation. *Pharmacol Ther* (2020) 210:107513. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107513

Schrag SJ, Farley MM, Petit S, et al. Epidemiology of invasive early-onset neonatal sepsis, 2005 to 2014. *Pediatrics.* 2016;138(6): e20162013. doi:10.1542/peds.2016-2013

Sevilla Berrios RA, O'Horo JC, Velagapudi V, Pulido JN. Correlation of left ventricular systolic dysfunction determined by low ejection fraction and 30-day mortality in patients with severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care.* 2014;29(4):495-9.

Shih CJ, Chao PW, Ou SM, Chen YT. Long-term risk of cardiovascular events in patients with chronic kidney disease who have survived sepsis: A nationwide cohort study. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(2).

Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115:2108–2118.

Singer M., et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc.* 2016;315(8):801–10.

Soriano F, Guido M, Barbeiro H, Caldini E, Lorigados C, Nogueira A. Endotoxemic myocardial dysfunction: Subendocardial collagen deposition related to coronary driving pressure. *Shock*. 2014;42(5):472–9.

Stortz J.A., Raymond S.L., Mira J.C., Moldawer L.L., Mohr A.M., Efron P.A. 2017. Murine models of sepsis and trauma: can we bridge the Gap? *ILAR J*. 58, 90–105.

Sturgess DJ, Marwick TH, Joyce C, Jenkins C, Jones M, Masci P, et al. Prediction of hospital outcome in septic shock: a prospective comparison of tissue Doppler and cardiac biomarkers. *Crit Care*. 2010;14(2): R44.

Tao W, Deyo DJ, Traber DL, Johnston WE, Sherwood ER . Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice. *Shock*. 2004; 21(1), 31–37. doi: 10.1097/01.shk.0000101673.49265.5d

Thompson K, Venkatesh B, Finfer S. Sepsis and septic shock: current approaches to management. *Intern Med J*. 2019;49(2):160–170. doi:10.1111/imj.14199

Thompson PA, Kitchens RL. Native high-density lipoprotein augments monocyte responses to lipopolysaccharide (LPS) by suppressing the inhibitory activity of LPS-binding protein. *J Immunol*. 2006; 177(7):4880-7. doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4880.

Truong LD, Trostel J, McMahan R, Chen JF, Garcia GE. Macrophage A2A Adenosine Receptors Are Essential to Protect from Progressive Kidney Injury. *Am J Pathol* [Internet]. 2016;186(10):2601–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.017>

Valduga CJ. et al. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol*. 2003. 55:1615-22.
Valladares D, Quezada C, Montecinos P, Concha, Yañez AJ, Sobrevia L, et al. Adenosine A2B receptor mediates an increase on VEGF-A production in rat kidney glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(1):180–5.

Van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. The immunology of sepsis. *Immunity* (2021) 54(11):2450–64. doi: 10.1016/j.immuni.2021.10.012

Van Linden A, Eltzschig HK. Role of pulmonary adenosine during hypoxia: Extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(9):1437–47.

Van Wyngene L, Vandewalle J & Libert C. Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last? *EMBO Mol Med* 2018; 10, e8712

Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(2):121–37.

Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, Belliard G, Page B, Jardin F. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Crit Care Med.* 2008;36(6):1701-6.

Vincent JL, Mongkolpun W. Current management of Gram-negative septic shock. *Curr Opin Infect Dis.* 2018 Dec;31(6):600-605. doi: 10.1097/QCO.0000000000000492. PMID: 30299358.

Vincent, J.L., Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg*, 2000. 55(2): p. 79-87.

Yang S, Chung CS, Ayala A, Chaudry IH, Wang P. Differential alterations in cardiovascular responses during the progression of polymicrobial sepsis in the mouse. *Shock.* 2002; 17(1), 55–60. doi:10.1097/00024382-200201000-00010

Zhao, Q., Wang, X., Nelin, L.D., Yao, Y., Matta, R., Manson, M.E., et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 2006; 203(1): 131–140. doi:10.1084/jem.20051794. PMID:16380513.