

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/07/2026.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Anna Clara Consorti dos Santos

**Efeito do metotrexato veiculado por nanopartículas na
ativação de inflamassomas na musculatura
esquelética de ratos com infarto do miocárdio**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi
Coorientadora: Dra. Mariana Gatto

**Botucatu
2024**

Anna Clara Consorti dos Santos

Efeito do metotrexato veiculado por nanopartículas na
ativação de inflamassomas na musculatura esquelética
de ratos com infarto do miocárdio

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

Orientadora: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi
Coorientadora: Dra. Mariana Gatto

Botucatu
2024

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Anna Clara Consorti dos.

Efeito do metotrexato veiculado por nanopartículas na ativação de inflamassomas na musculatura esquelética de ratos com infarto do miocárdio / Anna Clara Consorti dos Santos.
- Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Marina Politi Okoshi

Coorientador: Mariana Gatto

Capes: 40101100

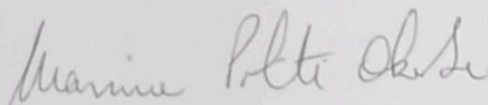
1. Infarto do miocárdio. 2. Músculo esquelético. 3. Metotrexato. 4. Nanopartículas.

Palavras-chave: Infarto agudo do miocárdio; Inflamassomas; Músculo esquelético; Metotrexato; Nanopartículas.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANNA CLARA CONSORTI DOS SANTOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 01 dias do mês de julho do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Auditório do Depto. de Clínica Médica - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ANNA CLARA CONSORTI DOS SANTOS, intitulada **EFEITO DO METOTREXATO VEICULADO POR NANOPARTÍCULAS NA ATIVAÇÃO DE INFLAMASSOMAS NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM INFARTO DO MIOCÁRDIO**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. GUSTAVO AUGUSTO FERREIRA MOTA (Participação Presencial) do(a) Unidade de Pesquisa Clínica / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. FRANCIS LOPES PACAGNELLI (Participação Virtual) do(a) Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI



ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Não há nada a temer na vida, apenas tratar de compreender.”

— Marie Curie

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que contribuíram direta ou indiretamente a ele.

A minha família por me apoiar nas minhas escolhas e vibrar com minhas conquistas.

E a Anna Clara de anos atrás que em algum momento quis ser cientista e trilhou caminhos para que chegássemos até aqui.

AGRADECIMENTOS

Devo imensos agradecimentos a minha orientadora Prof^a Dr^a Marina Politi Okoshi que aceitou me orientar, mesmo chegando super perto da data para inscrição no programa e confiou na minha capacidade e interesse. Foram imensos os ensinamentos sobre o mundo científico, não há modo de agradecer essa passagem de conhecimento, serei eternamente grata.

A Dr^a Mariana Gatto que me aceitou em seu trabalho sendo minha co-orientadora, me auxiliou em todo este longo trabalho, seja na escrita, execução de experimentos, explicações sobre as minhas dúvidas, auxílio nos momentos de tensão e alegria de fim de etapas. Muito obrigada, foi mais fácil com você!

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

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

Ao Prof. Titular Dr. Raul C. Maranhão, do Laboratório de Metabolismo e Lipídeos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto do Coração (Incor), da Universidade de São Paulo, USP que disponibilizou o medicamento com a nanotecnologia para o estudo.

Ao Dijon que sempre se mostrou muito solícito sempre que foi pedida a sua ajuda, e pela anestesia que você faz como ninguém.

A Flavia Hebler Barbosa Trovão e Danielle Hamae Yamauchi, técnicas do laboratório de biologia molecular da UNIPLEX, que me auxiliaram na execução do qPCR e me ajudaram em todas as dúvidas e problemas.

A Denise Perone por realizar as lâminas de histologia com maestria.

A todos funcionários da UNIPLEX e Dep. de Clínica Médica que sempre me auxiliaram em todas as minhas necessidades.

As Secretárias do programa de pós-graduação que sempre me ajudaram nas burocracias e dúvidas que surgiram ao longo destes anos e nos últimos instantes.

A minha banca de qualificação Prof^a Dr^a Paula Martinez e Dr^a Elida Ojopi por toda a contribuição com ideias e novas sugestões de quais caminhos seguir para a melhora dos meus conhecimentos e do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Gustavo e Lidiane que me auxiliaram na execução dos meus primeiros Westerns e mostraram que não é um bicho de sete cabeças.

A Dr^a Elida que me salvou no entendimento, execução e escrita da técnica de qPCR, foi essencial!

Aos meus colegas de laboratório, Ana Paula, Ana Luiza, Éder, Gustavo, Mariana, Lidiane, Luana, Patrícia e Rafael que dividem esta vida de pesquisa comigo e entendem todos os perrengues e alegrias. Agradeço especialmente aqueles que me ouviram reclamando de algo e me auxiliarem de modos inimagináveis em todo o processo de execução do experimento, muito obrigada!

A minha mãe, que não mede esforços por mim e sempre está ao meu lado não importa o que.

Ao meu pai, que entendeu a minha decisão de fazer esta pesquisa e me deu ferramentas para poder seguir os meus passos.

A minha avó (bobs), que me apoia incondicionalmente e me ajuda do modo dela, estando perto ou não.

A minha madrinha e tia (Mady), que compartilha um pouco deste mundo comigo e sempre busca me apoiar no âmbito pessoal e acadêmico de todos os modos possíveis.

Ao meu avô (pidukinho) *in memoriam*, por me fazer entender a necessidade de estudarmos corações e buscarmos torná-los mais fortes.

A toda a minha família mais próxima, irmãos, tios, tias, avô e avó que são sempre o meu ponto de relaxamento e descanso.

As minhas amigas de Itapira e Botucatu: Lia, Olívia, Bruna, Isabella, Beatriz e Maria Luiza que sempre foram o meu apoio, diversão e parceria. Sempre estiveram dispostas a estar por perto, vibrar por mim e comemorar também.

Ao meu namorado, Matheus, que entende e me apoia nas longas horas e finais de semana em frente ao computador ou no laboratório, e sempre busca me acalmar e ajudar quando os momentos são críticos. Mesmo você não achando os ratinhos fofinhos também, muito obrigada por tudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES Processo 88887.817568/2023-00) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo 2023/04983-0).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	13
ABREVIATURAS	15
REGISTRO DO IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE.....	18
RESUMO.....	20
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO.....	24
OBJETIVO	31
Objetivo geral	32
Objetivos específicos	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
Grupos experimentais	34
Indução do infarto e tratamento pós-operatório	35
Tratamento	35
Avaliação estrutural e funcional do coração por ecocardiograma	36
Eutanásia e coleta de amostras	37
Análise histológica	38
Análise da expressão proteica por Western blot	38
Dosagem de citocinas	39
Expressão gênica por qPCR	39
Análise estatística	40
RESULTADOS	42
Análise da estrutura cardíaca e função do ventrículo esquerdo por ecocardiograma	43
Variáveis anatômicas	46
Análise histológica	47
Expressão proteica	49
Dosagem sérica e muscular de citocina	51
Expressão gênica de inflamassomas e seus componentes	52
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Delineamento Experimental.

Figura 2. Imagens representativas de cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina e eosina.

Figura 3. Análise histológica dos músculos sóleo e gastrocnêmio.

Figura 4. Expressão proteica no músculo esquelético sóleo avaliada por Western blot.

Figura 5. Expressão proteica no músculo esquelético sóleo avaliada por Western blot.

Figura 6. Concentração de interleucina-1 no músculo sóleo, soro e músculo gastrocnêmio.

Figura 7. Expressão gênica no músculo sóleo de componentes dos inflamassomas.

Figura 8. Expressão dos genes investigados no projeto rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap.

TABELAS

Tabela 1. Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais cardíacos ao final do experimento.

Tabela 2. Índices ecocardiográficos de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo.

Tabela 3. Variáveis anatômicas.

ABREVIATURAS

- AE: diâmetro átrio esquerdo
- AO: diâmetro da aorta
- APOE: Alipoproteína E
- ASC: Proteína adaptadora associada á apoptose com domínio CARD
- CASP-1: Caspase-1
- DAMPs: danger-associated molecular patterns
- DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
- DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
- EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE.
- EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular
- FC: frequência cardíaca
- FE: fração de ejeção
- GSDMD: Gardesmina
- HMGB1: *High mobility group protein B1*
- IAM: Infarto Agudo do Miocárdio
- IC: Insuficiência cardíaca
- IFN- gamma: Interferon- gamma
- IGF1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- IL1B: interleucina-1 beta
- IL6: Interleucina- 6
- IL10: Interleucina -10
- IL18: Interleucina-18
- LDE: Nanopartículas de núcleo lipídico
- LPS: Lipossacarídeos
- MCP1: Mitochondrial adapter protein
- MTX: Metotrexato
- MyHCA: *Myosin heavy chain A*
- NFKB1: Fator Nuclear NF-kappa-B
- NLRC4: NLR family CARD domain-containing protein 4
- NLRP1: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1
- NLRP3: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
- NLRS: Receptores de ligação a nucleotídeo
- PC: peso corporal
- PPIA: Ciclofilina

- ROS: Espécies reativas de oxigênio
- TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral;
- TGFB1: Fator de crescimento transformador beta 1
- TLR: Toll Like Receptors
- TLR4: Toll Like receptor 4
- TNFA: Fator de Necrose Tumoral
- TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do VE
- VD: Ventrículo direito
- VE: Ventrículo esquerdo
- VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE

REGISTRO DO IMPACTO
ESPERADO NA SOCIEDADE

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no Brasil e no mundo. O infarto agudo do miocárdio (IAM) contribui para grande parcela de óbitos. Frequentemente, o infarto do miocárdio leva à insuficiência cardíaca e alterações em diferentes órgãos e sistemas, como a musculatura esquelética. Ativação de inflamação tem papel importante em mecanismos desencadeados após a isquemia miocárdica. Inibidores de inflamação têm sido avaliados para melhorar o prognóstico de pacientes pós-infarto. O metotrexato é um medicamento habitualmente utilizado no tratamento da artrite reumatoide. Além de modular a ativação inflamatória, o fármaco tem efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares. Para melhorar suas propriedades farmacológicas, o metotrexato foi associado a nanopartículas de núcleo lipídico. Neste estudo, avaliamos os efeitos da administração precoce e tardia do metotrexato associado a nanopartículas de núcleo lipídico no coração e em músculos esqueléticos de ratos com infarto do miocárdio.

Os resultados mostraram que a administração crônica do metotrexato associada a nanopartículas de núcleo lipídico, iniciada precoce ou tardiamente, para ratos com infarto do miocárdio não altera a função do coração ou o fenótipo do músculo esquelético. Entretanto, a administração precoce do fármaco reduziu a concentração dos marcadores de inflamação denominados inflamassoma Nlrp1 no músculo esquelético sóleo. Os achados contribuem para o melhor entendimento sobre a modulação da inflamação e o tratamento pós-infarto do miocárdio.

RESUMO

Introdução: Após o infarto do miocárdio, substâncias liberadas de cardiomiócitos necróticos sensibilizam receptores de ligação a nucleotídeos como NLRP1, NLRP3 e NLRC4. A ativação destes receptores estimula inflamassomas e o processo de inflamação aguda. Os inflamassomas ativam a caspase-1 e clivam a IL1B, induzindo a produção de mediadores inflamatórios. A inflamação inicial é benéfica para a reparação do tecido cardíaco; entretanto, se persistente, pode intensificar o processo de remodelação cardíaca e pode levar à insuficiência cardíaca. A insuficiência cardíaca cursa com alterações em diversos órgãos e sistemas como a musculatura esquelética. O comportamento dos inflamassomas na musculatura esquelética após o infarto agudo do miocárdio (IAM) não está esclarecido. O metotrexato (MTX) é um imunomodulador relacionado a redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O MTX associado a nanopartículas de núcleo lipídico (MTX-LDE) administrado 24 horas após a indução do IAM reduziu o processo inflamatório e melhorou a função cardíaca em ratos. Ainda não se sabe se o MTX pode influenciar a resposta imune à lesão do músculo esquelético associada à insuficiência cardíaca. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da administração precoce e tardia de MTX-LDE na remodelação cardíaca e marcadores inflamatórios no músculo sóleo de ratos infartados. **Métodos:** Ratos Wistar machos submetidos a indução de infarto ou cirurgia fictícia foram separados nos grupos Sham (n=11), IAM (n=11), IAM-P (n=14) e IAM-T (n=12). No grupo IAM-P, o tratamento com MTX-LDE foi iniciado 24 horas após o IAM na dose de 1 mg/kg/semana via intraperitoneal e mantido por 10 semanas. No grupo IAM-T, o tratamento foi iniciado 3 semanas após a cirurgia e mantido por 7 semanas. Ecocardiograma foi realizado ao final do estudo; apenas ratos com área infartada do ventrículo esquerdo maior que 35% foram incluídos no estudo. A expressão de proteínas e genes de Nlrp1, Nlrp3, Nlrc4, proteína associada à apoptose com domínio CARD (Asc), Pro-Caspase-1, Caspase-1, Pro-Interleucina (Il)-1 beta, e Il1b foi quantificada por Western blotting e qPCR, respectivamente, no músculo sóleo. O trofismo do sóleo foi avaliado por morfometria. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Bonferroni ou pelo teste de Kruskal-Wallis complementado por Dunn. **Resultados:** O tamanho do infarto não diferiu entre os grupos. O tratamento precoce ou tardio não alterou variáveis estruturais e funcionais do coração. A expressão proteica de Nlrp1 foi menor no grupo IAM-P que no Sham. Houve tendência (p=0,068) para a expressão proteica de Nlrc4 ser menor no grupo IAM-P que no Sham. O trofismo muscular e a expressão gênica e proteica de Nlrp3, Asc, Pro-Caspase-1, Caspase-1, Pro-Il1b e Il1b não diferiu entre os grupos. **Conclusão:** A administração precoce ou tardia de MTX-LDE não altera o processo de remodelação cardíaca pós-infarto em ratos. A administração precoce de MTX-LDE reduz o marcador de inflamação NLRP1 no músculo esquelético sóleo sem, no entanto, alterar o fenótipo muscular.

Palavras-chave: inflamassomas, músculo esquelético, infarto agudo miocárdio, insuficiência cardíaca, metotrexato, nanopartículas.

ABSTRACT

Introduction: After myocardial infarction, substances released from necrotic cardiomyocytes sensitize nucleotide-binding receptors such as NLRP1, NLRP3, and NLRC4. Activation of these receptors stimulates inflammasomes and acute inflammation. Inflammasomes activate caspase-1 and cleave IL1B, inducing the production of inflammatory mediators. Early inflammation is beneficial for cardiac tissue repair; however, if persistent, it may intensify the cardiac remodeling process and induce heart failure. Cardiac failure is associated with alterations in many organs and systems such as the skeletal muscle. The behavior of inflammasomes in skeletal muscle after acute myocardial infarction (AMI) is not clear. Methotrexate (MTX) is an immunomodulator which reduces the risk of developing cardiovascular diseases. MTX associated with lipid core nanoparticles (MTX-LDE) administered 24 hours after AMI induction decreased the inflammatory process and improved cardiac function in rats. Whether MTX modulates the immune response to heart failure-associated skeletal muscle changes is not known. **Objective:** To evaluate the effects of early or late administration of MTX-LDE on cardiac remodeling and inflammatory markers in the soleus muscle of infarcted rats. **Methods:** Male Wistar rats subjected to infarction induction or sham surgery were divided into Sham (n=11), AMI (n=11), AMI-E (n=14), and AMI-L (n=12) groups. MTX-LDE was initiated 24 hours after AMI induction at 1 mg/kg/week intraperitoneally and maintained for 10 weeks in the AMI-E group. MTX-LDE was initiated 3 weeks after surgery and maintained for 7 weeks in the AMI-L group. Echocardiogram was performed at the end of the study; only rats with infarcted area greater than 35% of total left ventricle area were included in the study. The expression of proteins and genes of Nlrp1, Nlrp3, Nlrc4, apoptosis-associated protein with CARD domain (Asc), Pro-Caspase-1, Caspase-1, Pro-Interleukin (Il)-1 beta, and Il1b was quantified by Western blotting and qPCR, respectively, in the soleus muscle. Soleus trophism was evaluated by morphometry. Comparisons between groups were made by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test or Kruskal-Wallis and Dunn. **Results:** Infarct size did not differ between groups. Early or late treatment did not change structural and functional variables of the heart. Protein expression of Nlrp1 was lower in the AMI-E group than in the Sham. There was a trend ($p=0.068$) for protein expression of Nlrc4 to be lower in the AMI-E group than in the Sham. Muscle trophism and gene and protein expression of Nlrp3, Asc, Pro-Caspase-1, Caspase-1, Pro-Il1b, and Il1b did not differ between groups. **Conclusion:** Early or late administration of MTX-LDE does not alter the post-infarction cardiac remodeling process in rats. Early administration of MTX-LDE reduces the inflammation marker NLRP1 in soleus skeletal muscle without changing muscle phenotype.

Keywords: inflammasomes, skeletal muscle, acute myocardial infarction, heart failure, methotrexate, nanoparticles.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no mundo. Entre elas, destaca-se o infarto agudo do miocárdio (IAM), doença isquêmica resultante do estreitamento das artérias coronárias por aterosclerose e trombose (1). No Brasil, são registrados cerca de 300 a 400 mil casos por ano (2). Apesar do avanço no tratamento da fase aguda, pacientes que sobrevivem ao IAM apresentam alto risco de evoluir com insuficiência cardíaca (IC) e óbito (2,3).

No infarto, a obstrução ao fluxo sanguíneo coronariano leva à necrose dos cardiomiócitos juntamente com desintegração do colágeno interfibrilar, perda de função contrátil, afinamento da parede infartada e dilatação da cavidade ventricular esquerda. Este processo agudo é conhecido como expansão pós-infarto e ocorre dentro de dias após o evento agudo (4). Cronicamente, inicia-se o processo de remodelação, que é definido como a ocorrência de alterações moleculares, celulares e intersticiais, que se manifestam clinicamente por modificações na arquitetura, massa, e função do coração (4,5). Como a remodelação pode evoluir para progressiva deterioração da função cardíaca, o processo é considerado fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (6).

Logo após o IAM ocorre ativação do sistema imune inato e inflamação, que são importantes no desenvolvimento precoce e tardio do processo de remodelação cardíaca (7–9). Embora a inflamação seja necessária no restabelecimento do tecido danificado, excessiva ativação da resposta imune resulta em amplificação da inflamação, que se estende para áreas não infartadas e está associada a remodelamento ventricular adverso (10,11). O período entre a inflamação e a remodelação cardíaca é representado por três fases: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação.

A fase inflamatória inicia-se nos primeiros dias após o infarto com a produção de mediadores inflamatórios e o recrutamento de leucócitos para o local danificado estimulados por células da imunidade inata residentes no miocárdio, o que promove a remoção de células mortas, matriz extracelular e outros detritos teciduais (10). A fase proliferativa é iniciada após a eliminação das células danificadas e caracteriza-se pelo clearance de debris celulares e células mortas (10,12). Macrófagos e linfócitos produzem citocinas como interleucina-10 (IL10) e fator de crescimento transformador beta (TGFB1) que são repressoras dos estímulos inflamatórios e contribuem para a resolução da inflamação (13). Os fibroblastos tornam-se as células dominantes na fase proliferativa, apresentando alterações fenotípicas e funcionais com alta atividade proliferativa e migratória, e elevada capacidade para sintetizar matriz extracelular e colágeno, participando ativamente na indução de fibrose (12,13).

Após o IAM, cardiomiócitos mortos liberam moléculas que funcionam como sinais de alerta e são reconhecidas por células imunes e teciduais presentes no miocárdio (5,14) Essas moléculas de alerta ou DAMPs (do inglês, *danger-associated molecular patterns*) são reconhecidas por receptores de reconhecimento padrão presentes em células residentes no miocárdio, que geram vias de transdução de sinal e iniciam o processo inflamatório (15). Os DAMPs podem ser ATP, agregados de proteínas, espécies reativas do oxigênio (ROS), proteínas do choque térmico (HSP) e *Myosin heavy chain A* (MyHCA) (9,16,17). O reconhecimento dos DAMPs pelos receptores resulta na ativação de cascatas inflamatórias e do fator nuclear NF-kappa-B (NFKB1), e consequente produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, que auxiliam no recrutamento de células imunes e fagócitos ao local da injúria e eliminação das células necróticas e detritos celulares (18).

Dentre os diversos receptores que reconhecem DAMPs, destacam-se os receptores de ligação a nucleotídeo (NLRs), alvo de muitos estudos em doenças inflamatórias (16,19). Esses receptores estão presentes no citosol de células imunes e não imunes do miocárdio e monitoram os compartimentos intra e extracelulares para sinais de infecção ou lesão tecidual. A inflamação resultante do infarto do miocárdio é chamada de “estétil” por ser ativada por DAMPs e não por agente infeccioso (8,16,19).

Estruturalmente, os NLRs apresentam um domínio central de oligomerização (NACHT), um domínio C-terminal com repetições de leucina (LRR), responsável por detectar ligantes microbianos e alarminas, e um domínio N-terminal, que pode ser CARD ou PYD (5,14,15). Alguns receptores NLRs como o NLRP1 (nome completo: *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1*), NLRP3 (nome completo: *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*) e NLRC4 (nome completo: *NLR family CARD domain-containing protein 4*) formam o inflamassoma. Este complexo proteico é intracelular e tem papel central no início e amplificação da resposta inflamatória estétil (14,20). O inflamassoma compreende múltiplas proteínas que ativam proteases inflamatórias chamadas caspases, principalmente a caspase-1 (CASP1), envolvida em processos de apoptose e inflamação, e responsável pela clivagem de formas imaturas das citocinas interleucina (IL)1B e IL18. O inflamassoma é composto, basicamente, pelo receptor NLR, uma proteína adaptadora denominada ASC (proteína associada à apoptose com domínio CARD), e a CASP1, proteína efetora de resposta inflamatória. A ASC e CASP1 ligam-se por meio do domínio CARD que ambos possuem em comum; portanto, o domínio CARD da ASC funciona como local de recrutamento. Após os sensores serem ativados pelos DAMPs, eles sofrem oligomerização, associam-se com a

proteína adaptadora ASC e recrutam a pró-CASP1 que, por auto clivagem, libera a CASP1 ativa, responsável pela ativação da IL1B (6,16,20,21).

A IL1B desempenha importante papel na resposta imune inata e inflamação. A citocina mobiliza e ativa leucócitos, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, aumenta a produção de proteínas do sistema complemento e proteína C-reativa por hepatócitos, e exacerba a capacidade fagocítica de neutrófilos e macrófagos e a produção de ROS (22–24). A IL1B também facilita a entrada de outras moléculas do sistema imune em tecidos lesionados e contribui para o processo de proliferação, diferenciação e apoptose celular, estimulando a produção de óxido nítrico e apoptose dos cardiomiócitos (15,16).

A ativação do inflamassoma depende de dois sinais. O primeiro sinal ou *priming* é engatilhado por diversos receptores celulares como o TLR (*Toll Like receptor*) que, ao ser sensibilizado por PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) /DAMPs, ativa o NFkB1 resultando na transcrição de componentes do inflamassoma. Outros componentes como ASC, pró-IL18 e pró-CASP1 são expressos constitutivamente nas células e não são alterados por este priming. O segundo sinal consiste na ativação propriamente dita do inflamassoma e formação do complexo proteico, que pode ocorrer por vários estímulos como: a) efluxo de potássio e ativação do receptor purinérgico P₂X₇ por ATP extracelular; b) sinalização de cálcio; c) produção de ROS; d) disfunção mitocondrial; e) ruptura de lisossomos com liberação de catepsinas e outros componentes lisossomais no citosol (14,15,25). Na ausência de sinais de ativação, os receptores NLR são mantidos inativos por diversas proteínas reguladoras (26). O inflamassoma induz também um processo de morte celular denominado piroptose, que ocorre pela auto-clivagem da proteína gasdermina (GSDMD) pela CASP1, com a formação de poros, liberação das citocinas e amplificação da resposta inflamatória (27,28).

O inflamassoma formado pelo receptor NLRP3 é o mais estudado (5,25). Ele é expresso em leucócitos, miócitos e fibroblastos cardíacos e está ligado com a patogênese do Alzheimer, doenças autoimunes, câncer e aterosclerose (15,16,28). Estudos têm demonstrado sua presença na apoptose de células imunes por sepse e disfunção de diversos órgãos (29).

Estudos experimentais têm mostrado aumento da expressão gênica do NLRP3, ASC e pró-IL1B em cardiomiócitos e outras células miocárdicas de camundongos infartados (30,31). A ativação de NLRP3 resultou em maior clivagem da caspase-1 (30,32), aumento da síntese de colágeno nos fibroblastos (33,34) e da produção de IL1B por leucócitos, e amplificação da resposta inflamatória e morte celular (33,35). Evidências mostram que ativação de NLRP3 pode

perpetuar a resposta inflamatória pós-IAM e contribuir para o remodelamento ventricular adverso, arritmias e IC (9,15,16). Pacientes com doença coronariana crônica apresentam expressão elevada de NLRP3 e IL1B em células mononucleares circulantes e em neutrófilos infiltrados na lesão miocárdica (36,37).

A participação dos inflamassomas NLRP1 e NLRC4 na inflamação estéril, principalmente após o IAM, não está completamente esclarecida. Evidências mostram que o NLRP1 tem grande participação em infecções bacterianas e virais, mas pouco envolvimento na inflamação estéril (5). Polimorfismos do NLRP1 humano e produção aumentada de IL1B têm sido relacionados com doenças inflamatórias como diabetes tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico e doença de Alzheimer (38–40). Componentes destes receptores e produção de IL1B foram observados no encéfalo de camundongos 24 horas após isquemia tromboembólica cerebral (41).

O NLRC4 é amplamente encontrado no epitélio intestinal, e foi relacionado com doença inflamatória intestinal, neoplasias e esclerose múltipla (5,42–44). Devi et al. (45) mostraram que o agravamento da IC pós-infarto por diabetes ocorre por falha na mitofagia com acúmulo de DNA mitocondrial no citosol e ativação de NLRC4 e CASP1. A hiperativação de NLRC4 aumentou a morte de cardiomiócitos e a gravidade da IC (45). Embora o envolvimento do NLRP1 e NLRC4 na inflamação após o IAM ainda não esteja totalmente esclarecido, os resultados acima permitem levantar a hipótese que estes receptores de inflamassomas participam na inflamação miocárdica pós-infarto.

A musculatura esquelética é um tecido abundante envolvido em funções fundamentais como locomoção e metabolismo do corpo humano (46–49). O processo inflamatório e a IC decorrentes do infarto levam a alterações sistêmicas e em tecidos periféricos, incluindo a musculatura esquelética (50–53). Estudos clínicos e experimentais mostraram que a IC avançada está associada a alterações musculares caracterizadas por atrofia, infiltrado gorduroso, apoptose de miócitos, inflamação, disfunção mitocondrial, e redução de enzimas oxidativas e da capacidade funcional. Atualmente, diminuição da massa muscular é considerada importante fator na morbidade e no prognóstico da insuficiência cardíaca (51–55).

Em ratos com IC pós-infarto, observamos inflamação e áreas de necrose no músculo esquelético (55). Em músculos esqueléticos de pacientes com IC crônica, foi observada atrofia de fibras, inflamação, disfunção mitocondrial e apoptose de miócitos (51,52). Evidências sugerem que a apoptose muscular pode ser desencadeada pela ação de citocinas pró-inflamatória e pelo fator de necrose tumoral-alfa (TNFA) (56).

Assim como no coração, a morte de miócitos esqueléticos leva a ativação de células imunes. Múltiplos DAMPs foram achados em casos de injúria muscular após trauma, inflamação e reparo tecidual. Os DAMPs peptídeos formil e DNA mitocondrial são reconhecidos por macrófagos e neutrófilos presentes na musculatura (57). A *High mobility group protein B1* (HMGB1), uma proteína multifuncional, liberada na matriz extracelular por miócitos necróticos, induz o recrutamento de células inflamatórias e a ativação de fagócitos por receptores celulares como o TLR4 (58). Macrófagos infiltrados na musculatura danificada secretam mediadores inflamatórios como *Mitochondrial adapter protein* (MCP1), IL1B e TNFA, que aumentam o recrutamento de células para o tecido lesado e perpetuam a inflamação (49,58). A presença de IL1B e TNFA no músculo esquelético promove atrofia e catabolismo muscular pela redução do metabolismo oxidativo e da sinalização pela via do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) (59,60). A IL1B aumenta a expressão do *Muscle-specific RING finger protein 1* (MURF1) e Atrogina-1, ambos sinalizadores de atrofia muscular (61). O achado recente que injeção muscular de lipopolissacarídeos (LPS) aumenta os níveis de NLRP3 e IL1B sugere a participação ativa da musculatura esquelética na resposta inflamatória por meio de suas próprias citocinas, as “miocinas”, que agem de modo local ou sistêmico (28).

Embora alguns estudos tenham avaliado inflamassomas e músculo esquelético, o comportamento dos mesmos na musculatura esquelética durante a IC não está totalmente esclarecido. Metilação de ASC e concentração plasmática de IL1B estão associadas ao pico de consumo de oxigênio (VO₂), sugerindo que ativação de inflamassomas pode estar envolvida na capacidade aeróbia de pacientes com IC. Metilação de ASC leva à redução da inflamação e melhora da capacidade funcional na IC (20). Em modelo de atrofia muscular por sepse, pesquisadores mostraram que a Il1b está presente no músculo esquelético e contribui para a atrofia muscular (29). Quando submetidos à redução da expressão gênica de Nlrp3, os camundongos apresentaram diminuição da concentração sérica de Il1b e atenuação da atrofia muscular 96 horas após indução da sepse (29,62). Em cultura celular de miócitos, foi observada relação entre ativação do inflamassoma NLRP3 e alterações morfológicas e moleculares (61). Em ratos infartados, a inibição do Nlrp3 reduziu o tamanho do infarto e melhorou a função cardíaca (5).

O metotrexato (MTX) é um análogo e antagonista ao ácido fólico, originalmente desenvolvido para o tratamento do câncer por interferir na síntese, reparo e replicação do DNA. Atualmente, é também um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da artrite

reumatoide (63–65). Estudos sugerem que, em baixas doses, o MTX tem efeitos imunossupressores e, portanto, benéficos no tratamento de doenças autoimunes, sem alterar a proliferação celular (66–68).

Além de suas ações como imunomodulador, o MTX reduziu o risco de doenças cardiovasculares e de infarto do miocárdio em pacientes com inflamação crônica (63,69,70). O MTX aumenta a expressão do antagonista do receptor de IL-1 e reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e da proteína C-reativa, resultando em diminuição da ativação do inflamassoma NLRP3 e proteção contra injúria isquêmica (49,64,71–73). Apesar do MTX ser muito utilizado no tratamento de algumas doenças como a artrite reumatoide, ele tem alta toxicidade e rápida degradação no trato intestinal.

Pesquisadores vêm utilizando a associação do MTX a nanopartículas biodegradáveis para que o fármaco possa ter maior eficácia e biodisponibilidade (74,75). Maranhão et al. (76) usaram o MTX veiculado por nanopartículas de núcleo lipídico (*lipid core nanoparticles*, LDE) para o tratamento de ratos infartados. As LDE assemelham-se à composição e estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL). No plasma, as LDE ligam-se à apolipoproteína E (APOE) e são reconhecidas por receptores de LDL presentes na membrana celular. A seguir, são internalizadas pelas células via endocitose (77–79). As LDE se concentram no tecido inflamado onde existe maior expressão de receptores de LDL. Assim, o uso das LDE como veículo para o MTX aumenta sua concentração no interior das células (77,78).

O uso de MTX associado às LDE melhorou a função diastólica e reduziu a dilatação cardíaca, hipertrofia de cardiomiócitos, infiltrado inflamatório e fibrose miocárdica dos ratos infartados (76). Os mesmos pesquisadores também mostraram que o MTX veiculado por LDE reduziu placas ateroscleróticas e inflamação na artrite reumatoide (80,81). Portanto, os resultados indicam que o MTX veiculado por LDE tem impacto favorável na remodelação cardíaca pós-IAM. No entanto, não são conhecidos os efeitos do MTX sobre a ativação de inflamassomas na musculatura esquelética após IAM.

OBJETIVO

CONCLUSÃO

A administração precoce ou tardia de MTX-LDE não altera o processo de remodelação cardíaca pós-infarto em ratos. A administração precoce de MTX-LDE reduz o marcador de inflamação NLRP1 em músculo esquelético sem, no entanto, alterar o fenótipo muscular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martin SS, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, Avery CL, et al. heart disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. *Circulation* 2024; 149: 347-913.
2. Silva Júnior AB, Santos RVS, Nascimento AB, Nascimento LCGB, Bomfim Neto R, Silveira DJ de AS, et al. Relação entre a mortalidade e os fatores de risco cardiovasculares do infarto agudo do miocárdio por regiões brasileiras: uma revisão sistemática da literatura com estudo ecológico. *Res, Soc Dev* 2022; 11.
3. Santos JM, Martinez ABR, Silva EJ, Souza GRS, Lopes JM. Stroke and Myocardial Infarction: Effects of the “Hiperdia” and “Mais Médicos” Programs on the Hospitalizations Trends in Brazil. *Int J Cardiovasc Sci* 2021; 34: 44-52.
4. Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies.
5. Mezzaroma E, Abbate A, Toldo S. NLRP3 inflammasome inhibitors in cardiovascular diseases. *Molecules* 2021; 26: 976-994.
6. Liu Y, Bi X, Zhang Y, Wang Y, Ding W. Mitochondrial dysfunction/NLRP3 inflammasome axis contributes to angiotensin II-induced skeletal muscle wasting via PPAR- γ . *Laboratory Investigation*. 2020; 100: 712–726.
7. Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, Ryabov V. Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Front. immunol* 2021; 12.
8. Takahashi M. NLRP3 Inflammasome as a Novel Player in Myocardial Infarction. *Int Heart J* 2014; 55: 101-105.
9. Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15: 203–214.
10. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res* 2016; 119: 91–112.
11. Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol* 2017; 112.
12. Chen W, Bian W, Zhou Y, Zhang J. Cardiac Fibroblasts and Myocardial Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021; 9.
13. Oliveira JB, Soares AASM, Sposito AC. Inflammatory Response During Myocardial Infarction. In: *Adv Clin Chem* 2018; 84: 39–79.
14. Toldo S, Mezzaroma E, Buckley LF, Potere N, Di Nisio M, Biondi-Zoccai G, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases. *Pharmac Ther* 2022; 236.
15. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
16. Butts B, Gary RA, Dunbar SB, Butler J. The Importance of NLRP3 Inflammasome in Heart Failure. *J Card Fail* 2015; 21: 586–593.
17. Briasoulis A, Androulakis E, Christophides T, Tousoulis D. The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure. *Heart Fail Rev* 2016; 21: 169–176.
18. Sharma S, Garg I, Ashraf MZ. TLR signalling and association of TLR polymorphism with cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol* 2016; 87: 30–37.
19. Barbé F, Douglas T, Saleh M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25: 681–697.
20. Butts B, Butler J, Dunbar SB, Corwin EJ, Gary RA. ASC methylation and interleukin-1 α are associated with aerobic capacity in heart failure. *Med Sci Sports Exerc.* 2017; 49: 1072–1078.
21. Fu J, Wu H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annu Rev Immunol* 2023; 41: 301-316.
22. Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van Tassell BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2020; 126: 1260–1280.
23. Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, Abbate A. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; 315: 1553–1568.
24. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine* 2014; 69: 136–145.

25. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* 2016; 41: 1012–1021.
26. Harapas CR, Robinson KS, Lay K, Wong J, Traspas RM, Nabavizadeh N, et al. DPP9 deficiency: An inflammasomopathy that can be rescued by lowering NLRP1/IL-1 signaling. *Sci Immunol*. 2022; 7.
27. Christgen S, Kanneganti TD. Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Curr Opin Immunol* 2020; 62: 39–44.
28. Dubuisson N, Versele R, Davis-López de Carrizosa MA, Selvais CM, Brichard SM, Abou-Samra M. Walking down skeletal muscle lane: From inflammasome to disease. *Cells* 2021; 10.
29. Liu Y, Wang D, Li T, Yang F, Li Z, Bai X, et al. The role of NLRP3 inflammasome in inflammation-related skeletal muscle atrophy. *Front Immunol* 2022; 13.
30. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 19725–19730.
31. Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen A V., et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2013; 99: 164–174.
32. Toldo S, Das A, Mezzaroma E, Chau VQ, Marchetti C, Durrant D, et al. Induction of microrna-21 with exogenous hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemic and inflammatory injury in mice. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7: 311–320.
33. Saxena A, Chen W, Su Y, Rai V, Uche OU, Li N, et al. IL-1 Induces Proinflammatory Leukocyte Infiltration and Regulates Fibroblast Phenotype in the Infarcted Myocardium. *The J of Immunol* 2013; 191: 4838–4848.
34. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011; 123: 594–604.
35. Brydges SD, Broderick L, McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Hoffman HM. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *J Clin Investig* 2013; 123: 4695–4705.
36. Satoh M, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: Results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clin Sci* 2014; 126: 233–241.
37. Ren Z, Yang K, Zhao M, Liu W, Zhang X, Chi J, et al. Calcium-Sensing Receptor on Neutrophil Promotes Myocardial Apoptosis and Fibrosis After Acute Myocardial Infarction via NLRP3 Inflammasome Activation. *Can J Cardiol* 2020; 36: 893–905.
38. Yu CH, Moeking J, Geyer M, Master's SL. Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice. *J Mol Biol* 2018; 430: 142–52.
39. da Cruz HLA, Cavalcanti CAJ, de Azêvedo Silva J, de Lima CAD, Fragoso TS, Barbosa AD, et al. Differential expression of the inflammasome complex genes in systemic lupus erythematosus. *Immunogenetics* 2020; 72: 217–24.
40. Tupik JD, Nagai-Singer MA, Allen IC. To protect or adversely affect. The dichotomous role of the NLRP1 inflammasome in human disease. *Mol Aspects Med* 2020; 76.
41. Abulafia DP, De Rivero Vaccari JP, Lozano JD, Lotocki G, Keane RW, Dietrich WD. Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 534–544.
42. Wen J, Xuan B, Liu Y, Wang L, He L, Meng X, et al. Updating the NLRC4 Inflammasome: from Bacterial Infections to Autoimmunity and Cancer. *Front Immunol* 2021; 12.
43. Bulté D, Rigamonti C, Romano A, Mortellaro A. Inflammasomes: Mechanisms of Action and Involvement in Human Diseases. *Cells* 2023; 12: 1766-1797.
44. Bauer R, Rauch I. The NAIP/NLRC4 inflammasome in infection and pathology. *Mol Aspects Med* 2020; 76
45. Durga Devi T, Babu M, Mäkinen P, Kaikkonen MU, Heinaniemi M, Laakso H, et al. Aggravated Postinfarct Heart Failure in Type 2 Diabetes Is Associated with Impaired Mitophagy and Exaggerated Inflammasome Activation. *Am J Pathol* 2017; 187: 2659–2673.
46. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Syst Biol Med* 2020; 12.

47. Gallagher H, Hendrickse PW, Pereira MG, Bowen TS. Skeletal muscle atrophy, regeneration, and dysfunction in heart failure: Impact of exercise training. *JSport Health Sci* 2023; 12: 557- 567.
48. Mangner N, Winzer EB, Linke A, Adams V. Locomotor and respiratory muscle abnormalities in HFrEF and HFpEF. *Front. Cardiovasc. Med* 2023; 10.
49. Mangoni AA, Sotgia S, Zinellu A, Carru C, Pintus G, Damiani G, et al. Methotrexate and cardiovascular prevention: an appraisal of the current evidence. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2023; 17: 1-22.
50. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *The Lancet* 2017; 390: 400–414.
51. Song T, Manoharan P, Millay DP, Koch SE, Rubinstein J, Heiny JA, et al. Dilated cardiomyopathy-mediated heart failure induces a unique skeletal muscle myopathy with inflammation. *Skelet Muscle* 2019; 9: 4-16.
52. Lavine KJ, Sierra OL. Skeletal muscle inflammation and atrophy in heart failure. *Heart Fail Ver* 2017; 22: 179–189.
53. Gomes MJ, Pagan LU, Lima ARR, Reyes DRA, Martinez PF, Damatto FC, et al. Effects of aerobic and resistance exercise on cardiac remodelling and skeletal muscle oxidative stress of infarcted rats. *J Cell Mol Med.* 2020; 24: 5352–5362.
54. Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Junior SA, et al. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol* 2013; 167: 698–703.
55. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima ARR, et al. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Med Sci Monit* 2010; 16: 374-383.
56. Josiak K, Jankowska EA, Piepoli MF, Banasiak W, Ponikowski P. Skeletal myopathy in patients with chronic heart failure: significance of anabolic-androgenic hormones. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2014; 5: 287–296.
57. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464: 104–107.
58. Tu H, Li YL. Inflammation balance in skeletal muscle damage and repair. *Front. Immunol.* 2023; 14.
59. Knapp F, Niemann B, Li L, Molenda N, Kracht M, Schulz R, et al. Differential effects of right and left heart failure on skeletal muscle in rats. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020; 11: 1830–1849.
60. Jahng JWS, Song E, Sweeney G. Crosstalk between the heart and peripheral organs in heart failure. *Exp Mol Med* 2016; 48.
61. Eggelbusch M, Shi A, Broeksma BC, Vázquez-Cruz M, Soares MN, de Wit GMJ, et al. The NLRP3 inflammasome contributes to inflammation-induced morphological and metabolic alterations in skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2022; 13: 3048–3061.
62. Huang N, Kny M, Riediger F, Busch K, Schmidt S, Luft FC, et al. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Med Exp.* 2017; 5.
63. Baoqi Y, Dan M, Xingxing Z, Xueqing Z, Yajing W, Ke X, et al. Effect of Anti-Rheumatic Drugs on Cardiovascular Disease Events in Rheumatoid Arthritis. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021; 8.
64. Bălănescu A, Bojincă V, Bojincă M, Donisan T, Bălănescu S. Cardiovascular effects of methotrexate in immune-mediated inflammatory diseases (Review). *Exp Ther Med.* 2019; 17: 1024-1029.
65. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The Pharmacology and Clinical Use of *Methotrexate*. *N Engl J Med* 1983; 18: 1094-1104.
66. Torres RP, Santos FP, Branco JC. Methotrexate: implications of pharmacogenetics in the treatment of patients with Rheumatoid Arthritis. *ARP Rheumatology* 2022; 2: 225-229.
67. Coskun M, Steenholdt C, de Boer NK, Nielsen OH. Pharmacology and Optimization of Thiopurines and Methotrexate in Inflammatory Bowel Disease. Vol. 55, *Clin Pharmacokinet* 2015: 257–274.
68. Puig L. Methotrexate: New Therapeutic Approaches. *Actas Dermosifiliogr.* 2014; 105: 583-589.
69. Roubille C, Richer V, Starnino T, McCourt C, McFarlane A, Fleming P, et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 480–489.
70. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an old drug with new tricks. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20.

71. Montarello NJ, Nguyen MT, Wong DTL, Nicholls SJ, Psaltis PJ. Inflammation in Coronary Atherosclerosis and Its Therapeutic Implications. *Cardiovasc Drugs Ther* 2022; 36: 347–362.
72. Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol* 2018; 233: 2116–2132.
73. Li J, Wang Y, Wang Y, Wen X, Ma XN, Chen W, et al. Pharmacological activation of AMPK prevents Drp1-mediated mitochondrial fission and alleviates endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 86: 62–74.
74. Suresh P, Salem-Bekhit MM, Veedu HP, Alshehri S, Nair SC, Bukhari SI, et al. Development of a Novel Methotrexate-Loaded Nanoemulsion for Rheumatoid Arthritis Treatment with Site-Specific Targeting Subcutaneous Delivery. *Nanomaterials*. 2022; 12.
75. Saleem MU, Muhammad F, Sharif A, Arshad MI, Akhtar K, Javed Y, et al. Methotrexate-loaded biodegradable nanoparticles exert anti-arthritis effect by downregulating pro-inflammatory cytokines in Freund's complete adjuvant-induced arthritic rats. *Inflammopharmacology*. 2022; 30: 1079–1091.
76. Maranhão RC, Guido MC, de Lima AD, Tavares ER, Marques AF, de Melo MDT, et al. Methotrexate carried in lipid core nanoparticles reduces myocardial infarction size and improves cardiac function in rats. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 3767–3784.
77. Pepineli R, Santana AC, Silva FMO, Tavoni TM, Stolf NAG, Noronha IL, et al. Use of paclitaxel carried in lipid nanoparticles to treat aortic allograft transplantation in rats. *J. Pharm. Pharmacol*. 2021; 73: 1092–1100.
78. Guido MC, Lopes N de M, Albuquerque CI, Tavares ER, Jensen L, Carvalho P de O, et al. Treatment With Methotrexate Associated With Lipid Core Nanoparticles Prevents Aortic Dilation in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Front Cardiovasc Med*. 2022; 9.
79. Maranhão RC, Cesara TB, Pedroso-Madani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic Behavior in Rats of a Nonprotein Microemulsion Resembling Low-Density Lipoprotein. *Lipids* 1993; 28.
80. Mello SBV, 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: 443–449.
81. Bulgarelli A, Leite ACA, Dias AAM, Maranhão RC. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to ldl receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther* 2013; 27: 531–539.
82. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol*. 2000; 95: 208-214.
83. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima ARR, et al. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016.
84. Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2018; 17.
85. Lang RM, Badano LP, Victor MA, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015; 28.
86. Martinez PF, Okoshi K, M Zornoff LA, Oliveira Jr SA, S Campos DH, R Lima AR, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol* 2011; 111: 543–551.
87. Hentschke VS, Capalonga L, Rossato DD, Perini JL, Alves JP, Quagliotto E, et al. Functional capacity in a rat model of heart failure: impact of myocardial infarct size. *Exp Physiol* 2017; 102:1448–1458.
88. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *ABC Cardiol* 2016; 106: 62–69.
89. Davis BK, Wen H, Ting JPY. The Inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 707–735.

90. Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 2008; 117: 2670–2683.
91. Van Hout GPJ, Bosch L, Ellenbroek GHJM, De Haan JJ, Van Solinge WW, Cooper MA, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2017; 38: 828–836.
92. Gao R, Shi H, Chang S, Gao Y, Li X, Lv C, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces myocardial fibrosis and improves cardiac remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Int Immunopharmacol.* 2019; 74.
93. Everett BM, Cornel JH, Lainscak M, Anker SD, Abbate A, Thuren T, et al. Anti-inflammatory therapy with canakinumab for the prevention of hospitalization for heart failure. *Circulation.* 2019; 139: 1289–1299.
94. Fujisue K, Sugamura K, Kurokawa H, Matsubara J, Ishii M, Izumiya Y, et al. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ J* 2017; 81: 1174–1182.
95. Deftereos S, Giannopoulos G, Angelidis C, Alexopoulos N, Filippatos G, Papoutsidakis N, et al. Anti-inflammatory treatment with colchicine in acute myocardial infarction: A pilot study. *Circulation.* 2015; 132:1395–1403.
96. Xie F, Chen L, Yun H, Levitan EB, Curtis JR. Benefits of methotrexate use on cardiovascular disease risk among rheumatoid arthritis patients initiating biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *J Rheumatol* 2021; 48: 804–812.
97. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, et al. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Rheumatology.* 2010; 49: 295–307.
98. Ahlers MJ, Lowery BD, Farber-Eger E, Wang TJ, Bradham W, Ormseth MJ, et al. Heart failure risk associated with rheumatoid arthritis–related chronic inflammation. *J Am Heart Assoc* 2020; 9
99. Wang R, Neuenschwander FC, Nascimento BR. Inflammation post-acute myocardial infarction: “doctor or monster.” *ABC Cardiol* 2020; 115: 1112–1113.
100. Moreira DM, Lueneberg ME, Da Silva RL, Fattah T, Gottschall CAM. Methotrexate Therapy in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2017; 22: 538–545.
101. Dannenberg L, Trojovský K, Ayhan A, Helten C, Zako S, M’Pembele R, et al. MTX Treatment Does Not Improve Outcome in Mice with AMI. *Pharmacology.* 2021; 106: 225–231.
102. Gomes FLT, Maranhão RC, Tavares ER, Carvalho PO, Higuchi ML, Mattos FR, et al. 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: 561–569.
103. You Z, Huang X, Xiang Y, Dai J, Xu L, Jiang J, et al. Ablation of NLRP3 inflammasome attenuates muscle atrophy via inhibiting pyroptosis, proteolysis and apoptosis following denervation. *Theranostics.* 2023; 13: 374–390.
104. Butts B, Butler J, Dunbar SB, Corwin E, Gary RA. Effects of Exercise on ASC Methylation and IL-1 Cytokines in Heart Failure. *Med Sci Sports Exerc.* 2018; 50: 1757–1766.
105. Li B, Xu L, Liu J, Zhou M, Jiang X. Phloretin ameliorates heart function after myocardial infarction via NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling. *Biomed Pharmacother* 2023; 165.
106. Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, et al. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 425: 162–168.
107. Bauernfried S, Hornung V. Human NLRP1: From the shadows to center stage. *Journal of Experimental Medicine.* 2021; 219.
108. Zhong FL, Mamaï O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell.* 2016; 167: 187–202.
109. Drutman SB, Haerynck F, Zhong FL, Hum D, Hernandez NJ, Belkaya S, et al. Homozygous NLRP1 gain-of-function mutation in sibs with a syndromic form of recurrent respiratory papillomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116:19055– 19063.

110. Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan KY, Lim C, Harapas CR, et al. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *Journal of Biological Chemistry*. 2018; 293: 18864–18878.
111. Zong J, Zhang H, Li F fang, Liang K, Liu J li, Xu L hong, et al. NLRP1 promotes TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation in neonatal rat cardiac fibroblasts. *J Mol Histol*. 2018; 49: 509–518.
112. Zong J, Li FF, Liang K, Dai R, Zhang H, Yan L, et al. Nuclear Localization Leucine-Rich-Repeat Protein 1 Deficiency Protects Against Cardiac Hypertrophy by Pressure Overload. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018; 48: 75–86.
113. Cao L, Chen Y, Zhang Z, Li Y, Zhao P. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced NLRP1 Inflammasome Activation Contributes to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Shock*. 2019; 51: 511–518.
114. Onódi Z, Ruppert M, Kucsera D, Sayour AA, Tóth VE, Koncsos G, et al. AIM2-driven inflammasome activation in heart failure. *Cardiovasc Res* 2021;117: 2639–2651.
115. Gielen S, Adams V, Möbius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 861–868.
116. Goto H, Inoue A, Piao L, Hu L, Huang Z, Meng X, et al. Proliferin-1 Ameliorates Cardiotoxin-Related Skeletal Muscle Repair in Mice. *Stem Cells Int*. 2021; 2021.
117. Ouyang W, O’Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*. Cell Press 2019; 50: 871–891.
118. Markousis-Mavrogenis G, Baumhove L, Al-Mubarak AA, Aboumsallem JP, Bomer N, Voors AA, et al. Immunomodulation and immunopharmacology in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2023; 21: 119-149.
119. Goswami SK, Ranjan P, Dutta RK, Verma SK. Management of inflammation in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*. 2021; 173.
120. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriolo B, STRAUB RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 729–735.
121. Popkova1’’ T V, Novikova1 DS, Gasparyan2 AY, Nasonov1 EL. Cardiovascular Effects of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Revisited. *Curr Med Chem* 2015; 22: 1903-1910.
122. Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BAC, Aarden LA. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2003; 42: 1189–1196.
123. Kuroiwa Y, Takakusagi Y, Kusayanagi T, Kuramochi K, Imai T, Hirayama T, et al. Identification and Characterization of the Direct Interaction between Methotrexate (MTX) and High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein. *PLoS One*. 2013; 8.
124. Pang Z, Wang G, Ran N, Lin H, Wang Z, Guan X, et al. Inhibitory effect of methotrexate on rheumatoid arthritis inflammation and comprehensive metabolomics analysis using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS). *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 2894 – 2916.
125. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 2016; 65: 535–550.
126. Yu Y, Fuscoe JC, Zhao C, Guo C, Jia M, Qing T, et al. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nat Commun*. 2014; 5: 3230.