

**Microvesículas Derivadas do Sistema Nervoso Central e a Indução da Resposta Inflamatória Sistêmica:
Estudo Experimental**

Central Nervous System-Derived Microvesicles and the Induction of Systemic Inflammatory Response:
Experimental Study

Pauline Souza Effting¹, Elizabeth Cadini¹, Diogo Dominguini¹, Felipe Dal Pizzol¹

¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma/SC, Brasil

ID ORCID

- Pauline Souza Effting: 0000-0002-1746-8289

- Diogo Dominguini: 0000-0002-5232-3026

- Felipe Dal Pizzol: 0000-0003-3003-8977

Autor correspondente:

Felipe Dal Pizzol, Md, PhD

Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 1105. Criciúma/SC, Brasil.

CEP: 88806-000

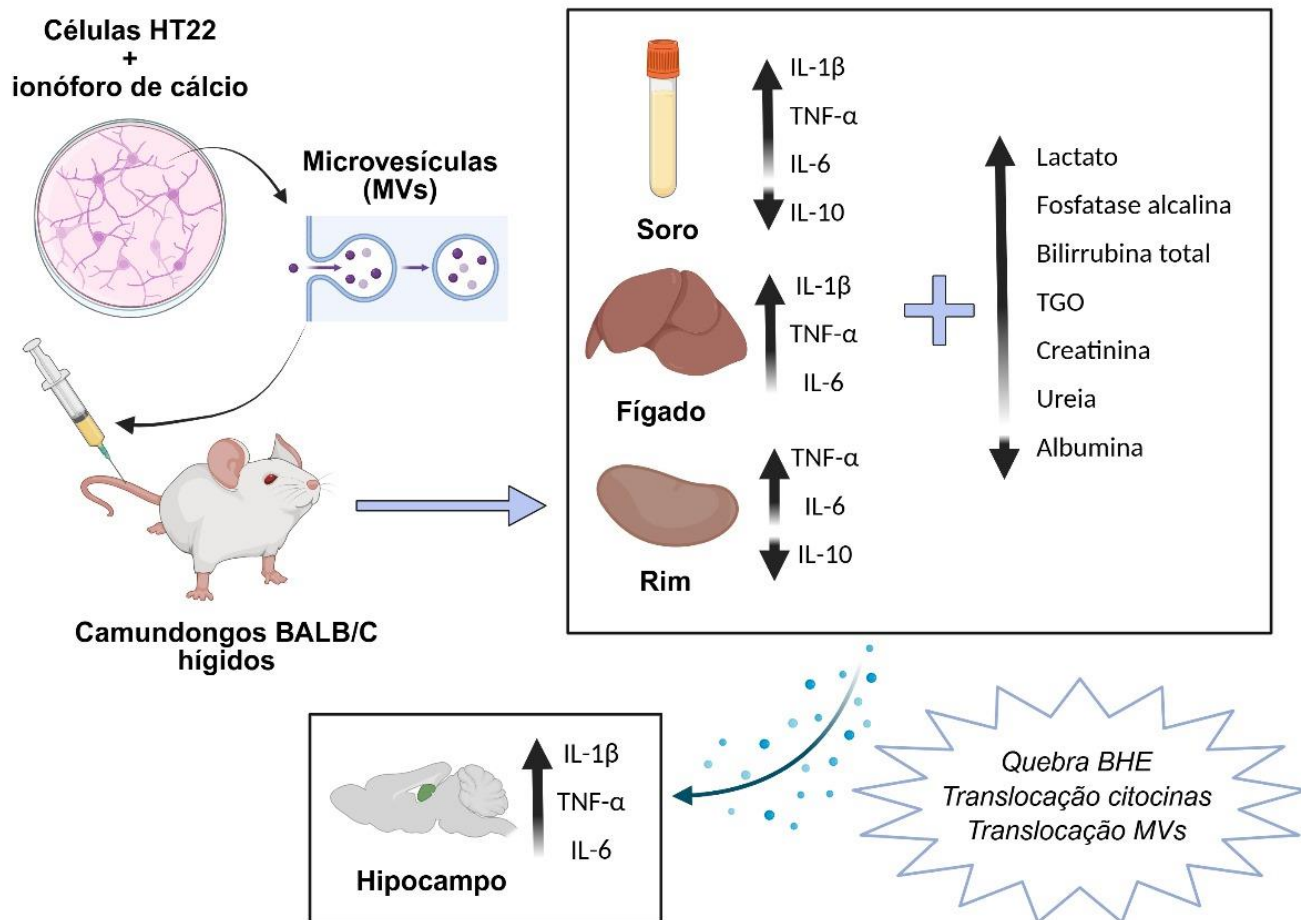
E-mail: fdpizzol@gmail.com

Resumo

As microvesículas extracelulares (MVs) têm sido reconhecidas como mediadoras de processos inflamatórios sistêmicos. Elas atuam como vetores de sinalização intercelular, transportando proteínas inflamatórias, ácidos nucleicos e lipídeos bioativos que modulam a resposta imune tanto local como à distância. Este estudo avaliou o potencial inflamatório de MVs derivadas de culturas de células hipocâmpais expostas a estímulo inflamatório, injetadas periféricamente em camundongos previamente hígidos. Foram analisadas citocinas séricas e teciduais (fígado, rim e hipocampo), bem como marcadores bioquímicos de disfunção orgânica. Os animais que receberam as MVs, especialmente nas doses intermediária e alta, apresentaram aumento significativo de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no soro, acompanhado de queda nos níveis de IL-10. Também houve elevação de lactato e fosfatase alcalina, sugerindo inflamação sistêmica precoce. No tecido hepático, observou-se um padrão inflamatório exuberante, compatível com disfunção orgânica, evidenciada por hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia e aumento de transaminases. Alterações semelhantes foram encontradas no rim, com elevação de ureia e creatinina. Por fim, foi identificado aumento de citocinas no hipocampo, mesmo sem aplicação intracerebral direta, sugerindo possível translocação de MVs ou sinalização inflamatória cruzada entre periferia e sistema nervoso central. Os dados sustentam que MVs derivadas de células neuronais inflamadas são capazes de desencadear inflamação sistêmica e dano orgânico em animais previamente saudáveis. Esses achados reforçam a relevância de se investigar, em modelos clínicos, a presença e o papel de MVs derivadas do SNC na sepse, especialmente em pacientes com manifestações neurológicas, como o delirium.

Palavras-chave: Microvesículas extracelulares, cérebro-periferia, inflamação sistêmica, disfunção orgânica.

Resumo Gráfico



Resumo Gráfico. Células HT22 – células hipocâmpais. MV's – microvesículas. IL-1 β – Interleucina -1 beta; TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6 – Interleucina-6; IL-10 – Interleucina- 10; BHE – barreira hematoencefálica. Fonte: autores.

Introdução

Nas últimas décadas, a sobrevida de pacientes criticamente enfermos aumentou graças a estratégias de suporte avançado e monitorização intensiva; entretanto, essa vitória clínica revelou um novo desafio: os sobreviventes frequentemente carregam sequelas cognitivas, emocionais e funcionais de longa duração [1–5]. Entre as síndromes críticas, a sepse continua sendo a principal causa de internação em unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras, ocupando cerca de um terço dos leitos e mantendo taxas de mortalidade próximas de 50 % [6, 7]. Esse impacto epidemiológico reforça a importância de entender como a resposta inflamatória sistêmica se estende além da fase aguda e compromete o sistema nervoso central (SNC).

A fisiopatologia séptica é moldada por uma ativação imune desregulada que, ao mesmo tempo em que tenta controlar o agente infeccioso, desencadeia a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias em cascata. Estas moléculas sinalizadoras produzidas principalmente por linfócitos, macrófagos e células dendríticas, desempenham papel crucial nessas respostas, além de regular processos como proliferação, diferenciação e mobilidade celular [8, 9]. Em sua relação com o SNC, a sepse geralmente é revelada pela disfunção cerebral ou pela associação com essa, caracterizada por alteração da consciência variando de delirium a coma, convulsão ou sinais neurológicos focais. Sua fisiopatologia envolve um processo isquêmico secundário ao comprometimento da perfusão cerebral e seus determinantes, e um processo neuroinflamatório que inclui ativação endotelial, alteração da barreira hematoencefálica e passagem de mediadores neurotóxicos [10, 11]. Essa disfunção cerebral está associada ao aumento da mortalidade, morbidade e incapacidade cognitiva a longo prazo [11].

Durante a internação em UTI, o delirium é uma forma muito comum de disfunção cerebral aguda, a qual vem sendo fortemente associada à mortalidade [11, 12] e pode estar associada ao dano cognitivo em longo prazo [3]. Os fatores que estão associados à ocorrência de delirium em UTI são diversos, os quais podem, de forma independente, contribuir para a neurodegeneração em longo prazo [13–16]. Entretanto, os mecanismos pelos quais o delirium predispõe a aumento de mortalidade não são bem esclarecidos.

Um mecanismo relevante que explica a comunicação entre órgãos é a formação de microvesículas (MVs). MVs são fragmentos de células cobertas por bicamada lipídica que variam em diâmetro de 100 nm a 1 µm e são liberadas no ambiente extracelular por vários tipos de células, tipicamente durante a ativação ou morte celular por necrose ou apoptose. As MVs são mediadores inflamatórios que podem servir como veículos para a transferência intercelular de membranas e proteínas citosólicas, lipídios e RNA localmente ou a longas distâncias, e podem ser encontradas como um evento final comum em várias condições inflamatórias, assim como a sepse [17].

Os efeitos de MV durante o desenvolvimento de sepse já foram descritos [18]. A sepse está associada a uma liberação maciça de MVs derivados de leucócitos com grande conteúdo de DNA, histonas e outros componentes que contribuem para o ambiente pró-coagulante observado em seu desenvolvimento [19]. Além destas, MVs derivadas de plaquetas, células endoteliais e eritrócitos já foram descritas, apresentando diferentes papéis no desenvolvimento da doença [20, 21].

Mais recentemente foram descritas MVs derivadas do SNC (BDMVs) evidenciando que neurônios, astrócitos e a micróglia podem liberar MVs em condições normais e patológicas, contribuindo assim para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias. Neste contexto, MVs microgliais e astrocitárias armazenam e liberam IL-1 β , uma interleucina chave na cascata inflamatória, além de estimular a liberação desta citocina por células da glia [22].

Além disso, estudos recentes demonstraram que a administração periférica de BDMVs em animais hígidos é capaz de induzir desfechos clínicos e bioquímicos graves, mesmo na ausência de patógeno. Um destes modelos é baseado no traumatismo cranioencefálico (TCE), demonstrando que BDMVs provenientes deste trauma causam vasoconstrição cerebral e hipoperfusão. Posteriormente, a aplicação periférica destas MVs em animais saudáveis levou à morte súbita em até 6h, com as MVs transmigando através das paredes dos vasos, induzindo vasoconstrição rápida por influxo de cálcio nas células musculares lisas vasculares e reduzindo o fluxo sanguíneo cerebral, reforçando seu potencial tóxico vascular [23]. De forma semelhante, foi observado que BDMVs isoladas de cérebros de animais sépticos induziram inflamação sistêmica, coagulopatia e apoptose em múltiplos órgãos quando injetadas em ratos hígidos, demonstrando que o conteúdo dessas vesículas é capaz de perpetuar danos mesmo fora do SNC [24].

Apesar de confirmarem o potencial inflamatório e sistêmico das vesículas extracelulares de origem cerebral, esses estudos utilizaram modelos nos quais o cérebro já havia sofrido dano primário — seja infeccioso ou traumático. No presente trabalho, buscou-se investigar se microvesículas extracelulares obtidas de culturas neuronais — sem lesão física, infecciosa ou sistêmica prévia — seriam capazes de desencadear uma resposta inflamatória sistêmica em animais previamente hígidos.

Com base no pressuposto o presente estudo teve o objetivo de determinar se a injeção de microvesículas derivadas de células hipocâmpais podem levar à inflamação sistêmica e disfunções orgânicas similares às que são observadas na sepse.

Materiais e Métodos

Cultura de células e isolamento das MVs

Células hipocâmpais HT22 de ratos foram semeadas em frascos de cultura celular de 75 cm² e mantidas a 37°C em um ambiente umidificado com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico em meio completo (DMEM) com 5% de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Devido ao crescimento exponencial desta linhagem celular (duplicação dos tempos entre 24h e 36h), as células foram semeadas a cada dois dias em novos frascos de cultura com meio completo fresco.

Após 7 dias em cultura, as células foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) e estimuladas com 15 µM do ionóforo de cálcio A23187, que serviu como um substituto para lesão celular, por 30 min a 37°C [25]. Para isolamento das MVs, os meios de cultura das células incubadas ou não com o ionóforo foram coletados, centrifugados a 16.000 g por 10 minutos, e ressuspensos em solução salina (500 uL). A concentração proteica do pellet foi utilizada para padronização das doses administradas aos animais (5×10⁴, 10×10⁴ e 50×10⁴ MV/µL), representando, portanto, a carga proteica associada às vesículas isoladas.

Animais e Aspectos Éticos

Previamente a quaisquer intervenções descritas abaixo todos os procedimentos foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC (protocolo 47/2024).

Vinte camundongos BALB/c machos e fêmeas (90 dias de idade, 20-25 g) foram alojados coletivamente em gaiolas em um ciclo claro/escuro de 12/12 h a 22 °C, com água e ração *ad libitum* durante todo o protocolo de estudo. Os animais foram aleatoriamente randomizados em grupo controle e grupos microvesículas (MVs), totalizando 4 grupos (n=5 por grupo): (1) Controle injetado com salina; (2) Grupo ativo MVs – injetado com microvesículas geradas de células neuronais cultivadas em meio usual na concentração de $5 \times 10^4/\mu\text{L}$; (3) Grupo ativo MV – injetado com microvesículas geradas de células neuronais cultivadas em meio usual na concentração de $10 \times 10^4/\mu\text{L}$ (4) Grupo ativo MV – injetado com microvesículas geradas de células neuronais cultivadas em meio usual na concentração de $50 \times 10^4/\mu\text{L}$.

O tamanho amostral foi baseado no Método da Equação de Recursos (*Resource Equation Method*), amplamente utilizado para cálculos em estudos com animais [26]. Considerando quatro grupos experimentais e uma única medição por animal, o número recomendado de animais por grupo varia entre 4 e 6. Essa inferência é baseada na análise de variância (ANOVA) de uma via, utilizada para comparação entre os grupos.

Transferência MVs para animais

A administração das microvesículas cultivadas em cultura celular foi realizada nos animais pela veia caudal em aplicação única derivada do meio de cultura derivado de células expostas ao ionóforo na concentração previamente estipulada por grupo ($5 \times 10^4/\mu\text{L}$, $10 \times 10^4/\mu\text{L}$ ou $50 \times 10^4/\mu\text{L}$) em um volume final de 0,5mL. Já os animais do grupo controle, com intuito de passaram pelo mesmo procedimento e mobilização, foram injetados com 0,5 mL de solução derivada do meio de células não incubadas com o ionóforo, contendo basicamente solução salina. Para imobilização dos animais durante o procedimento foi utilizada anestesia inalatória de isoflurano (DCB nº 26675-46-7) a 1,5% por 5 min.

Coleta de sangue, tecidos e processamento das amostras

A coleta de sangue (200 μL) foi realizada logo após a morte dos animais, uma única vez, por punção cardíaca. Após cada coleta de sangue as amostras foram centrifugas a 2.200 rotações por minuto (rpm), equivalente a 600 x g, durante 10 minutos em temperatura ambiente, e coletado o sobrenadante (soro) para análises. Os tecidos foram dissecados e homogeneizados em tampão de lise (135mM NaCl, 1mM MgCl₂, 2.7mM KCl, 20mM Tris base [pH 8], 1% Triton, 10% Glicerol, 10.27mM Na₃VO₃, 3.5mM PMSF, 1 μM aprotinina, 10mM Na₄P₂O₇). O lisado foi centrifugado por 15min (4°C) a 12.000 rpm, retirado o sobrenadante. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posteriores análises.

Eutanásia

Após o término do estudo (24h de aplicação das microvesículas) os animais foram sacrificados por sobredose de isoflurano (3-5%) empregada em caixa de indução. A coleta de sangue (200 μL) foi realizada logo após a morte dos animais, uma única vez, por punção cardíaca. Após a morte dos animais, os mesmos foram acondicionados em sacos identificados como “lixo infectante” (no máximo 20 animais por saco) e levados ao freezer de resíduos localizado no Biotério da mesma Instituição.

Análises bioquímicas

Análise de citocinas – ELISA

Para as análises dos níveis de citocinas no soro e tecidos foi realizado o imuno ensaio ELISA através de kits da marca BioRad®. Para o perfil pró-inflamatório, foram analisadas as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6. Já para análises de perfil anti-inflamatório, a citocina IL-10. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante, como detalhado abaixo.

Os anticorpos de captura foram diluídos em solução salina (PBS), adicionados em cada poço da placa e incubados *overnight*, na temperatura de 4 °C. Após este período, os poços foram lavados tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7,2). Posteriormente, as placas foram bloqueadas com 200 μ L de solução de bloqueio (1% de albumina bovina sérica (BSA) em PBS, pH 7,2) e incubadas. Após a incubação e as lavagens, 5 μ L de amostra e/ou padrões diluídos previamente em solução padrão de diluição (0,05% de Tween 20; 0,1% de BSA em PBS, pH 7,2) foram adicionados aos poços. As placas foram cobertas e novamente incubadas *overnight*. Após este período, os poços foram lavados e foram adicionados 100 μ L dos anticorpos de detecção específicos, previamente diluídos em solução padrão de diluição. As placas foram incubadas por mais duas horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e após o processo foi adicionado 100 μ L do polímero estreptavidina peroxidase e as placas foram cobertas por papel alumínio e incubadas durante 30 minutos. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com o tampão de lavagem e 100 μ L da solução substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina foram adicionados, seguido de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de solução de ácido clorídrico 2 N sobre os poços. Ao final, a coloração foi lida em espectrofotômetro a 450nm. Os resultados de soro foram expressos em pg/mL de soro, e os de tecidos, em pg/mL de proteína.

Determinação dos níveis de proteína

Os níveis de proteínas foram determinados utilizando o método Bradford [27], baseado na absorbância (595nm) da alteração da coloração do corante Coomassie brilliant blue G-250, o qual tem sua coloração vermelha convertida em azul quando em ligação com a proteína da amostra. Os padrões para a técnica de Bradford foram obtidos pela diluição de um estoque de albumina bovina sérica (BSA). Para determinar a concentração proteica foi utilizado o cálculo de regressão linear baseado em uma curva padrão de BSA variando de 2 ug/mL a 12 ug/mL.

Análises hematológicas

Marcadores de disfunção de órgãos lactato, fosfatase alcalina (FA), albumina, bilirrubina total, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO/AST), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ALT), creatinina e ureia foram mensurados no soro usando kits disponíveis comercialmente (Labtest, Brasil).

Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados através da análise de variância ANOVA uma via (*one-way ANOVA*) sem medidas repetidas, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para os que não assumiram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Os dados

foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IIQ). Para a demonstração dos dados no *volcano plot* o valor de significância (eixo Y) foi demonstrado como o $-\log_{10}$ do valor de p de cada grupo obtido das análises citadas anteriormente. Para os valores representando magnitude (eixo X) foi aplicado a análise de *fold change* em relação ao grupo controle com posterior cálculo do $\log_2$ destes valores, demonstrado no gráfico como $\log_2$ do fold change relativo ao controle. Valores acima do 0 assumem aumento de grandeza em relação ao controle, bem como abaixo de 0 demonstram diminuição. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism versão 10.

Resultados

Efeito da aplicação das MVs no perfil de inflamação sérica

Após a aplicação na veia caudal do meio de cultura contendo microvesículas derivadas da cultura de células com ativação glial induzida observou-se aumento da concentração de interleucinas pró-inflamatórias dos grupos injetados com MVs em relação ao grupo que recebeu somente o veículo salina.

Estas alterações são observadas no aumento de IL-1 β (grupos $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ = $349,07 \pm 47,98$; $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ = $368,80 \pm 22,62$; $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ = $359,84 \pm 62,54$) *versus* grupo controle ($234,76 \pm 45,16$); nas concentrações de TNF- α no grupo tratado com a dose de $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($2.374,73 \pm 372,47$) comparado ao seu controle ($1.241,97 \pm 238,07$); bem como nos valores de IL-6, que teve um aumento significativo somente quando os grupos tratados nas doses de $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($262,75$ IIQ $91,84$) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($265,98$ IIQ $50,62$) foram comparados ao grupo controle ($145,94$ IIQ $16,68$) (Fig. 1A-C).

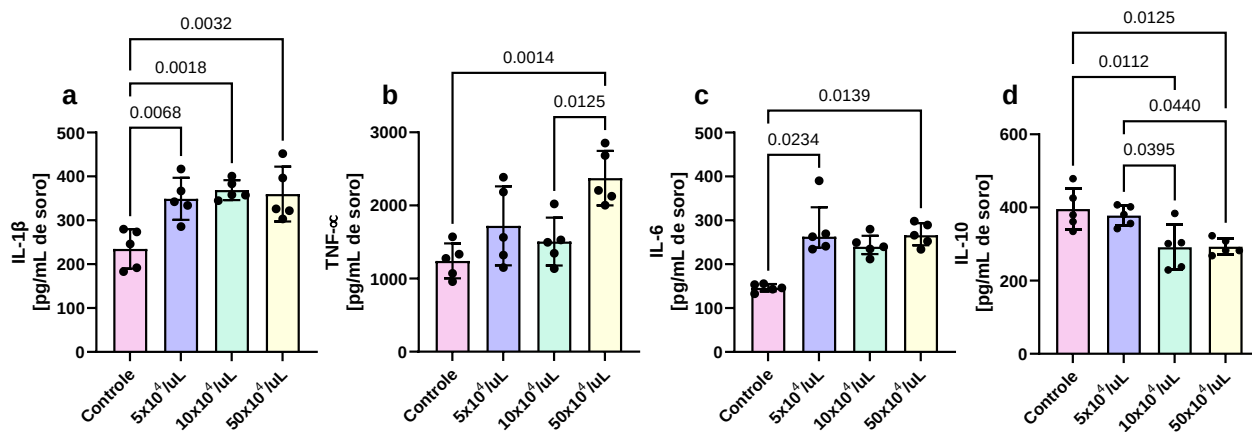


Fig.1 Efeito da aplicação exógena de microvesículas derivadas de cultura de células hipocâmpais expostas à ionóforo de cálcio, nas doses de $5 \times 10^4 \mu\text{L}$, $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$, na produção interleucinas séricas em camundongos previamente hígidos. (a) Interleucina-1 beta; (b) Fator de necrose tumoral-alfa; (c) Interleucina-6; (d) Interleucina-10. ANOVA uma via (*one-way* ANOVA) sem medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Tukey (a, b, d) com dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn (c) com dados expressos em mediana e intervalo interquartil (IIQ). Nível de significância: $p < 0,05$.

Já uma diferença expressiva entre os grupos experimentais inoculados com MVs somente foi observada por um aumento do TNF- α do grupo $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ quando comparado ao grupo $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($1.506,45 \pm 326,96$) (Fig. 1B).

Uma vez que as citocinas pró-inflamatórias expressaram aumentos significativos, foi analisado qual a resposta da concentração de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. As doses de $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($291,21 \pm 62,19$) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($292,81 \pm 22,17$) apresentaram redução significativa em comparação ao grupo controle ($395,97 \pm 57,02$). Também houve diferenças intragrupos nos animais expostos às MVs, onde aparentemente maiores doses parecem ter uma resposta anti-inflamatória sérica mais expressiva, com os grupos $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ apresentando uma maior diminuição quando comparados ao grupo de menor dose $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($377,61 \pm 28$) (Fig. 1D).

Efeito da aplicação das MVs em marcadores hematológicos de disfunção orgânica

Frente a marcadores hematológicos de dano e disfunção de órgãos e sistemas, foram observadas alterações em alguns parâmetros relacionados ao processo de inflamação sistêmica. O primeiro analisado foi o lactato sérico (Fig. 2A), com suas concentrações médias significativamente elevadas nos grupos tratados com $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($10,78 \pm 3,32$) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($13,27 \pm 1,58$) em comparação ao grupo controle ($3,63 \pm 0,98$). Na comparação entre os grupos inoculados com MVs, as concentrações de $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ foram significativamente maiores que a do grupo de $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($6,93 \pm 0,89$), sugerindo um efeito dose-dependente.

Já a fosfatase alcalina (Fig. 2B) apresentou comportamento semelhante ao observado para o marcador anterior, onde novamente os grupos $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($104,81 \pm 19,47$) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($100,17 \pm 32,46$) aumentaram em relação ao seu respectivo controle ($22,51 \pm 9,97$), e os grupos $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ tiveram um aumento em relação ao grupo de menor dose - $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($42,78 \pm 14,34$).

Já em relação ao fígado, foram avaliados parâmetros relacionados à integridade e funcionalidade hepática, incluindo albumina como indicador da capacidade de síntese proteica, bilirrubina total como parâmetro de metabolismo e excreção. Frente a isso, na análise de albumina foi evidenciado que maiores concentrações de MVs aplicadas aparentam ter uma relação diretamente proporcional à diminuição de seus valores séricos, fato somente observado no grupo $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($2,16 \pm 0,55$) em relação ao grupo salina ($4,38 \pm 0,71$) e ao grupo $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($4,33 \pm 1,35$) (Fig. 2C). Já a bilirrubina total teve aumento significativo em relação ao grupo controle ($0,28$ IIQ $0,43$) somente nas doses de $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($2,34$ IIQ $2,73$) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($2,15$ IIQ $0,87$), sem diferenças intragrupos MVs (Fig. 2D).

Na análise dos marcadores de lesão hepatocelular a TGO apresentou aumento nas aplicações de $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($51,62$ IIQ $40,13$) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($41,41$ IIQ $20,59$) quando comparado ao controle ($10,69$ IIQ $2,86$) (Fig. 2E). Já na TGP não houve diferença significativa entre os grupos (Fig. 2F).

Os últimos marcadores hematológicos observados buscaram analisar a resposta renal frente à aplicação das microvesículas. Assim, as concentrações de creatinina em doses mais elevadas de MVs (grupo $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ - $1,46 \pm 0,59$) apresentou aumento significativo tanto em relação ao grupo sham ($0,20 \pm 0,05$) quanto aos outros grupos MVs (grupo $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ - $0,59 \pm 0,15$); (grupo $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ - $0,45 \pm 0,25$) (Fig. 2G). Já as concentrações de ureia só aumentaram significativamente em relação ao grupo controle ($17,39 \pm 4,07$) na aplicação de dose intermediária de $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($44,57 \pm 17,33$) (Fig. 2H).

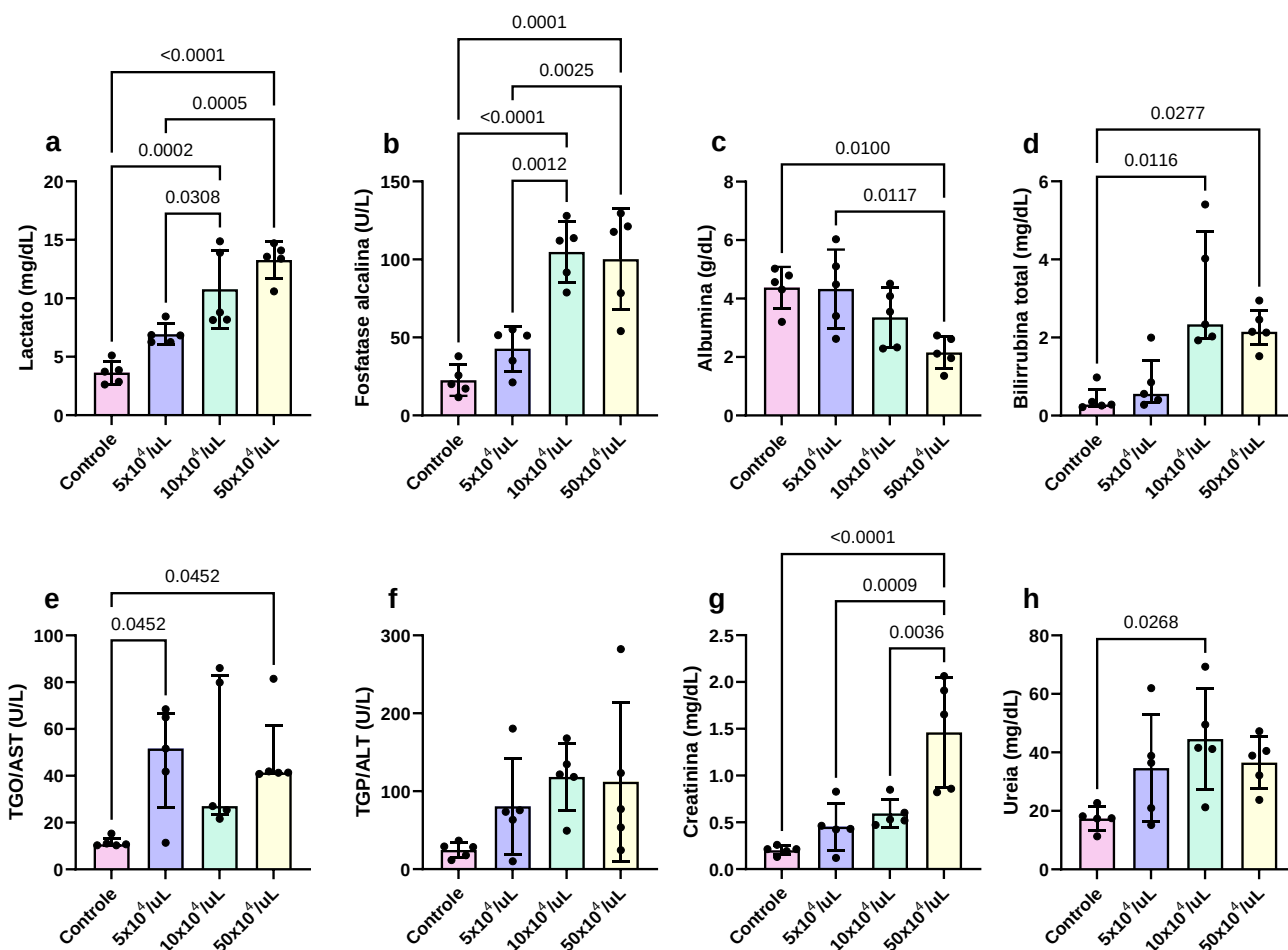


Fig.2 Efeito da aplicação exógena de microvesículas derivadas de cultura de células hipocâmpais expostas à ionóforo de cálcio nas doses de $5 \times 10^4 \mu\text{L}$, $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$, nos exames hematológicos relacionados a disfunção de órgãos em camundongos previamente hígidos. TGO/AST – Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP/ALT - Transaminase glutâmico-pirúvica. ANOVA uma via (*one-way ANOVA*) sem medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Tukey (a – c; f - h) com dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn (d e e) com dados expressos em mediana e intervalo interquartil (IIQ). Nível de significância: $p < 0,05$.

Efeito da aplicação das MVs nos tecidos-alvo

Quando realizada análise das citocinas pró-inflamatórias presentes no tecido hepático após a exposição às MVs o aumento em relação ao grupo salina ocorreu perante as interleucinas IL-1 β (controle – 0,12 IIQ 0,07) no grupo $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ (0,56 IIQ 0,23); TNF- α (controle – 62,71 IIQ 34,81) também grupo $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ (307,37 IIQ 176,08); e IL-6 (controle – 6,14 IIQ 2,08) nos grupos $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ (48,35 IIQ 5,77) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ (62,75 IIQ 29,11) (Fig. 3A-C). Não houve diferença significativa na resposta anti-inflamatória representada pela IL-10 (Fig. 3D).

Já no tecido renal o aumento da resposta pró-inflamatória ocorreu no TNF- α nos grupos $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ (249,05 IIQ 196,89) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ (235,42 IIQ 123,99) em comparação ao grupo controle (64,54 IIQ 15,56); e na IL-6, também nos grupos $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ (30,66 IIQ 10,85) e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ (31,56 IIQ 24,39) comparado aos animais que só receberam salina (6,40 IIQ 1,89) (Fig. 3F e G).

Diferentemente do fígado, a resposta anti-inflamatória de IL-10 sofreu alteração, porém esta, em relação aos animais controles ($169,09 \pm 35,67$) foi diminuída nos grupos $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($76,08 \pm 35,48$) e $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ ($71,16 \pm 26,32$), com seus valores aparentemente retornando próximos aos valores basais/grupo controle na dose maior de $50 \times 10^4 \mu\text{L}$.

($164,80 \pm 64,57$, evidenciando uma possível tentativa de compensação anti-inflamatória frente a um processo inflamatório mais importante (Fig. 3H).

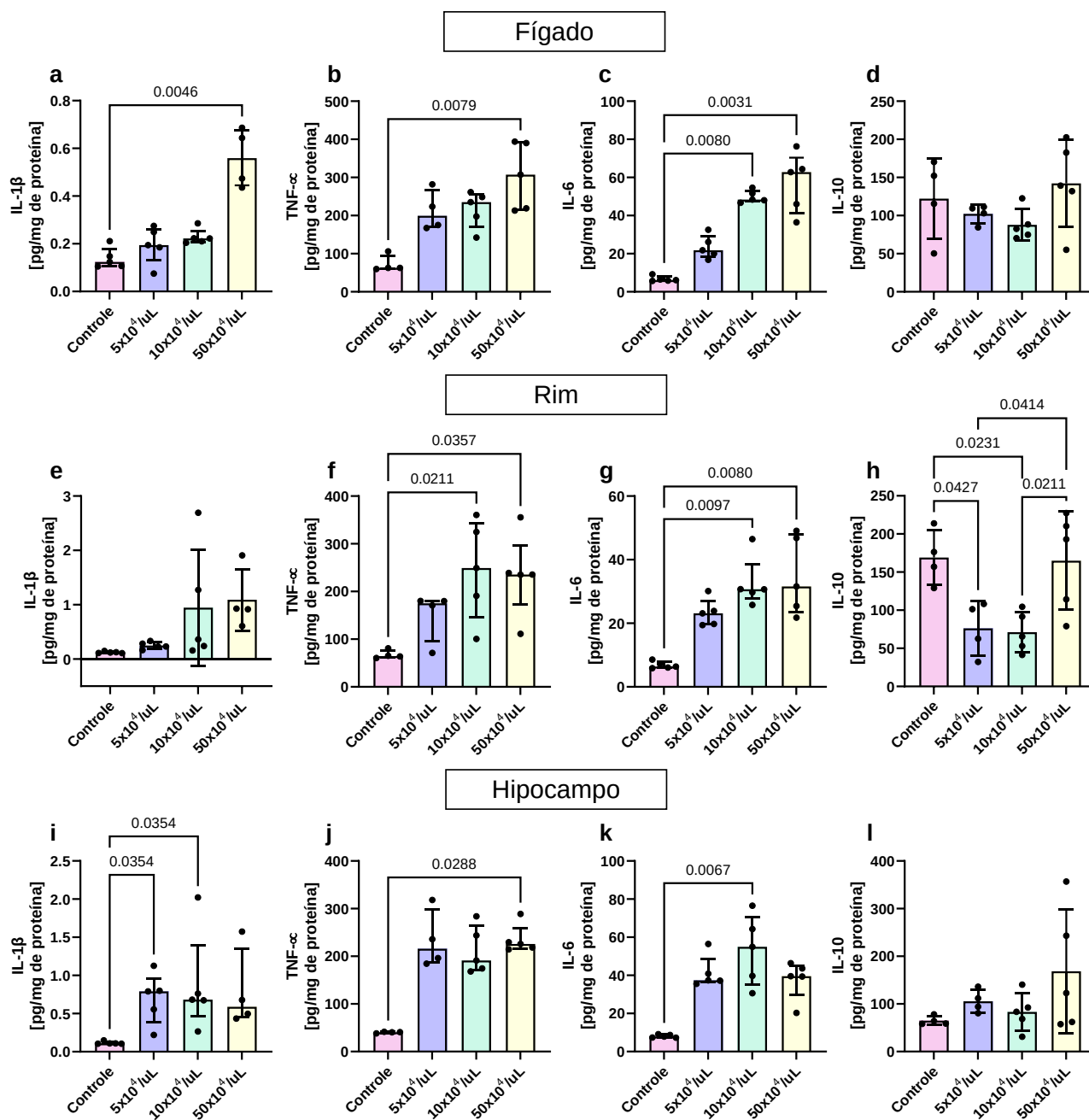


Fig.3 Efeito da aplicação exógena de microvesículas derivadas de cultura de células hipocâmpais expostas à ionóforo de cálcio, nas doses de $5 \times 10^4 \mu\text{L}$, $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ e $50 \times 10^4 \mu\text{L}$, na produção interleucinas teciduais de fígado, rim e sistema nervoso central (hipocampo) em camundongos previamente hígidos. (a, e e i) Interleucina-1 beta; (b, f e j) Fator de necrose tumoral-alfa; (c, g e k) Interleucina-6; (d, h e l) Interleucina-10. ANOVA uma via (*one-way ANOVA*) sem medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Tukey (d, e, h, l) com dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn (a, b, c, f, g, i, j, k) com dados expressos em mediana e intervalo interquartil (IIQ). Nível de significância: $p < 0,05$.

Por fim, investigou-se a possível disseminação da resposta inflamatória para o SNC por meio da análise das mesmas citocinas no hipocampo, com elevação observada em todas elas. IL-1β apresentou aumento nos grupos $5 \times 10^4 \mu\text{L}$ (0,79 IIQ 0,57) e $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ (0,68 IIQ 0,92) quando comparadas ao controle (0,11 IIQ 0,02); TNF-α somente

na dose maior de $50 \times 10^4 \mu\text{L}$ (225,96 IIQ 42,81) versus controle (40,51 IIQ 2,44); e IL-6 na dose intermediária de $10 \times 10^4 \mu\text{L}$ (54,97 IIQ 35,25) em relação ao grupo sham (7,85 IIQ 1,61) (Fig. 3I-K). Não houve alteração significativa na resposta anti-inflamatória IL-10 neste tecido (Fig. 3L).

Visão geral da resposta inflamatória decorrente da aplicação periférica de MVs

Com o intuito de melhor observar todas as alterações inflamatórias deste estudo, o gráfico de *volcano plot* demonstra uma melhor visualização geral de toda a resposta de citocinas em ambos soro e tecidos. Esta visão demonstra que na análise de marcadores pró-inflamatórios do soro há um aumento em relação ao grupo controle de todas as citocinas analisadas, com destaque de significância para IL-1 β em todas as doses, IL-6 em doses de 5 e $10 \times 10^4 \mu\text{L}$, e TNF- α demonstrando representatividade somente na dose mais elevada (Fig. 4A). Isso demonstra que aparentemente a resposta inflamatória sistêmica no soro não está relacionado à grandeza do aumento desses marcadores, indicando que mesmo pequenas elevações já pode ser possível na ativação inflamatória.

Padrão diferente foi encontrado nos tecidos. Visivelmente existe uma maior magnitude de até 8 vezes em algumas respostas pró-inflamatórias, demonstrando que talvez as citocinas acumulem de forma diferente em diferentes órgãos. Porém vale ressaltar que nem todo aumento tem valor significativo quando comparado ao grupo controle. No fígado a resposta inflamatória caracterizou-se pelo aumento principalmente de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em doses altas de MVs (Fig. 4B). No tecido renal IL-6 e TNF- α em doses intermediária e alta destacaram-se como principais mediadores da resposta inflamatória (Fig. 4C).

E finalmente, uma análise a parte cabe para o tecido representante do SNC, já que a aplicação das MVs foi periférica. No hipocampo é possível analisar que uma resposta inflamatória é presente com atuação das três citocinas: IL-1 β na menor e maior dose, IL-6 na dose intermediária de $10 \times 10^4 \mu\text{L}$, e TNF- α com significância apenas na dose maior de $50 \times 10^4 \mu\text{L}$, sugerindo uma possível migração de interleucinas para o SNC, ou uma quebra de barreira hematoencefálica devido à inflamação sistêmica, ou até mesmo possível migração das MVs para o SNC. Cabe também ressaltar que, como nos outros tecidos, também não houve resposta compensatória anti-inflamatória mediada por IL-10 (Fig. 4D).

No geral, observa-se uma tendência de resposta inflamatória dose-dependente, com envolvimento marcante do soro e do fígado, e ativação seletiva do hipocampo e do rim, refletindo perfis distintos de sensibilidade à exposição aguda às MV's.

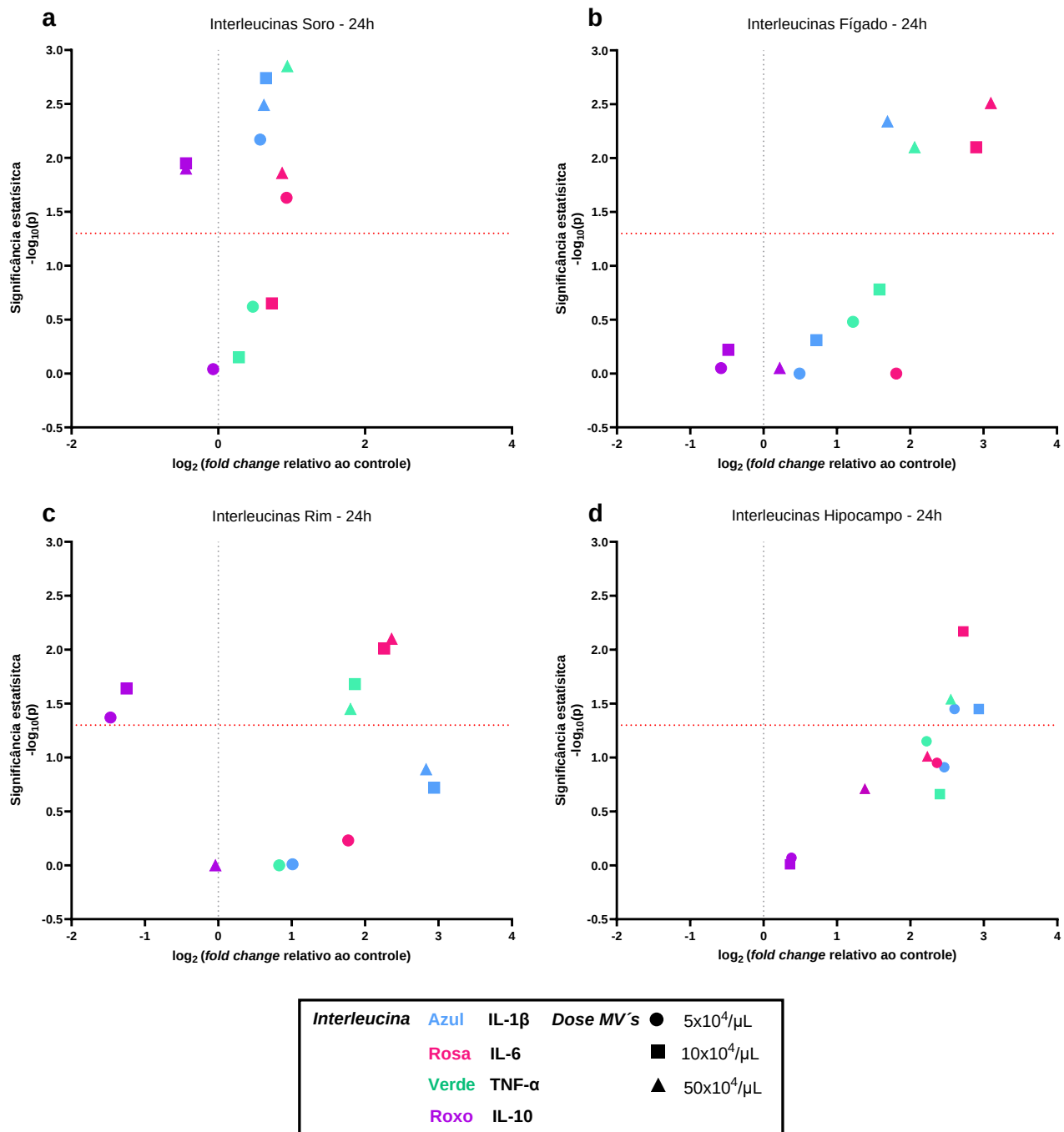


Fig. 4 Volcano plot representando a análise dos níveis relativos das citocinas IL-1 β (azul), IL-6 (rosa), TNF- α (verde) e IL-10 (roxo), 24 horas após a administração de MV's em animais previamente hígidos, com três diferentes concentrações: ● 5 $\times$ 10⁴ MV/ μ L, ■ 10 $\times$ 10⁴ MV/ μ L e ▲ 50 $\times$ 10⁴ MV/ μ L. (a) Soro; (b) Fígado; (c) Rim; (d) Hipocampo. Eixos X representam o log₂ a variação (*fold change*) em relação à média do grupo controle; eixos Y indicam o $-\log_{10}(p)$, refletindo a significância estatística da comparação. A linha pontilhada vermelha horizontal representa o limiar de significância estatística ($p = 0,05$).

Discussão

O papel de microvesículas e suas relações com a fisiopatologia de doenças vem sendo cada vez mais explorada por sua relação com doenças inflamatórias sistêmicas [28] como doenças cardiovasculares [29], câncer [30], artrite reumatoide [31], obesidade [32, 33], dentre outras. O foco deste estudo foi traçar um paralelo entre a inflamação sistêmica gerada pela presença periférica das MVs, por meio de uma possível interação cérebro-periferia,

e o papel das BDMVs nesta resposta inflamatória. Com base nisso, este trabalho buscou avaliar se microvesículas extracelulares obtidas de culturas neuronais inflamatórias são capazes de induzir uma inflamação sistêmica generalizada semelhante àquela observada em quadros de sepse.

Para tal, inicialmente se buscou avaliar a resposta à presença das MVs frente à produção de interleucinas séricas. Já é demonstrado na literatura que a relação molecular e bioquímica para este efeito inflamatório das MVs está baseada em sua estrutura e conteúdo. MVs são partículas diminutas provenientes da membrana celular, de aproximadamente 1µm de diâmetro, liberadas no espaço extracelular a partir de inúmeros tipos celulares como plaquetas, eritrócitos, células imunes, células do SNC, adipócitos, dentre outras [34]. Sua liberação ocorre tanto em processos fisiológicos como relacionados a quadros inflamatórios perante situações que envolvem ativação da via purinérgica, ativação plaquetária, ativação de células dendríticas por lipopolissacarídeos de membrana (LPS), ativação imune específica de células T por apresentadores de antígeno MHC II e aumento de cálcio intracelular [17].

As MVs utilizadas no modelo do presente estudo foram geradas a partir de cultura de células hipocâmpais através do aumento de cálcio intracelular. Estudos demonstram que essas MV's liberadas nesse contexto preservam características moleculares da célula de origem, incluindo receptores de membrana, proteínas inflamatórias, lipídios pró-inflamatórios, ácidos nucleicos regulatórios e antígenos de superfície [34]. Quando em locais diferentes do de origem, têm o potencial para interagir com células-alvo por meio da ativação de receptores já expressos na membrana, ou pela transferência de novos receptores, além da entrega de conteúdo proteico e genético à célula receptora [35]. Vale ressaltar que este conteúdo proteico inclui citocinas e quimiocinas que são importantes sinalizadores por intensificar a inflamação local e sistêmica [36]. Assim, todas estas comunicações das MVs com células-alvo têm o potencial de desencadear respostas imunes ou inflamatórias específicas [35, 36].

Esta comunicação com a periferia foi evidenciada neste estudo onde animais previamente hígidos, quando inoculados com as MVs, desenvolveram uma resposta inflamatória sistêmica, mesmo na ausência de patógenos, mensurada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α e IL-6 presentes no soro, bem como uma diminuição de IL-10 em doses mais altas de MVs. Já é bem descrito na literatura a participação destas moléculas no processo inflamatório [37–39], bem como no desenvolvimento e prognóstico da sepse [40–42]. Corroborando com as alterações agudas das citocinas na exposição de 24h neste trabalho, um estudo retrospectivo demonstrou que os níveis de IL-1β, IL-6 e IL-10 estavam aumentados na fase aguda da sepse em pacientes críticos e não críticos. Além disso, os níveis de IL-10 (dias 1, 2 e 4 da sepse) e IL-6 (dias 2 e 4) aumentaram em pacientes críticos em comparação com pacientes não críticos [43].

Outra participação da regulação das citocinas IL-1β no processo inflamatório é a presença de uma regulação positiva do receptor de IL-1 na membrana plasmática de leucócitos e, em particular, monócitos, de pacientes sépticos [44]. Inclusive, essa ativação foi relacionada positivamente com o escore de SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), demonstrando a severidade da condição. A mesma correlação positiva da elevação de IL-1 e TNF-α com critérios de avaliação da sepse foi encontrando em pacientes sépticos apresentando níveis elevados dos receptores sIL-1R2, sTNFR1 e sTNFR2 em comparação com indivíduos saudáveis, refletindo a expressão aumentada devido a ampliação do número de monócitos presentes na sepse [45].

Vale ressaltar que, embora o aumento de IL-10 esteja associado a um perfil imunossupressor e a pior prognóstico em pacientes sépticos [46], neste modelo — em que houve apenas uma ativação inflamatória induzida por microvesículas, sem a presença de patógeno — observou-se uma redução sérica nos níveis de IL-10. Esse achado

sugere que não houve ativação de uma resposta anti-inflamatória compensatória, indicando que a aplicação de MV's foi suficiente para induzir uma resposta inflamatória efetiva, sem desencadear mecanismos regulatórios protetores.

Com base na relevância clínica da disfunção orgânica como critério de gravidade em síndromes inflamatórias sistêmicas, como a sepse, este estudo também buscou avaliar marcadores bioquímicos relacionados à lesão e função de órgãos-alvo. Além dos marcadores de bilirrubina total e creatinina, incluídos no escore de SOFA [47] — ferramenta utilizada para analisar falência de múltiplos sistemas durante o diagnóstico da sepse — foram incluídos outros biomarcadores comumente utilizados na prática clínica e experimental para avaliação de disfunção hepática, renal e metabólica em contextos inflamatórios agudos.

Como marcadores iniciais da resposta inflamatória sistêmica, foram analisados os níveis de lactato e fosfatase alcalina. Ambos são tradicionalmente associados a quadros de inflamação generalizada e disfunção multissistêmica, e frequentemente utilizados como indicadores de gravidade em contextos críticos [48, 49].

O aumento do lactato no presente estudo, frente à aplicação de MVs nas doses intermediária e alta, reflete a ativação de vias metabólicas típicas de estados inflamatórios intensos, em que há predomínio da glicólise aeróbica e acúmulo de lactato como subproduto, mesmo na ausência de hipóxia estabelecida [50]. Esse perfil metabólico já foi descrito em contextos de inflamação sistêmica e sepse, e traduz uma resposta celular adaptativa, porém energeticamente desbalanceada [51], inclusive sendo alvo de melhora de dano neuronal, neuroinflamação e déficits comportamentais em camundongos com sepse induzida, quando inibida a produção de lactato pela supressão da lactato desidrogenase [52].

O mesmo comportamento também foi observado na fosfatase alcalina, também em doses mais elevadas de MVs, indicando um possível reflexo de ativação sistêmica mais robusta. Embora este marcador tenha sido inicialmente descrito como molécula de ação reguladora, capaz de neutralizar endotoxinas e atuar de forma protetora em processos inflamatórios [53], estudos recentes vêm demonstrando que sua elevação plasmática em quadros graves, como a sepse, está associada a maior disfunção orgânica e pior prognóstico. Em especial, a análise do índice APAR (*Alkaline Phosphatase-to-Albumin Ratio*), calculado pela razão entre os níveis de fosfatase alcalina e albumina sérica, demonstrou ser um preditor independente de mortalidade em pacientes sépticos [54].

Este índice está relacionado com quadros de hipoalbuminemia, também encontrado nos animais que receberam doses mais elevadas de MVs. Juntamente com aumentos dos níveis de bilirrubina total e aumento do TGO, uma resposta de disfunção hepática condizente com o padrão inflamatório sérico foi observado, com um aumento de 8 vezes das interleucinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 no tecido hepático. Esse desequilíbrio é compatível com os mecanismos clássicos de dano hepático mediados por citocinas [55–57].

Estudo semelhante, também com base na inoculação de MVs derivadas do SNC em animais previamente hígidos, avaliou dano de órgãos-alvo. Os animais saudáveis receberam MVs coletadas de tecido cerebral de animais com sepse induzida por LPS. A pesquisa demonstrou que o tecido hepático apresentou abundante exsudação inflamatória, sinusoides hepáticos congestionados, edema, hepatócitos desnaturados e estrutura celular desordenada [24]. Essa apresentação histológica corrobora com o processo inflamatório e alterações hematológicas da disfunção hepática encontradas na presente investigação, demonstrando que MVs isoladas de cultura de células neuronais tem um potencial inflamatório muito semelhante às MVs isoladas do tecido neuronal de animais submetidos a modelo de sepse.

O mesmo comportamento pode ser identificado no tecido renal. As MVs provenientes do SNC de animais sépticos foram capazes de induzir, nos animais previamente saudáveis, dilatação tubular renal, sangramento, infiltração leucocitária e degeneração vacuolar das células epiteliais tubulares com presença de necrose [24]. Padrão de alteração renal condizendo com aumento das interleucinas encontradas neste estudo nos animais que receberam MVs nas doses mais altas, acompanhado de um aumento significativo da creatinina e ureia séricas. Já é descrito na literatura que interleucinas como IL-6 e TNF- α , quando persistentemente elevadas, contribuem diretamente para lesão renal aguda, principalmente por mecanismos de necrose tubular e disfunção glomerular [58, 59]. Importante destacar que, em humanos, a elevação da creatinina no contexto séptico está associada a maior mortalidade e piores desfechos clínicos [60].

Por fim, chama atenção o aumento das citocinas pró-inflamatórias também no hipocampo, mesmo diante da administração periférica das MVs. Esse achado sugere que, de alguma forma, o estímulo inflamatório chegou ao SNC. Três mecanismos principais podem explicar esse fenômeno: (1) a quebra transitória da barreira hematoencefálica, já descrita em estados inflamatórios agudos; (2) a translocação de citocinas inflamatórias séricas para o SNC, amplamente documentada em modelos de sepse; ou ainda (3) a própria capacidade das MVs de atravessar a barreira hematoencefálica e atuar diretamente sobre células do parênquima cerebral [61–65]. O fato de as MVs terem sido derivadas de cultura de células hipocampais previamente ativadas pode ter facilitado sua sinalização com o tecido cerebral, favorecendo a ativação local da micróglia e a liberação secundária de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no hipocampo. Assim, mesmo sem lesão infecciosa ou traumática direta, foi possível demonstrar a ativação neuroinflamatória regional, indicando que o eixo cérebro-periferia é também uma via de mão dupla.

Conclusão

Os achados deste estudo demonstram que a aplicação periférica de microvesículas derivadas de culturas de células hipocampais é capaz de induzir uma inflamação sistêmica significativa, acompanhada por disfunção orgânica em múltiplos tecidos-alvo. A resposta inflamatória foi observada tanto no soro quanto em fígado, rim e hipocampo, com destaque para a magnitude e abrangência da resposta tecidual. A presença de citocinas pró-inflamatórias no SNC, mesmo sem lesão local, reforça a hipótese de comunicação cérebro-periferia mediada por MV's. Esses resultados sugerem que as microvesículas derivadas do SNC possuem potencial inflamatório importante e levantam a necessidade de futuras investigações clínicas que explorem sua presença em pacientes sépticos, especialmente aqueles com manifestações neurológicas, como o delirium.

Financiamento

Esta pesquisa contou com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc) e da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

Interesses Concorrentes

Os autores não têm interesses financeiros ou não-financeiros relevantes a divulgar.

Contribuição dos Autores

Concepção e desenho da pesquisa: Felipe Dal Pizzol. *Obtenção de dados:* Pauline Souza Effting, Elizabeth Cadini, Diogo Domingui, Felipe Dal Pizzol. *Análise e interpretação dos dados:* Pauline Souza Effting, Elizabeth Cadini. *Obtenção de financiamento:* Felipe Dal Pizzol. *Redação do manuscrito:* Pauline Souza Effting, Elizabeth Cadini. *Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual:* Pauline Souza Effting, Elizabeth Cadini, Felipe Dal Pizzol.

Disponibilidade dos Dados

Todos os dados gerados ou analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo publicado e disponíveis mediante solicitação.

Aprovação Ética

Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética da UNESC (Protocolo nº 47/2024) e seguiram o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do National Institutes of Health.

Referências

1. Barichello T, Sayana P, Giridharan V V., et al (2019) Long-Term Cognitive Outcomes After Sepsis: a Translational Systematic Review. *Mol Neurobiol* 56:186–251. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1048-2>
2. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM (2010) Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 304:1787–1794. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1553>
3. Girard TD, Jackson JC, Pandharipande PP, et al (2010) Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness. *Crit Care Med* 38:1513–1520. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181e47be1>
4. Jackson JC, Girard TD, Gordon SM, et al (2010) Long-term cognitive and psychological outcomes in the awakening and breathing controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 182:183–191. <https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0442OC>
5. Desai S V., Law TJ, Needham DM (2011) Long-term complications of critical care. *Crit Care Med* 39:371–379. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181fd66e5>
6. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, et al (2017) The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *Lancet Infect Dis* 17:1180–1189. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30322-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30322-5)
7. Machado FR, Cavalcanti AB, Braga MA, et al (2023) Sepsis in Brazilian emergency departments: a prospective multicenter observational study. *Intern Emerg Med* 18:409–421. <https://doi.org/10.1007/s11739-022-03179-3>
8. Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, et al (2019) Sepsis: Evolving concepts and challenges. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 52. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20198595>
9. Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C (2014) Septic encephalopathy: Does inflammation drive the brain crazy? *Revista Brasileira de Psiquiatria* 36:251–258. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1233>
10. Danielski LG, Giustina A Della, Badawy M, et al (2018) Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. *Mol Neurobiol* 55:1045–1053. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0356-7>
11. Ely EW, Shintani A, Truman B, et al (2004) Delirium as a Predictor of Mortality in Mechanically Ventilated Patients in the Intensive Care Unit. *JAMA* 291:1753–1762. <https://doi.org/10.1001/jama.291.14.1753>

12. Pisani MA, Kong SYJ, Kasl S V., et al (2009) Days of delirium are associated with 1-year mortality in an older intensive care unit population. *Am J Respir Crit Care Med* 180:1092–1097. <https://doi.org/10.1164/rccm.200904-0537OC>
13. Dubois MJ, Bergeron N, Dumont M, et al (2001) Delirium in an intensive care unit: A study of risk factors. *Intensive Care Med* 27:1297–1304. <https://doi.org/10.1007/s001340101017>
14. Pandharipande P, Shintani A, Peterson J, et al (2006) Lorazepam Is an Independent Risk Factor for Transitioning to Delirium in Intensive Care Unit Patients. *Anesthesiology* 104:21–27. <https://doi.org/10.1097/00000542-200601000-00005>
15. Cunningham C (2011) Systemic inflammation and delirium: Important co-factors in the progression of dementia. *Biochem Soc Trans* 39:945–953. <https://doi.org/10.1042/BST0390945>
16. Barichello T, Generoso JS, Goularte JA, et al (2015) Does infection-induced immune activation contribute to dementia? *Aging Dis* 6:342–348. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.0521>
17. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* 200:373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
18. Iba T, Ogura H (2018) Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. *J Intensive Care* 6. <https://doi.org/10.1186/s40560-018-0340-6>
19. Walenta KLH, Link A, Friedrich EB, Böhm M (2009) Circulating Microparticles in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 180:100–100. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.180.1.100>
20. Ogura H, Tanaka H, Koh T, et al (2004) Enhanced Production of Endothelial Microparticles with Increased Binding to Leukocytes in Patients with Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* 56:823–830. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000084517.39244.46>
21. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T (2008) Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83:536–545. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607373>
22. Bianco F, Perrotta C, Novellino L, et al (2009) Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO Journal* 28:1043–1054. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.45>
23. Wang J, Xie X, Wu Y, et al (2022) Brain-Derived Extracellular Vesicles Induce Vasoconstriction and Reduce Cerebral Blood Flow in Mice. *J Neurotrauma* 39:879–890. <https://doi.org/10.1089/neu.2021.0274>
24. Lin H, Chen H, Qi B, et al (2021) Brain-derived extracellular vesicles mediated coagulopathy, inflammation and apoptosis after sepsis. *Thromb Res* 207:85–95. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2021.09.014>
25. Tian Y, Salsbery B, Wang M, et al (2015) Brain-derived microparticles induce systemic coagulation in a murine model of traumatic brain injury Key Points. *Blood* 125:2151–2159. <https://doi.org/10.1182/blood>
26. Arifin WN, Zahiruddin WM (2025) APA: Sample size calculator (web). <http://wnarifin.github.io>. Accessed 14 Mar 2025
27. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
28. Huang X, Zhang S, Wang Z (2025) Therapeutic potential of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Extracellular Vesicle* 5:100058. <https://doi.org/10.1016/j.vesic.2024.100058>
29. Ohayon L, Zhang X, Dutta P (2021) The role of extracellular vesicles in regulating local and systemic inflammation in cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 170. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105692>
30. Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, et al (2024) Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther* 9. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1>
31. Burbano C, Rojas M, Muñoz-Vahos C, et al (2018) Extracellular vesicles are associated with the systemic inflammation of patients with seropositive rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36335-x>

32. Matilainen J, Berg V, Vaittinen M, et al (2024) Increased secretion of adipocyte-derived extracellular vesicles is associated with adipose tissue inflammation and the mobilization of excess lipid in human obesity. *J Transl Med* 22:. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05249-w>
33. Han Y, Ye S, Liu B (2024) Roles of extracellular vesicles derived from healthy and obese adipose tissue in inter-organ crosstalk and potential clinical implication. *Front Endocrinol (Lausanne)* 15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1409000>
34. Słomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, et al (2018) Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Front Immunol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02723>
35. Ratajczak MZ, Ratajczak J (2021) Innate Immunity Communicates Using the Language of Extracellular Microvesicles. *Stem Cell Rev Rep* 502–510. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10138-6> Published
36. Hosseinkhani B, Kuypers S, van den Akker NMS, et al (2018) Extracellular vesicles work as a functional inflammatory mediator between vascular endothelial cells and immune cells. *Front Immunol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01789>
37. van Loo G, Bertrand MJM (2023) Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol* 23:289–303. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00792-3>
38. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
39. Pyrillou K, Burzynski LC, Clarke MCH (2020) Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613170>
40. Yang J, Yang L, Wang Y, et al (2025) Interleukin-6 related signaling pathways as the intersection between chronic diseases and sepsis. *Mol Med* 31:34. <https://doi.org/10.1186/s10020-025-01089-6>
41. Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F (2022) Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. *Crit Care* 26. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03862-5>
42. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R (2013) Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated view. *Mediators Inflamm* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/165974>
43. Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, et al (2018) The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32275-8>
44. Supino D, Davoudian S, Silva-Gomes R, et al (2025) Monocyte-macrophage membrane expression of IL-1R2 is a severity biomarker in sepsis. *Cell Death Dis* 16. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07597-x>
45. Aksu MD, van der Ent T, Zhang Z, et al (2024) Regulation of plasma soluble receptors of TNF and IL-1 in patients with COVID-19 differs from that observed in sepsis. *Journal of Infection* 89. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106300>
46. Fabri A, Kandara K, Coudereau R, et al (2021) Characterization of Circulating IL-10-Producing Cells in Septic Shock Patients: A Proof-of-Concept Study. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615009>
47. Wang X, Guo Z, Chai Y, et al (2023) Application Prospect of the SOFA Score and Related Modification Research Progress in Sepsis. *J Clin Med* 12. <https://doi.org/10.3390/jcm12103493>
48. Nguyen HB, Loomba M, Yang JJ, et al (2010) Early lactate clearance is associated with biomarkers of inflammation, coagulation, apoptosis, organ dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *J Inflamm* 6. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-6>
49. Baek SD, Kang JY, Yu H, et al (2018) Change in alkaline phosphatase activity associated with intensive care unit and hospital length of stay in patients with septic acute kidney injury on continuous renal replacement therapy. *BMC Nephrol* 19. <https://doi.org/10.1186/s12882-018-1028-9>
50. Ratter JM, Rooijackers HMM, Hooiveld GJ, et al (2018) In vitro and in vivo Effects of Lactate on Metabolism and Cytokine Production of Human Primary PBMCs and Monocytes. *Front Immunol* 9:2564. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02564>

51. Nolt B, Tu F, Wang X, et al (2018) Lactate and Immunosuppression in Sepsis. *Shock* 49:120–125. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000958>
52. Du Y, Li Y, Ye F, et al (2025) Lactate exacerbates neuroinflammation in sepsis-associated encephalopathy via promoting neutrophil migration from skull bone marrow to the meninge. *Exp Neurol* 115318. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2025.115318>
53. Balabanova L, Bondarev G, Seitkalieva A, et al (2024) Insights into Alkaline Phosphatase Anti-Inflammatory Mechanisms. *Biomedicines* 12. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12112502>
54. Liu S, Zhao K, Shao C, et al (2024) Association between alkaline phosphatase to albumin ratio and mortality among patients with sepsis. *Sci Rep* 14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53384-7>
55. Zhang Z, Wang J, Li H, et al (2025) The role of the interleukin family in liver fibrosis. *Front Immunol* 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1497095>
56. Seki E, Schwabe RF (2015) Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology* 61:1066–1079. <https://doi.org/10.1002/hep.27332>
57. Tiegs G, Horst AK (2022) TNF in the liver: targeting a central player in inflammation. *Semin Immunopathol* 44:445–459. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00910-2>
58. Miranda AS, Cordeiro TM, Soares TM dos SL, et al (2017) Kidney-brain axis inflammatory cross-talk: From bench to bedside. *Clin Sci* 131:1093–1105. <https://doi.org/10.1042/CS20160927>
59. Ramesh G, Brian Reeves W (2002) TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *Journal of Clinical Investigation* 110:835–842. <https://doi.org/10.1172/JCI200215606>
60. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, et al (2017) Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med* 43:816–828. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4755-7>
61. Greene C, Connolly R, Brennan D, et al (2024) Blood–brain barrier disruption and sustained systemic inflammation in individuals with long COVID-associated cognitive impairment. *Nat Neurosci* 27:421–432. <https://doi.org/10.1038/s41593-024-01576-9>
62. Yang J, Ran M, Li H, et al (2022) New insight into neurological degeneration: Inflammatory cytokines and blood–brain barrier. *Front Mol Neurosci* 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1013933>
63. Galea I (2021) The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cell Mol Immunol* 18:2489–2501. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x>
64. Galea I (2021) The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cell Mol Immunol* 18:2489–2501. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x>
65. Gryka-Marton M, Grabowska AD, Szukiewicz D (2025) Breaking the Barrier: The Role of Proinflammatory Cytokines in BBB Dysfunction. *Int J Mol Sci* 26. <https://doi.org/10.3390/ijms26083532>